

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Karoline dos Santos Rodrigues

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO
MATERNO SOBRE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES CELULARES NO ENCÉFALO DA
PROLE EM UM MODELO DE DESMAME PRECOCE**

Porto Alegre

2017

Karoline dos Santos Rodrigues

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO
MATERNO SOBRE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES CELULARES NO ENCÉFALO DA
PROLE EM UM MODELO DE DESMAME PRECOCE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Bioquímica

Orientadora: Dra. Juliana Bender Hoppe
Coorientadora: MSc. Caroline Peres Klein

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Karoline dos Santos

Investigação do efeito neuroprotetor do exercício físico materno sobre possíveis alterações celulares no encéfalo da prole em um modelo de desmame precoce / Karoline dos Santos Rodrigues. -- 2017.

54 f.

Orientador: Juliana Bender Hoppe.

Coorientador: Caroline Peres Klein.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Desmame precoce. 2. Natação materna. 3. Estado redox. 4. Mitocôndria. 5. Neuroproteção. I. Hoppe, Juliana Bender, orient. II. Klein, Caroline Peres, coorient. III. Título.

RESUMO

O período gestacional e de lactação são críticos para o desenvolvimento de um organismo e, eles são considerados janela crítica de vulnerabilidade onde a exposição à fatores ambientais e o estilo de vida materno podem programar o metabolismo, sendo capaz de conferir resistência ou aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças na infância e vida adulta. O aleitamento materno promove benefícios à saúde do recém-nascido e fornece proteção contra diversas doenças na vida adulta. No entanto, o desmame precoce é uma prática que vem aumentando, a qual tem sido associada ao desenvolvimento de diversas patologias e alterações comportamentais. Por outro lado, o exercício físico materno durante a gestação exerce influências benéficas ao desenvolvimento metabólico e comportamental da prole. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito da natação materna durante a gestação sobre alterações neuroquímicas no hipocampo e hipotálamo da prole que foram submetidos a um modelo de desmame precoce. Ratas fêmeas foram divididas em 2 grupos: controle sedentário e natação materna. As ratas do grupo exercício materno foram submetidas a um protocolo de natação (5 vezes/semana, 30 min/dia) durante 4 semanas, uma semana antes do acasalamento com ratos machos e durante toda o período de prenhez. Os filhotes fêmeas foram subdivididos em 2 grupos: desmame controle (dia pós-natal 21) e desmame precoce (dia pós-natal 16). No dia pós-natal 30, os filhotes foram eutanasiados e o hipocampo e hipotálamo foram removidos para avaliações bioquímicas. O desmame precoce modificou diferentemente os parâmetros avaliados no hipocampo e hipotálamo da prole. O desmame precoce induziu aumento da oxidação da DCFH em ambas as estruturas encefálicas, aumento dos níveis de superóxido mitocondrial e redução na massa e potencial de membrana mitocondrial no hipotálamo. O exercício físico materno durante a gestação preveniu o aumento do superóxido mitocondrial no hipotálamo e promoveu aumento da massa e potencial de membrana mitocondrial no hipocampo. Tanto o desmame precoce quanto o exercício físico materno não exerceram efeito sobre a lipoperoxidação nas duas estruturas avaliadas. Em conclusão, o desmame precoce foi capaz de alterar o estado redox e parâmetros mitocondriais no hipocampo e hipotálamo, e o exercício físico materno foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de superóxido mitocondrial induzido pelo desmame precoce.

Palavras-chave: Desmame precoce. Natação materna. Estado redox. Mitocôndria. Neuroproteção.

ABSTRACT

Gestational period and lactation are critical to development of an organism, and it are considered critical window of vulnerability in which the exposure to environmental factor and maternal lifestyle program the metabolism and it are able to confer resistance or augment the susceptibility to disease in child- and adulthood. Lactation provides benefits to health and protection against diseases in adult life. However, early weaning has been becoming a common practice and it has been associated to several pathologies and behavioral alterations. On the other hand, maternal exercise during pregnancy exerts beneficial influences on offspring's metabolic development and behavior. Therefore, the aim of this study was to assess the effect of maternal exercise on neurochemical alterations in the offspring's hippocampus and hypothalamus submitted to early weaning. Female rats were divided into 2 groups: sedentary control and maternal exercise. Rats from exercise group were submitted to swimming protocol (5 days/week, 30 min/day) during 4 weeks, one week before mating and throughout pregnancy. Female offspring were subdivided into 2 groups: control weaning (post-natal day 21) and early weaning (post-natal day 16). On post-natal day 30 the offspring were euthanized, and hippocampus and hypothalamus were removed to perform biochemical assays. Early weaning differently modified biochemical parameters in the offspring's hippocampus and hypothalamus. Early weaning increased DCFH oxidation in both encephalic structures, increased of mitochondrial superoxide levels, and reduced mitochondrial mass and membrane potential in the hypothalamus. Maternal exercise during pregnancy prevented the increment of mitochondrial superoxide levels in the hypothalamus and promoted an increment in the hippocampal mitochondrial mass and membrane potential. Neither maternal exercise during pregnancy nor early weaning affected lipid peroxidation in the offspring's hippocampus and hypothalamus. In conclusion, early weaning was able to alter the redox state in the offspring's hippocampus and hypothalamus, and maternal exercise was able to prevent the increment of mitochondrial superoxide levels induced by early weaning.

Keywords: Early weaning. Swimming. Redox state. Mitochondria. Neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental materno, e desenho experimental da prole.

Figura 2. Parâmetros de estado redox no hipocampo e hipotálamo da prole aos 30 dias de idade, nascidas de ratas sedentárias ou exercitadas durante a gestação, submetidas ao modelo de desmame controle ou precoce.

Figura 3. Quantificação da massa e potencial de membrana mitocondrial no hipocampo e hipotálamo da prole aos 30 dias de idade, nascidas de ratas sedentárias ou exercitadas durante a gestação, submetidas ao modelo de desmame controle ou precoce.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA.....	7
1.1	ALEITAMENTO E CUIDADO MATERNO	7
1.2	DESMAME PRECOCE	8
1.3	EXERCÍCIO FÍSICO COMO ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA	9
1.4	EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO E PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	11
1.5	JUSTIFICATIVA	12
1.6	OBJETIVOS.....	12
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	14
	INTRODUÇÃO	18
	MATERIAIS E MÉTODOS	20
	RESULTADOS.....	23
	DISCUSSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	32
	LEGENDAS DAS FIGURAS.....	35
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO A – CARTA DE ACEITE DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	48
	ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BRASILEIRA DE BIOCIÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

O desenvolvimento e crescimento de um indivíduo são eventos críticos que podem determinar o estado de saúde e/ou a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças ao longo da vida, na infância, adolescência e vida adulta (BALE, BARAM et al., 2010). Após o nascimento, a alimentação do neonato através do aleitamento materno é essencial para o desenvolvimento pós-natal (AGOSTI et al., 2017). Os compostos nutritivos provenientes da dieta, desde o período pré-natal até os primeiros anos de vida, podem modular processos adaptativos do metabolismo e causar modificações fisiológicas no organismo (KOLETZKO, 2005). Durante os dois primeiros anos de vida, a nutrição fornecida pela amamentação é essencial para a programação e para o desenvolvimento endócrino, neural, metabólico, imunológico, psicológico, e das funções sensoriais, executivas e comportamentais (GARTNER, MORTON et al., 2005, KOLETZKO, 2005, AGOSTI, TANDOI et al., 2017, ESTEBAN-CORNEJO, HENRIKSSON et al., 2017). Além disso, a amamentação protege a criança contra o desenvolvimento de doenças infecciosas e crônicas (WHO 2009). Diante desses benefícios a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que a alimentação do bebê seja exclusivamente com o leite materno durante os primeiros 6 meses de vida, não incluindo até mesmo água (WHO 2009). A partir dos 6 meses, a demanda energética da criança aumenta, e a introdução de alimento sólido se torna complementar ao leite materno (WHO 2009). Estudos clínicos e meta-análises demonstram que o tempo de aleitamento materno é positivamente correlacionado com a capacidade cognitiva de crianças e adolescentes (ANDERSON et al., 1999, PARK et al., 2014, HORTA et al., 2015, ESTEBAN-CORNEJO et al., 2017, KIM et al., 2017), bem como está relacionado com menores índices de desenvolvimento de obesidade (VICTORA et al., 2016, BETOKO et al., 2017).

1.1 ALEITAMENTO E CUIDADO MATERNO

O leite materno contém nutrientes como: ácidos graxos essenciais, ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, lactose, fosfolipídios, enzimas que aumentam a digestão, proteína do soro do leite (α -lactoglobulina e lactoferrina), entre outros (MATHUR; DHINGRA, 2014). Além dos nutrientes, o leite materno contém inúmeras moléculas bioativas que contribuem para a maturação do sistema imunológico, desenvolvimento e composição da microbiota (BALLARD; MORROW, 2013). A composição nutricional do leite materno é responsável pelos efeitos positivos relacionados à alimentação exclusiva com o leite materno, o qual

fornece perfeita nutrição, permite um crescimento saudável e um adequado desenvolvimento cerebral (ESTEBAN-CORNEJO et al., 2017).

Mesmo que evidências clínicas suportem os benefícios da nutrição com o leite materno, exclusiva nos primeiros seis meses e complementar até os dois anos de idade, apenas 37% dos lactentes do mundo são amamentados exclusivamente com leite materno durante os primeiros seis meses de vida (VICTORA et al., 2016). Esse panorama global de desmame precoce é influenciado por diversos fatores socioeconômicos como a renda, escolaridade e inserção das mulheres no mercado de trabalho (GALTRY, 1997, SANTANA et al., 2017). Portanto, o desmame precoce, prática que vai em oposição as recomendações preconizadas pela OMS, representa um importante problema de saúde pública (GALTRY, 1997).

1.2 DESMAME PRECOCE

O desmame é a transição da supressão da oferta do leite materno pela introdução de leites modificados e/ou alimentos na dieta da criança (PATEL; SRINIVASAN, 2011). Nesta perspectiva, torna-se importante o desenvolvimento de estudos correlacionando as consequências do desmame precoce na saúde e no desenvolvimento das crianças.

O desmame é um evento que desafia o metabolismo do organismo que é exposto pois representa o desligamento da dependência nutricional e comportamental mãe-filho (PATEL; SRINIVASAN 2011). Neste contexto, estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que alterações repentinas no ambiente, situações de estresse e alterações nutricionais durante os períodos críticos do início da vida (gestação e lactação), podem causar alterações indesejáveis que perduram até a vida adulta do indivíduo. Essas alterações podem contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias, como obesidade, hipertensão arterial, ansiedade e depressão na vida adulta (GARTNER et al., 2005, FRAGA et al., 2014).

Em estudos com modelos animais de desmame precoce, dos Santos Oliveira, de Lima et al. (2011) observaram que o desmame no dia pós-natal (PN) 15 por separação física das mães tornou os animais mais propensos a preferirem dietas ricas em gordura quando comparado com animais desmamados em PN 30. Outras alterações observadas em animais desmamados precocemente incluem: o aumento da agressividade (KANARI et al., 2005, AHOLA et al. 2017), o aumento da ansiedade (KIKUSUI et al., 2006, KODAMA et al., 2008) e a redução do desempenho cognitivo (POLETTTO et al., 2006). Além disso, já foi demonstrado que o desmame precoce é capaz de alterar, em curto e longo prazo, parâmetros fisiológicos como peso corporal, comprimento, gordura visceral, gordura total, glicemia,

níveis de insulina e leptina sérica, bem como o índice de resistência à insulina em ratos (LIMA et al., 2011). Em conjunto, esses achados demonstram que o desmame precoce pode influenciar negativamente o desenvolvimento fisiológico e neurocomportamental da prole, tornando necessário o estudo dos mecanismos moleculares implicados nessas alterações.

Alguns estudos já demonstraram que os cuidados maternos são essenciais para um bom desenvolvimento neuronal, pois ajudam na liberação de fatores que são responsáveis pelo adequado desenvolvimento do hipocampo e o processo de neurogênese que ocorre na prole (LIU et al., 2000, MARAIS et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2011). O processo de diferenciação celular de subpopulações neuronais durante o desenvolvimento tem se mostrado dependente da produção de neurotrofinas, principalmente do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) (SCHINDER; POO, 2000). Estudos têm demonstrado que a interação mãe-filhote promove a liberação do BDNF, podendo este exercer efeitos importantes sobre a cognição e o comportamento dos filhotes. Em um estudo realizado na Universidade de Tóquio, os pesquisadores sugeriram que o desmame precoce é responsável pela diminuição de BDNF e, conseqüente inibição na proliferação e sobrevivência de células hipocámpais tanto em camundongos machos quanto em fêmeas (KIKUSUI et al., 2009). Além disso, outros estudos demonstraram que a privação materna pode alterar a expressão de BDNF no córtex pré-frontal e no corpo estriado em ratos (ROCERI et al., 2004) e no córtex pré-frontal em camundongos (MOGI et al., 2016), podendo resultar em uma disfunção na plasticidade e aumento da vulnerabilidade celular na vida adulta. Por fim, Mirescu et al. (2004) observaram que o desmame precoce foi capaz de diminuir a proliferação celular e a produção de neurônios imaturos no giro denteado em ratos, os quais mostraram uma supressão duradoura da neurogênese e diminuição da plasticidade hipocámpal após a exposição ao estresse na vida adulta.

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO COMO ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA

A prática de exercício físico tem sido empregada como uma estratégia terapêutica não-farmacológica de prevenção contra diversas doenças, pois promove melhora da saúde física e mental através da promoção de várias alterações benéficas no organismo, incluindo o SNC (RADAK et al., 2014, HAMILTON; RHODES, 2015). Os efeitos neuroprotetores do exercício físico são evidenciados tanto em humanos como em modelos animais (RADAK et al., 2001, AKHAVAN et al., 2008, ERICKSON et al., 2011, NASCIMENTO et al., 2014, STONE et al., 2015, MANG et al., 2016). Estudos clínicos demonstram que a atividade física

preserva o volume e a integridade de algumas áreas do cérebro em indivíduos idosos (NAGAMATSU et al., 2016) e, em indivíduos que apresentam desordens metabólicas, como obesidade (DAVIS et al., 2011, MUELLER et al., 2015, LEGGET et al., 2016), doenças cardiovasculares (BASNAYAKE et al., 2012), e doenças neurodegenerativas (PRAKASH et al., 2010, YU et al., 2014). Há mais de 50 anos estudos tem demonstrado que os benefícios do exercício físico sobre o sistema cardiovascular (HICKS; BIRREN, 1970), relacionados ao aumento do aporte sanguíneo, concordam com os achados de melhora da função cerebrovascular, onde há maior entrega de nutrientes ao cérebro associada à melhoras das funções do sistema nervoso central (McFARLAND, 1963, PYSH; WEISS, 1979, BLACK et al., 1987, DUSTMAN et al., 1990).

Assim, o foco de maior interesse em estudos clínicos com relação à prática de exercício físico é a habilidade de melhorar os processos cognitivos, de aprendizado e de memória dos indivíduos (INTLEKOFER; COTMAN, 2013, SUO et al., 2016, CAI et al., 2017). Uma limitação dos estudos clínicos é a inviabilidade da investigação dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelos efeitos benéficos do exercício físico no SNC. Nesse sentido, a utilização de modelos animais tem contribuído para essa finalidade.

Os estudos conduzidos com modelos animais têm investigado os mecanismos pelos quais o exercício físico promove neuroproteção. A prática de exercício físico induz um aumento da formação de espécies reativas, as quais medeiam a adaptação do metabolismo através da modulação de respostas como o aumento da atividade do sistema antioxidante enzimático e das defesas não enzimáticas, indução da biogênese mitocondrial e resistência ao estresse oxidativo (RADAK et al., 2016). Essas alterações são resultantes da ativação de vias de sinalização, as quais respondem à variação da demanda metabólica energética decorrente do exercício (RADAK et al., 2008, RADAK et al., 2008). O aumento da demanda energética, por sua vez, induz aumento da capacidade oxidativa da célula através do aumento da atividade do sistema de transporte de elétrons, culminando no aumento da formação de espécies reativas (RADAK et al., 2008, RADAK et al., 2008, VINA et al., 2009, MARQUES-ALEIXO et al., 2012). O exercício exige um maior consumo de ATP pelas células e, portanto, o aumento dos níveis de AMP podem ativar a proteína-quinase ativada por AMP (AMPK) bem como as proteínas desacetilases dependentes de NAD^+ (sirtuínas), as quais ativam o principal regulador da biogênese mitocondrial, o co-ativador 1- α do receptor ativado por proliferação de peroxissomos (PGC-1 α) (VINA et al., 2009, SCARPULLA, 2011). Além disso, a atividade física também apresenta efeitos sobre a cognição por meio do aumento dos níveis do RNA mensageiro de BDNF bem como de seu produto proteico (NEEPER et al., 1996, OLIFF et

al., 1998, VAN HOOMISSEN et al., 2003). Griesbach et al. (2004) demonstraram que o exercício voluntário é capaz de regular os níveis de BDNF após lesão cerebral traumática, promovendo a recuperação funcional de ratos.

1.4 EXERCÍCIO FÍSICO MATERNO E PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

Visto que o exercício físico promove diversas adaptações metabólicas e, que é capaz de prevenir e reverter quadros patológicos (RADAK et al., 2008, MARQUES-ALEIXO et al., 2012), recentemente, estudos na área de programação metabólica têm investido no exercício físico materno durante a gestação como estratégia preventiva para o desenvolvimento de doenças na prole (AKHAVAN et al., 2008, AKHAVAN et al. 2012, HERRING et al., 2012, MARCELINO et al., 2016). A programação metabólica ocorre durante os estágios de desenvolvimento intrauterino, onde o estilo de vida da mãe pode induzir modificações que irão ditar o estado de saúde e/ou a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças na infância ou vida adulta (BALE et al., 2010). Intervenções como o exercício físico materno podem causar modificações que sejam favoráveis a uma vida saudável (FIDALGO et al., 2013). Sobre condições de neurodesenvolvimento o exercício materno evidenciou uma melhora nas fases de aquisição e retenção da memória, bem como aumento do número de células hipocâmpais nas regiões de CA1 e giro denteado em filhotes de ratos (AKHAVAN et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que o exercício materno voluntário previne a redução do número de neurônios hipocâmpais, observado em ratos submetidos a um modelo de hipóxia neonatal (AKHAVAN et al., 2012). Em adição aos mecanismos celulares e moleculares, o exercício físico materno exerce influência sobre o peso no nascimento, teor de gordura neonatal e crescimento fetoplacentário (CLAPP et al., 2002).

Durante a gestação, o tipo de exercício praticado pela mãe é de extrema importância. A natação é um exercício físico de intensidade moderada no qual não há risco de queda, tornando a sua prática segura e vantajosa (KATZ, 1996). O laboratório de Programação Metabólica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenado pela Profa. Cristiane Matté, tem explorado os efeitos da natação materna antes e durante a gestação. Recentemente, foi demonstrado pelo grupo que o exercício materno foi capaz de programar o metabolismo fetal, evidenciado pela biogênese mitocondrial e aumento da capacidade do sistema antioxidante em várias regiões do encéfalo da prole de ratos (MARCELINO et al., 2013). Além disso, o exercício materno melhorou a memória de reconhecimento de filhotes machos adultos, mas não de filhotes fêmeas (MARCELINO et al.,

2016). Outros grupos de pesquisa demonstraram que a natação materna durante a gestação foi capaz de promover aumento da neurogênese no hipocampo de filhotes, associado ao aumento da expressão de mRNA de BDNF, os quais contribuíram para a melhora da memória de curto prazo da prole (LEE et al., 2006).

1.5 JUSTIFICATIVA

Diante do baixo índice de lactentes amamentados pelo tempo preconizado pela OMS e das potenciais alterações no desenvolvimento cerebral resultantes do desmame precoce, possíveis estratégias neuroprotetoras devem ser desenvolvidas com o intuito de prevenir alterações indesejáveis que podem perdurar até a vida adulta do indivíduo. Considerando todos os aspectos apresentados, se acredita que o exercício físico parental pode ser empregado como uma estratégia neuroprotetora não-farmacológica na prevenção dos possíveis efeitos adversos do desmame precoce na prole. Visto que uma das limitações dos estudos clínicos é observar os efeitos das intervenções sobre o SNC dos indivíduos, os estudos em modelos animais vêm contribuindo para o aprendizado de diversos mecanismos celulares e moleculares.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Investigar o potencial efeito neuroprotetor do exercício físico de natação materna durante a gestação sobre as possíveis alterações celulares e moleculares na prole adulta de ratas Wistar submetidas a um modelo de desmame precoce.

1.6.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos do trabalho:

- a) Avaliar possíveis alterações do estado redox no hipotálamo e hipocampo da prole adulta de ratas submetidas ao exercício materno durante a gestação, promovidas pelo modelo de desmame precoce através da avaliação dos níveis de espécies reativas, como o superóxido mitocondrial e a oxidação da diclorofluoresceína por citometria de fluxo;

- b) Avaliar possíveis alterações da função mitocondrial no hipotálamo e hipocampo da prole adulta de ratas submetidas ao exercício materno durante a gestação, promovidas pelo modelo de desmame precoce através da avaliação da massa e potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico gerado a partir deste trabalho de conclusão de curso foi redigido conforme as normas de publicação da Revista Brasileira de Biociências (ANEXO B).

Investigação do efeito neuroprotetor do exercício físico materno sobre possíveis alterações celulares no encéfalo da prole em um modelo de desmame precoce

Investigation of neuroprotective effect of maternal exercise during pregnancy on possible cellular alterations in the offspring's encephalon in an early weaning model

Karoline dos Santos Rodrigues^{1,2}, Cristiane Matté², Christianne Gazzana Salbego², Caroline Peres Klein², Juliana Bender Hoppe²

¹Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ²Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor correspondente: Dra. Juliana Bender Hoppe (email: juhoppe@hotmail.com)

Conflitos de interesse: Não ha conflitos de interesse.

RESUMO

A gestação e a lactação são períodos críticos para o desenvolvimento pré- e pós-natal. A programação do metabolismo pode ser influenciada pelo estilo de vida da mãe, o qual pode afetar positivamente ou negativamente o desenvolvimento. O aleitamento materno promove benefícios à saúde do recém-nascido enquanto o desmame precoce está associado ao desenvolvimento de patologias e alterações comportamentais. O exercício físico materno durante a gestação exerce influências benéficas ao desenvolvimento metabólico e comportamental da prole. Dessa forma, o objetivo do estudo foi investigar o efeito da natação materna durante a gestação sobre alterações neuroquímicas na prole induzidas pelo desmame precoce. As ratas mães foram divididas em 2 grupos: sedentário e natação materna (5 vezes/semana, 30 min/dia durante 4 semanas). Os filhotes fêmeas foram subdivididos em 2 grupos: desmame controle (dia pós-natal 21) e desmame precoce (dia pós-natal 16). No dia pós-natal 30, os filhotes foram eutanasiados e o hipocampo e hipotálamo foram removidos para avaliações bioquímicas. O desmame precoce induziu aumento da oxidação da DCFH no hipocampo e hipotálamo da prole, e aumento nos níveis de superóxido mitocondrial e redução na massa e potencial de membrana mitocondrial no hipotálamo. O exercício físico materno preveniu o aumento do superóxido mitocondrial no hipotálamo e promoveu aumento da massa e potencial de membrana mitocondrial. Em conclusão, o desmame precoce foi capaz de alterar o estado redox e parâmetros mitocondriais no hipocampo e hipotálamo, e o exercício físico materno prevenir o aumento dos níveis de superóxido mitocondrial induzido pelo desmame precoce.

Palavras-chave: Neuroproteção. Estado redox. Função mitocondrial.

ABSTRACT

Pregnancy and lactation are critical periods to pre- and post-natal development. Metabolic programming might be influenced by maternal lifestyle, which can affect positively or negatively the development. The breastfeeding promotes benefits to newborn health; on the other hand, early weaning is associated to development of several pathologies and behavioral alterations. Maternal exercise during pregnancy exerts beneficial influences to offspring's metabolism and behavioral development. Therefore, the aim of the present study was to assess the effect of maternal exercise during pregnancy on neurochemical changes induced by early weaning in the offspring. Female rats were divided into 2 groups: sedentary and maternal swimming (5 days/week, 30 min/day during 4 weeks). Female offspring were subdivided into 2 groups: control (post-natal day 21) and early weaning (post-natal day 16). On post-natal day 30, the offspring were euthanized, hippocampus and hypothalamus were removed to perform biochemical assays. Early weaning increased DCFH oxidation in both encephalic structures, increased of mitochondrial superoxide levels, and reduced mitochondrial mass and membrane potential in the hypothalamus. Maternal exercise during pregnancy prevented the increment of mitochondrial superoxide levels in the hypothalamus and promoted an increment in the hippocampal mitochondrial mass and membrane potential. Neither maternal exercise during pregnancy nor early weaning affected lipid peroxidation in the offspring's hippocampus and hypothalamus. In conclusion, early weaning was able to alter the redox state in the offspring's hippocampus and hypothalamus, and maternal exercise was able to prevent the increment of mitochondrial superoxide levels induced by early weaning.

Key-words: Neuroprotection. Redox state. Mitochondrial function.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a alimentação de recém-nascidos até os primeiros seis meses de vida seja exclusivamente de leite materno e, que a partir dessa idade haja a introdução de alimentos sólidos como complemento ao aleitamento (WHO 2009). Essas recomendações são baseadas nos benefícios que o aleitamento materno oferece à saúde do recém-nascido, tais como melhora das funções imunológicas, psicológicas, sensoriais, executivas e comportamentais (Gartner, Morton et al. 2005, Koletzko 2005, Agosti, Tandoi et al. 2017, Esteban-Cornejo, Henriksson et al. 2017), e proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas na infância e vida adulta (Gartner, Morton et al. 2005). No entanto, o panorama global indica que a inserção das mulheres no mercado de trabalho nas últimas décadas tem contribuído para a baixa taxa de lactentes exclusivos até os seis meses de vida, compreendendo cerca de apenas 35% lactentes até o 4º mês (WHO 2009). A crescente taxa de prevalência do desmame precoce (Araujo, da Cunha et al. 2008) tem se tornado um problema de saúde pública, uma vez que estudos têm evidenciado que o desmame precoce pode alterar o desenvolvimento do organismo e provocar distúrbios metabólicos e comportamentais na prole (Kanari, Kikusui et al. 2005, Kikusui, Nakamura et al. 2006, dos Santos Oliveira, de Lima et al. 2011).

Estudos em animais têm contribuído para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de diversas patologias. Dados publicados por estudos que utilizaram o modelo de desmame precoce em animais demonstram diversas alterações deletérias à saúde. Dentre as alterações já descritas na literatura, se destacam: o desenvolvimento de obesidade (Lima, Moura et al. 2013), resistência à leptina (Franco, Lisboa et al. 2014), dislipidemia (Franco, Lisboa et al. 2013), alterações no sistema neuroendócrino (Carlyle, Duque et al. 2012, Franco, Lisboa et al. 2014, Quitete, Nobre et al. 2015), alteração na permeabilidade intestinal (Hu, Xiao et al. 2013), alteração na expressão de receptores de serotonina

(Nakamura, Kikusui et al. 2008, Sumner, D'Eath et al. 2008), alterações comportamentais, como a indução de comportamento do tipo agressivo e depressivo, déficit no aprendizado (Fraga, de Moura et al. 2014), entre outras. Além disso, ratos expostos ao desmame precoce apresentaram atividade hiperlocomotora e vulnerabilidade ao estresse (Ishikawa, Ogawa et al. 2014), interrupção no desenvolvimento dos axônios de neurônios monoaminérgicos (Ishikawa and Ishikawa 2013) e prejuízo no desenvolvimento do circuito córtex pré-frontal medial-amígdala resultando em comportamentos semelhantes à ansiedade (Ishikawa, Nishimura et al. 2015).

A gestação e a lactação são períodos cruciais para o desenvolvimento do organismo, o qual é altamente susceptível à exposição ambiental e ao estilo de vida materno. Durante esse período crítico de desenvolvimento, o organismo apresenta uma plasticidade fenotípica que irá programar o metabolismo do indivíduo (Bale, Baram et al. 2010). Intervenções durante esse período de plasticidade do desenvolvimento poderão influenciar o estado de saúde e/ou o desenvolvimento de doenças na infância e vida adulta (Bale, Baram et al. 2010). O exercício físico durante a gestação tem sido empregado como estratégia neuroprotetora em diversos modelos, tais como desordens metabólicas, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Herring, Donath et al. 2012, Wasinski, Bacurau et al. 2015), visto seus benefícios tanto na saúde física quanto na saúde mental da prole (Radak, Ihasz et al. 2014, Hamilton and Rhodes 2015). O exercício materno durante a gestação vem sendo proposto como uma estratégia de promoção à saúde da mãe e do feto (Clapp, Kim et al. 2002, Parnpiansil, Jutapakdeegul et al. 2003), pois promove inúmeras alterações metabólicas benéficas na prole, incluindo alterações no estado redox e melhora da função mitocondrial no sistema nervoso central (SNC) (Marcelino, Longoni et al. 2013, Park, Kim et al. 2013).

Uma vez que as mulheres estão se tornando cada dia mais ativas no mercado de trabalho, diminuindo sua disponibilidade de tempo para a amamentação exclusiva, torna-se

relevante o estudo dos efeitos do desmame precoce e possíveis estratégias neuroprotetoras para a prole. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial efeito neuroprotetor da lactação materna durante a gestação sobre as possíveis alterações neuroquímicas no hipocampo e no hipotálamo da prole submetida a um modelo de desmame precoce.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Os reagentes utilizados para as técnicas descritas a seguir foram adquiridos das seguintes empresas: SIGMA Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA), Life technologies (Carlsbad, California, USA), e Cell Signaling (Beverly, Massachusetts, USA).

Aspectos éticos

Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética local (Comissão de Ética no Uso de Animais/Universidade Federal do Rio Grande do Sul - CEUA / UFRGS) sob o nº 33532. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidado no Uso de animais de laboratório do NIH (publicação NIH nº 80-23, revisado em 1996). Atestamos que todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais utilizados e o sofrimento dos mesmos.

Animais

No presente estudo foram utilizados 34 ratos Wistar adultos (24 fêmeas prenhas e 10 machos exclusivos para o acasalamento), os animais provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da UFRGS – Porto Alegre/Brasil foram mantidos em ciclos claro-escuro de 12h/12h, à temperatura constante de 22°C±1°C com acesso a alimento e água *ad libitum*. As ratas fêmeas foram divididas em dois grupos: controle sedentário e exercício de natação. As fêmeas do grupo exercício foram submetidas ao

protocolo de natação 1 semana antes do acasalamento, período que corresponde à habituação, e durante todo o período de gestação (Figura 1). Para o acasalamento, um rato macho foi colocado em contato com duas fêmeas virgens por um período de 48 horas. A prenhez foi diagnosticada através da presença de espermatozoides no lavado vaginal. No 20º dia de gestação, as ratas foram realocadas individualmente em caixas moradia para o nascimento dos filhotes, os quais permaneceram com as mães até o desmame. As ratas foram observadas duas vezes ao dia (9:00 e 18:00) para verificar o nascimento dos filhotes. O dia do nascimento foi determinado como o dia pós natal 0 (PN0).

Protocolo de natação materna

As ratas fêmeas adultas foram submetidas ao protocolo de exercício físico materno de intensidade moderada de natação, durante 4 semanas, 5 dias/semana com duração de 30 min/dia. (Marcelino, Longoni et al. 2013). As ratas do grupo controle foram diariamente imersas na água, e imediatamente removidas, secadas e devolvidas para suas caixas-moradia, com o intuito de sofrer o mesmo estresse de contato com o ambiente aquático que as ratas do grupo exercício.

Modelo experimental de desmame precoce

O modelo de desmame precoce realizado foi conduzido de acordo com (Kikusui, Ichikawa et al. (2009)), com algumas modificações. Os filhotes fêmeas permaneceram com as mães até o momento do desmame. A prole foi subdividida em dois grupos: desmame precoce (PN16) e desmame controle (PN21). A partir do dia em que o desmame foi realizado (PN 16 ou PN 21), os filhotes foram mantidos em número de 4 animais por caixa moradia, até completar 30 dias de vida. No PN 30, os filhotes fêmeas foram eutanasiados, o cérebro foi removido, e o hipocampo e o hipotálamo foram dissecados para as análises bioquímicas por citometria de fluxo.

Preparação das amostras

As estruturas encefálicas (aproximadamente 100 mg), hipocampo e hipotálamo, foram dissociadas em tampão PBS pH 7,4 contendo 1 mg% de colagenase IV e 0.5 mg% de DNase, centrifugadas a 1500 RPM durante 5 minutos a temperatura de 4°C para a remoção da colagenase. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as células foi ressuspensionado em PBS. A solução contendo as células foi filtrada (filtro com poro de 40 µm; SPL Lifesciences Co., Naechon-Myeon Pocheon, South Korea), foram distribuídos 100 µL em tubos para a incubação com as sondas moleculares para posterior análise em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur®).

Citometria de fluxo

Os níveis de espécies reativas foram determinados através da incubação com 10 µM de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H2DCF-DA; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) durante 20 minutos a 37°C em ambiente escuro. Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados através da sonda BODIPY (Invitrogen®, Molecular Probes, Eugene, OR - USA). Os níveis de superóxido mitocondrial (${}_{m}O_2^{\bullet}$), massa e potencial de membrana mitocondrial foram determinados através da incubação com 1 µM MitoSOX™ Red® durante 20 min, 100 nM MitoTracker® Green FM durante 45 min 100 nM MitoTracker® Red CM-H2XRos durante 45 min (Invitrogen®, Molecular Probes, Eugene, OR - USA), respectivamente. Os eventos/células foram adquiridos em citômetro de fluxo, previamente calibrado utilizando uma amostra de controle negativo, onde 30.000 eventos/células foram analisados. Os dados foram analisados através do software FlowJo. Os resultados estão expressos como fluorescência relativa em relação ao grupo controle; as sondas moleculares foram analisadas como percentual de células com alta fluorescência.

Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey quando as diferenças foram significativas (dados paramétricos). A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 6. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efeitos do desmame precoce sobre o estado redox no hipocampo e hipotálamo da prole

Com o intuito de investigar os efeitos do desmame precoce e do exercício físico materno durante a gestação sobre o estado redox no encéfalo da prole no PN30, foram avaliados, através da técnica de citometria de fluxo, os níveis de espécies reativas pela oxidação da DCFH e os níveis de mO_2^{\bullet} . O desmame precoce aumentou significativamente a oxidação da DCFH no hipocampo da prole em comparação ao grupo de desmame controle [$F(1,34)=10,76$, $p=0,002$], enquanto que o exercício físico durante a gestação não exerceu nenhum efeito sobre esse parâmetro [$F(1,34)=2,955$, $p=0,095$] (Figura 2A). De forma similar, o desmame precoce aumentou significativamente a oxidação da DCFH no hipotálamo [$F(1,35)=4,851$, $p=0,034$] e o exercício materno não exerceu efeito sobre esse parâmetro [$F(1,35)=0,029$; $p=0,865$] (Figura 2D). Quanto aos níveis de mO_2^{\bullet} , nenhuma das variáveis do estudo, desmame precoce e exercício físico materno, exerceu efeito significativo no hipocampo da prole [$F(1,35)=0,019$, $p=0,890$; $F(1,35)=2,844$, $p=0,100$, respectivamente] (Figura 2B). Por outro lado, houve interação entre o desmame precoce e o exercício físico materno [$F(1,35)=4,102$, $p=0,050$] quanto aos níveis de mO_2^{\bullet} no hipotálamo. O desmame precoce induziu um aumento dos níveis de mO_2^{\bullet} , enquanto que o exercício físico materno induziu uma redução dos níveis de mO_2^{\bullet} (Figura 2E). Os níveis de BODIPY foram investigados como indicativo de peroxidação lipídica (Figura 2C e 2F). Os níveis de BODIPY não foram alterados pelo desmame precoce no hipocampo ou hipotálamo [$F(1,36)=0,548$,

$p=0,464$; $F(1,36)=2,019$, $p=0,164$, respectivamente], bem como não foram afetados pelo exercício físico materno durante a gestação [$F(1,36)=0,240$, $p=0,627$; $F(1,36)=0,054$, $p=0,818$, respectivamente].

Efeitos do desmame precoce sobre massa e potencial de membrana mitocondrial no hipocampo e hipotálamo da prole

Visto as alterações sobre o estado redox frente ao desmame precoce, foi investigado as possíveis alterações na massa e potencial de membrana mitocondrial no hipocampo e hipotálamo da prole no PN30 por citometria de fluxo utilizando as sondas MitoTracker® Green FM e MitoTracker® Red CM-H2XROS, respectivamente. No hipocampo, o exercício físico materno durante a gestação induziu um aumento na massa mitocondrial [$F(1,34)=10,05$, $p=0,003$], independente da intervenção do desmame precoce [$F(1,34)=1,379$, $p=0,248$] (Figura 3A). Embora tenha sido observada uma tendência de redução da massa mitocondrial pelo desmame precoce sedentário, o efeito da interação entre os fatores não foi significativo [$F(1,35)=3,682$, $p=0,063$]. O exercício físico materno induziu um aumento significativo do potencial de membrana mitocondrial, em concordância com o aumento da massa mitocondrial [$F(1,32)=9,000$, $p=0,005$]. Por outro lado, o desmame precoce aboliu o efeito induzido pelo exercício materno [$F(1,32)=4,490$, $p=0,042$]. (Figura 3B). Com relação ao hipotálamo da prole, a massa e o potencial de membrana mitocondrial foram reduzidos significativamente pelo desmame precoce [$F(1,34)=7,936$, $p=0,008$; $F(1,34)=5,691$, $p=0,023$, respectivamente], e o exercício materno durante a gestação não foi capaz de reverter essas alterações [$F(1,34)=0,0045$, $p=0,944$; $F(1,34)=0,265$, $p=0,610$, respectivamente] (Figura 2C e D).

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado que o desmame precoce aos 16 dias pós-natal promove alterações no estado redox e na função mitocondrial nas estruturas encefálicas

avaliadas, hipocampo ou hipotálamo, em filhotes fêmeas no PN30. Além disso, o modelo de natação materna durante a gestação também promoveu alterações no estado redox e na função mitocondrial diferencialmente no hipocampo e hipotálamo dos filhotes fêmeas, bem como foi capaz de prevenir alguns dos efeitos provocados pelo desmame precoce.

Estudos têm demonstrado que eventos que ocorrem durante o período de vida intrauterino bem como no período de lactação podem afetar o desenvolvimento metabólico de um organismo. Além disso, os efeitos metabólicos decorrentes desses eventos nos períodos precoces da vida podem permanecer até a idade adulta de um indivíduo, modulando o estado de saúde e/ou a susceptibilidade a doenças (Bale, Baram et al. 2010). O aleitamento é essencial para o desenvolvimento e capacidade do indivíduo enfrentar as adversidades e o estresse na infância e na vida adulta, uma vez que o cuidado materno contribui para o desenvolvimento do comportamento da prole (Agosti, Tandoi et al. 2017). O desmame é um evento crucial para os mamíferos e se realizado precocemente está associado ao aumento da susceptibilidade a doenças tais como obesidade, depressão e ansiedade na vida adulta. Dentro desse panorama, o exercício físico materno durante a gestação está associado à modificações metabólicas e comportamentais benéficas na prole, tanto em humanos como em animais (Lima, Moura et al. 2013, Quitete, Nobre et al. 2015, Brown 2017, Kim, Kim et al. 2017). Visto que os efeitos promovidos pelo desmame precoce no metabolismo e comportamento são adversos à prole e, que o exercício materno durante a gestação apresenta benefícios à saúde da mesma, o presente estudo teve como objetivo investigar se o exercício materno durante a gestação, período crítico de desenvolvimento, é capaz de prevenir os efeitos adversos decorrentes do desmame precoce no hipocampo e no hipotálamo da prole.

O desmame *per se* induz modificações fisiológicas e comportamentais no filhote em resposta ao estresse pela interrupção da interação social mãe-filhote, e pelo novo ambiente ao qual ele será inserido, como as novas interações sociais e processo de alimentar-se sozinho

(Kikusui, Nakamura et al. 2006, van der Meulen, Koopmans et al. 2010). O estresse desencadeia uma série de alterações neuroendócrinas, envolvendo o hipotálamo e regiões que estão implicadas na resposta afetiva e cognitiva ao estresse, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal. Em conjunto, essas estruturas encefálicas modulam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Radley and Sawchenko 2011). Já foi demonstrado que os processos cognitivos dependentes da função hipocampal são afetados pelo desmame precoce (Fraga, de Moura et al. 2014). Além disso, o comportamento do tipo ansioso e agressivo em roedores, associado a alterações na função do eixo HPA, também podem ser modulados pelo desmame precoce (Kanari, Kikusui et al. 2005). No estudo de Kikusui, o desmame precoce no PN14 induziu comportamento do tipo ansioso em camundongos em associação com a diminuição da expressão de receptores de serotonina (5-HT-1A) no hipocampo (Kikusui, Nakamura et al. 2006). Além dos efeitos causados pelo desmame precoce, a privação maternal, que pode ser causa do mesmo, é capaz de alterar a proliferação celular no hipocampo, afetando habilidade na tarefa de reconhecimento de objetos (Hulshof, Novati et al. 2011), e alterando a resposta do eixo HPA frente a estímulos estressores (Plotsky and Meaney 1993, Aisa, Tordera et al. 2008, Veenema and Neumann 2009). Por outro lado, o exercício materno durante a gestação exerce efeitos benéficos sobre a estrutura e função do hipocampo da prole. Entre os benefícios, pode-se ressaltar a melhora na memória (Lee, Kim et al. 2006, Akhavan, Emami-Abarghoie et al. 2008), no estado redox do cérebro (Marcelino, Longoni et al. 2013), na função mitocondrial (Park, Kim et al. 2013) e na função cognitiva (Radak, Kaneko et al. 2001) em modelos animais. No entanto, poucos estudos investigaram os efeitos do exercício materno durante a gestação sobre a estrutura e função do hipotálamo. Visto que o hipocampo e o hipotálamo são estruturas importantes envolvidas com a resposta ao estresse, no presente trabalho essas estruturas foram utilizadas para a análise de possíveis

alterações que o desmame precoce e o exercício físico durante a gestação são capazes de causar sobre a prole.

Nossos resultados demonstraram que o desmame precoce aos 16 dias pós-natal foi capaz de aumentar significativamente os níveis de espécies reativas no hipocampo e no hipotálamo de fêmeas com 30 dias de idade, nascidas de ratas sedentárias ou exercitadas durante a gestação, o que pode estar relacionado ao estresse decorrente do desmame e da separação materna precoce. Até o momento, poucos estudos investigaram o efeito do desmame precoce sobre parâmetros de estado redox, sendo que a maioria deles foi conduzida em amostras de intestino delgado e soro de animais. Até onde se sabe não há estudos anteriores a este relacionando o aumento dos níveis de espécies reativas em encéfalo da prole de ratos submetidos ao desmame precoce. O estudo de Zhu et al. demonstrou que o desmame precoce induziu redução da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), aumento das espécies reativas óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, aumento dos níveis de MDA e redução do coativador-1 α de PPAR γ (PGC-1 α) em leitões (Zhu, Zhao et al. 2012). Esses resultados indicam que desmame precoce altera o estado redox através da modulação dos níveis de PGC-1 α , o qual apresenta papel importante na regulação da expressão de antioxidantes mitocondriais (St-Pierre, Drori et al. 2006, Lu, Xu et al. 2010), indução de biogênese mitocondrial, e proteção contra o estresse oxidativo (Zhu, Zhao et al. 2012). Alterações nos níveis plasmáticos e na atividade de enzimas antioxidantes, dano lipídico, proteico e ao DNA por um desequilíbrio no estado redox já foram observados no jejuno de leitões submetidos a um modelo de desmame precoce, e relacionados com a diminuição dos níveis do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2 - *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), fator de transcrição responsável pela expressão gênica de importantes moléculas do sistema antioxidante (Yin, Wu et al. 2014). Ho, Burch et al. (2016) observou que o desmame precoce aumentou a produção endotelial do ânion superóxido sem alterar a

atividade plasmática da enzima SOD. Ao desequilíbrio entre o aumento da produção de superóxido e a ausência de alteração na atividade antioxidante da SOD, foi atribuída a disfunção do endotélio vascular de camundongos (Ho, Burch et al. 2016). O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio da produção de radicais livres e a falha do sistema de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimático (Pi, Zhang et al. 2010, Reuter, Gupta et al. 2010). Em contraste aos efeitos do desmame precoce, diversos estudos demonstram que o exercício físico durante a gestação promove efeitos positivos no estado redox do cérebro da prole, através do aumento das defesas antioxidantes, além da promoção da biogênese mitocondrial e neurogênese no hipocampo (Lee, Kim et al. 2006, Akhavan, Emami-Abarghoie et al. 2008, Dayi, Agilkaya et al. 2012, Marcelino, Longoni et al. 2013). Uma vez que o cérebro é considerado um órgão mais vulnerável ao estresse oxidativo quando comparado aos demais órgãos, alterações na produção de espécies reativas e no sistema de defesa antioxidante durante períodos críticos de vulnerabilidade podem comprometer o seu desenvolvimento (Halliwell 2001, Halliwell and Gutteridge 2007).

A mitocôndria é responsável por uma grande parte da produção de espécies reativas das células (Halliwell 2006). Visto que o desmame precoce alterou os níveis de espécies reativas, investigamos a contribuição mitocondrial para o aumento desses níveis através da mensuração dos níveis de superóxido mitocondrial. O desmame precoce aumentou os níveis de superóxido mitocondrial no hipotálamo da prole, enquanto o exercício físico exerceu um efeito oposto, promovendo uma redução nos níveis de superóxido mitocondrial e, prevenindo o efeito do desmame precoce. A esse efeito protetor do exercício físico sobre os níveis de superóxido mitocondrial podemos atribuir o aumento da resposta antioxidante no hipotálamo, uma vez que já foi demonstrado que o exercício físico materno promove adaptação do metabolismo de diferentes estruturas encefálicas da prole através do aumento das defesas antioxidantes (Marcelino, Longoni et al. 2013). No hipocampo, não houve alterações nos

níveis de superóxido, sugerindo que o superóxido mitocondrial não contribui para o aumento das espécies reativas observado pelo aumento da oxidação da DCFH. Mesmo que o desmame precoce tenha induzido um aumento nos níveis de espécies reativas, não foi observado dano aos lipídios no hipotálamo e no hipocampo, não descartando a possibilidade de haver dano a outras macromoléculas, como já evidenciado por outros estudos (Ho, Burch et al. 2016, Huang, Xu et al. 2017).

Recentemente foi demonstrado que o desmame precoce altera no jejuno de leitões: o estado redox, observado pela redução da atividade da enzima SOD e da capacidade antioxidante total; a expressão de genes relacionados à biogênese e função mitocondrial, reduzindo o mRNA do Nrf1, do fator de transcrição mitocondrial A (Tfam – *mitochondrial +transcription factor A*), da enzima ATP sintase, da citocromo c oxidase e do citocromo c; bem como, a redução do conteúdo do DNA mitocondrial (Huang, Xu et al. 2017). Esse estudo foi o primeiro a demonstrar que o desmame precoce modula a quantidade de mitocôndrias e a atividade de enzimas relacionadas à sua funcionalidade (Huang, Xu et al. 2017). Quanto ao sistema nervoso central, não existem estudos publicados que tenham investigado o efeito do desmame precoce sobre parâmetros mitocondriais. Os neurônios são células enriquecidas em mitocôndrias, as quais são essenciais para suprir a demanda energética dessas células, uma vez que o metabolismo energético dos neurônios é especialmente oxidativo (Knott, Perkins et al. 2008). Embora o modelo de desmame precoce tenha apresentado uma tendência em diminuir a massa mitocondrial no hipocampo prole, o potencial de membrana mitocondrial permaneceu inalterado aos 30 dias de idade. Em contraste, o exercício físico durante a gestação promoveu um aumento significativo na massa e no potencial de membrana mitocondrial no hipocampo da prole submetida ao desmame precoce. O aumento concomitante da massa e potencial de membrana mitocondrial indica aumento da funcionalidade mitocondrial e é indicativo de biogênese mitocondrial (Tal, Sasai et al. 2009).

Interessantemente, Marcelino et al. demonstraram que o exercício físico durante a gestação promoveu biogênese mitocondrial em cerebelo e córtex parietal de ratos no PN7 (Marcelino, Longoni et al. 2013). Os dados obtidos nesse estudo sugerem que o exercício físico durante a gestação promove aumento do número de mitocôndrias funcionais no hipocampo da prole de ratas exercitadas durante a gestação aos 30 dias de idade. Em contrapartida, os benefícios promovidos pelo exercício físico materno em relação ao controle, quanto à funcionalidade mitocondrial, foram abolidos pelo desmame precoce. Com relação ao hipotálamo da prole, o desmame precoce induziu uma redução significativa no número de mitocôndrias funcionais, observados pela redução em ambos, massa e potencial de membrana mitocondrial. O exercício físico não exerceu efeito sobre o número de mitocôndrias funcionais, observado pelos níveis inalterados da massa e do potencial de membrana mitocondrial em comparação ao grupo controle e, além disso, não foi capaz de prevenir o efeito negativo do desmame precoce no hipotálamo da prole.

Estudos que investigam os efeitos do desmame precoce sobre parâmetros metabólicos relacionados ao estado redox no encéfalo da prole ainda são incipientes. No entanto, evidências quanto aos efeitos deletérios do desmame precoce sobre o comportamento afetivo, alimentar e cognitivo da prole, e sobre o funcionamento e responsividade do eixo HPA já estão documentadas (Kikusui, Takeuchi et al. 2004, Kanari, Kikusui et al. 2005, Kikusui, Ichikawa et al. 2009, Fraga, de Moura et al. 2014). Com base nos dados já publicados e nos dados apresentados no presente trabalho de que o desmame precoce afeta o sistema nervoso central, juntamente com a falta de dados que expliquem os mecanismos envolvidos com essas alterações é que existe a necessidade de que mais estudos sejam realizados.

Em conclusão, o nosso estudo demonstra pela primeira vez que o desmame precoce altera o estado redox e parâmetros mitocondriais no hipocampo e hipotálamo da prole aos 30 dias de idade que foi desmamada precocemente e foi privada do contato materno aos 16 dias

de idade. Além disso, demonstramos que o exercício físico materno promoveu benefícios relacionados à massa e potencial de membrana mitocondrial, e foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de superóxido mitocondrial induzido pelo desmame precoce. Entretanto, são necessários mais estudos para um maior entendimento dos mecanismos pelos quais o desmame precoce afeta o SNC da prole, bem como para investigar se o exercício físico materno tem o potencial de proteger o encéfalo da prole nessa situação de estresse pós-natal.

REFERÊNCIAS

- Agosti M, Tandoi F, Morlacchi L, Bossi A. 2017. Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. *Pediatr Med Chir* 39: 157.
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. 2008. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 154: 1218-1226.
- Akhavan MM, Emami-Abarghoie M, Safari M, Sadighi-Moghaddam B, Vafaei AA, Bandegi AR, Rashidy-Pour A. 2008. Serotonergic and noradrenergic lesions suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups. *Neuroscience* 151: 1173-1183.
- Araujo OD, da Cunha AL, Lustosa LR, Nery IS, Mendonca Rde C, Campelo SM. 2008. [Breastfeeding: factors that cause early weaning]. *Rev Bras Enferm* 61: 488-492.
- Bale TL, et al. 2010. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry* 68: 314-319.
- Brown A. 2017. Breastfeeding as a public health responsibility: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 30: 759-770.
- Carlyle BC, Duque A, Kitchen RR, Bordner KA, Coman D, Doolittle E, Papademetris X, Hyder F, Taylor JR, Simen AA. 2012. Maternal separation with early weaning: a rodent model providing novel insights into neglect associated developmental deficits. *Dev Psychopathol* 24: 1401-1416.
- Clapp JF, 3rd, Kim H, Burciu B, Schmidt S, Petry K, Lopez B. 2002. Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol* 186: 142-147.
- Dayi A, et al. 2012. Maternal aerobic exercise during pregnancy can increase spatial learning by affecting leptin expression on offspring's early and late period in life depending on gender. *ScientificWorldJournal* 2012: 429803.
- dos Santos Oliveira L, de Lima DP, da Silva AA, da Silva MC, de Souza SL, Manhaes-de-Castro R. 2011. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. *Behav Processes* 86: 75-80.
- Esteban-Cornejo I, et al. 2017. Early life programming of attention capacity in adolescents: The HELENA study. *Matern Child Nutr*.
- Fraga MC, de Moura EG, da Silva Lima N, Lisboa PC, de Oliveira E, Silva JO, Claudio-Neto S, Filgueiras CC, Abreu-Villaca Y, Manhaes AC. 2014. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. *Physiol Behav* 124: 100-106.
- Franco JG, Lisboa PC, da Silva Lima N, Peixoto-Silva N, Maia LA, Oliveira E, Passos MC, de Moura EG. 2014. Resveratrol prevents hyperleptinemia and central leptin resistance in adult rats programmed by early weaning. *Horm Metab Res* 46: 728-735.
- Franco JG, Lisboa PC, Lima NS, Amaral TA, Peixoto-Silva N, Resende AC, Oliveira E, Passos MC, Moura EG. 2013. Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning. *J Nutr Biochem* 24: 960-966.
- Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, Eidelman AI, American Academy of Pediatrics Section on B. 2005. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 115: 496-506.
- Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18: 685-716.
- . 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141: 312-322.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*.
- Hamilton GF, Rhodes JS. 2015. Exercise Regulation of Cognitive Function and Neuroplasticity in the Healthy and Diseased Brain. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135: 381-406.
- Herring A, Donath A, Yarmolenko M, Uslar E, Conzen C, Kanakis D, Bosma C, Worm K, Paulus W, Keyvani K. 2012. Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. *FASEB J* 26: 117-128.

- Ho DH, Burch ML, Musall B, Musall JB, Hyndman KA, Pollock JS. 2016. Early life stress in male mice induces superoxide production and endothelial dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 310: H1267-1274.
- Hu CH, Xiao K, Luan ZS, Song J. 2013. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. *J Anim Sci* 91: 1094-1101.
- Huang Q, Xu W, Bai KW, He JT, Ahmad H, Zhou L, Zhang LL, Wang T. 2017. Protective effects of leucine on redox status and mitochondrial-related gene abundance in the jejunum of intrauterine growth-retarded piglets during early weaning period. *Arch Anim Nutr* 71: 93-107.
- Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PG, den Boer JA, Meerlo P. 2011. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 216: 552-560.
- Ishikawa J, Ishikawa A. 2013. The effects of voluntary running exercise coincidence with social isolation after early weaning on monoaminergic axonal development. *Neuroscience* 230: 31-38.
- Ishikawa J, Nishimura R, Ishikawa A. 2015. Early-life stress induces anxiety-like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. *Eur J Neurosci* 41: 442-453.
- Ishikawa J, Ogawa Y, Owada Y, Ishikawa A. 2014. Hyperlocomotor activity and stress vulnerability during adulthood induced by social isolation after early weaning are prevented by voluntary running exercise before normal weaning period. *Behav Brain Res* 264: 197-206.
- Kanari K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. 2005. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. *Behav Brain Res* 156: 45-52.
- Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. 2004. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. *Physiol Behav* 81: 37-42.
- Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y. 2009. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology* 34: 762-772.
- Kikusui T, Nakamura K, Kakuma Y, Mori Y. 2006. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. *Behav Brain Res* 175: 96-103.
- Kim JI, Kim BN, Kim JW, Hong SB, Shin MS, Yoo HJ, Cho SC. 2017. Breastfeeding is associated with enhanced learning abilities in school-aged children. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health* 11: 36.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzell E. 2008. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9: 505-518.
- Koletzko B. 2005. Early nutrition and its later consequences: new opportunities. *Adv Exp Med Biol* 569: 1-12.
- Lee HH, et al. 2006. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev* 28: 147-154.
- Lima NS, Moura EG, Franco JG, Pinheiro CR, Pazos-Moura CC, Cabanelas A, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, de Oliveira E, Lisboa PC. 2013. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res* 45: 22-30.
- Lu Z, et al. 2010. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 13: 1011-1022.
- Marcelino TB, et al. 2013. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience* 246: 28-39.
- Nakamura K, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. 2008. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. *Behav Brain Res* 187: 442-448.
- Park JW, Kim MH, Eo SJ, Lee EH, Kang JS, Chang HK, Leem YH. 2013. Maternal exercise during pregnancy affects mitochondrial enzymatic activity and biogenesis in offspring brain. *Int J Neurosci* 123: 253-264.
- Parnpiansil P, Jutapakdeegul N, Chentanez T, Kotchabhakdi N. 2003. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. *Neurosci Lett* 352: 45-48.

- Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, Collins S, Andersen ME. 2010. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and Applied Pharmacology* 244: 77-83.
- Plotsky PM, Meaney MJ. 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 195-200.
- Quitete FT, Nobre JL, Peixoto-Silva N, de Moura EG, Lisboa PC, de Oliveira E. 2015. Anti-obesogenic effects of calcium prevent changes in the GLP-1 profile in adult rats primed by early weaning. *Mol Nutr Food Res* 59: 773-783.
- Radak Z, Ihasz F, Koltai E, Goto S, Taylor AW, Boldogh I. 2014. The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. *Free Radic Res* 48: 84-92.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S. 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 38: 17-23.
- Radley JJ, Sawchenko PE. 2011. A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 31: 9683-9695.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 49: 1603-1616.
- St-Pierre J, et al. 2006. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* 127: 397-408.
- Sumner BE, D'Eath RB, Farnworth MJ, Robson S, Russell JA, Lawrence AB, Jarvis S. 2008. Early weaning results in less active behaviour, accompanied by lower 5-HT1A and higher 5-HT2A receptor mRNA expression in specific brain regions of female pigs. *Psychoneuroendocrinology* 33: 1077-1092.
- Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A. 2009. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 2770-2775.
- van der Meulen J, Koopmans SJ, Dekker RA, Hoogendoorn A. 2010. Increasing weaning age of piglets from 4 to 7 weeks reduces stress, increases post-weaning feed intake but does not improve intestinal functionality. *Animal* 4: 1653-1661.
- Veenema AH, Neumann ID. 2009. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology* 34: 463-467.
- Wasinski F, et al. 2015. Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. *Nutr Metab (Lond)* 12: 56.
- WHO. 2009. Breastfeeding: a vital emergency response. Are you ready? <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383634/#R40>
- Yin J, Wu MM, Xiao H, Ren WK, Duan JL, Yang G, Li TJ, Yin YL. 2014. Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. *J Anim Sci* 92: 612-619.
- Zhu LH, Zhao KL, Chen XL, Xu JX. 2012. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *J Anim Sci* 90: 2581-2589.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental materno (A), e desenho experimental da prole (B).

Figura 2. Parâmetros de estado redox no hipocampo (A-C) e hipotálamo (D-E) da prole aos 30 dias de idade, nascidas de ratas sedentárias ou exercitadas durante a gestação, submetidas ao modelo de desmame controle ou precoce. Níveis de espécies reativas (A e D), superóxido mitocondrial (B e E), e níveis de peroxidação lipídica (C e F). Os dados estão expressos como média + erro padrão, e foram analisados por ANOVA de duas vias seguidos do pós-teste de Tukey. *, $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle; **, $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle.

Figura 3. Quantificação da massa e potencial de membrana mitocondrial no hipocampo (A-B) e hipotálamo (C-D) da prole aos 30 dias de idade, nascidas de ratas sedentárias ou exercitadas durante a gestação, submetidas ao modelo de desmame controle ou precoce. Massa mitocondrial (A e C) e potencial de membrana mitocondrial (B e D). Os dados estão expressos como média + erro padrão, e foram analisados por ANOVA de duas vias seguidos do pós-teste de Tukey. *, $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle; **, $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle.

FIGURA 1

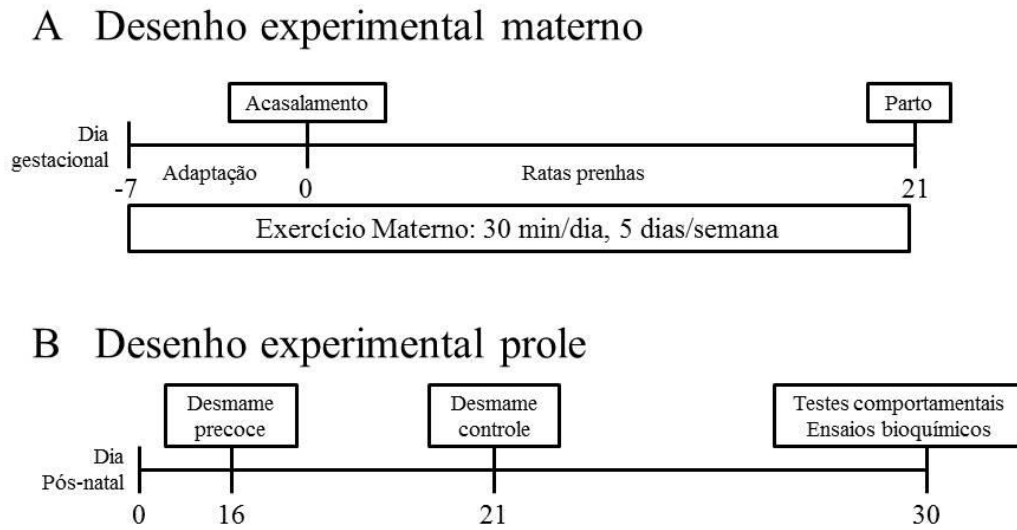


FIGURA 2

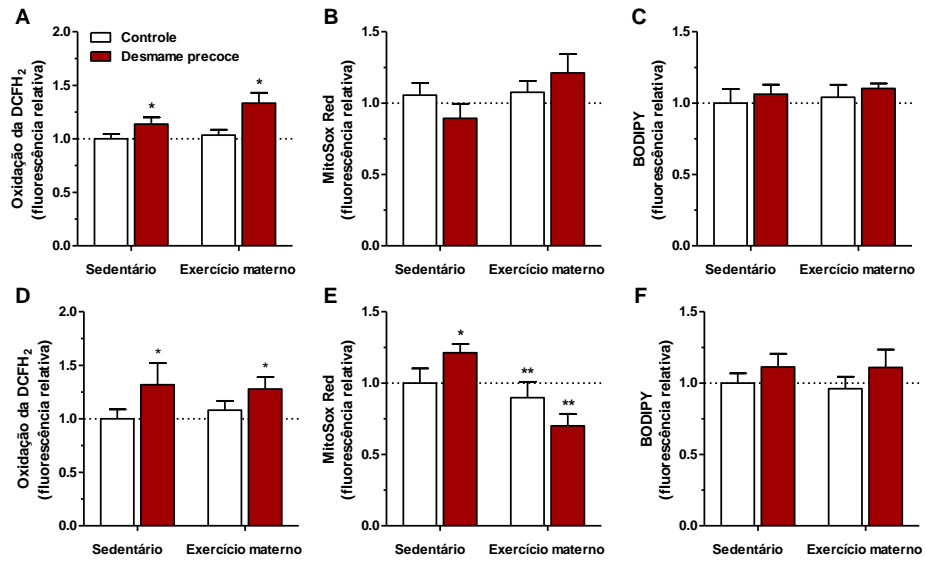
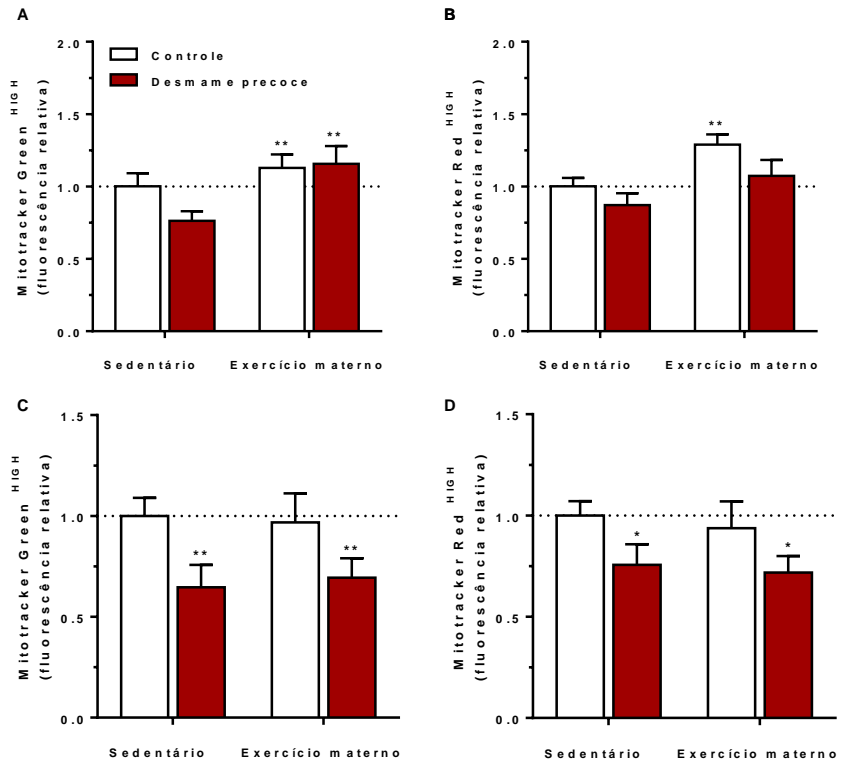


FIGURA 3



3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou que o desmame precoce e o exercício físico materno durante a gestação são capazes de promover alterações no estado redox e na função mitocondrial no hipocampo e hipotálamo da prole no PN30. Embora os resultados obtidos por esse estudo sejam preliminares, eles realçam a importância de maiores investigações nessa área de pesquisa.

Sabe-se que o desmame precoce aumenta a susceptibilidade a doenças, mas os mecanismos pelos quais ocorre a programação do metabolismo para tal desfecho ainda não estão esclarecidos. O desenvolvimento de diversas doenças está associado à programação do metabolismo em períodos críticos do desenvolvimento. Enquanto o exercício físico durante a gestação promove benefícios à saúde e resistência ao desenvolvimento de doenças na vida adulta, o desmame precoce induz alterações neuroendócrinas e comportamentais adversas.

O desequilíbrio do estado redox pode ser responsável pelo desencadeamento de processos patológicos, como doenças metabólicas, cardiovasculares e neurodegenerativas. Embora o sistema antioxidante não tenha sido avaliado no presente estudo, ele será alvo de investigações que estão em andamento pelo nosso grupo de pesquisa.

Visto que os estudos relacionados ao desmame precoce são incipientes, especialmente quanto às alterações no SNC, ainda há muito que ser investigado. Portanto, temos como perspectivas avaliar parâmetros celulares e moleculares que possam contribuir para o melhor entendimento dos efeitos que o desmame precoce causa no SNC, bem como avaliar o potencial da lactação materna em prevenir as alterações decorrentes do desmame precoce. Dentre os parâmetros celulares que se pretende analisar destacam-se: a expressão da neurotrofina BDNF, expressão dos marcadores pré- e pós-sináptico (sinaptofisina e PSD95, respectivamente), e expressão de NeuN e GFAP e CD11b. Uma vez que o desmame precoce é capaz de alterar o comportamento na idade adulta, pretende-se avaliar o comportamento da prole nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado, e teste de preferência a sacarose em animais com 30 e 60 dias de idade. Além disso, visto que fatores ambientais e o estilo de vida materno afetam diferencialmente filhotes machos e fêmeas, tem-se como perspectiva avaliar todos os parâmetros supracitados em ambos os sexos.

REFERÊNCIAS

- AGOSTI, M. et al. Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. **Pediatr Med Chir**, v. 39, n. 2, p. 157, 2017.
- AHOLA, M. K.; VAPALAHTI, K; LOHI, H. Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, artigo 10412, 2017.
- AISA, B. et al. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. **Neuroscience**, v. 154, 4, p. 1218-1226, 2008.
- 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, 2008.
- AKHAVAN, M. M. et al. Prenatal exposure to maternal voluntary exercise during pregnancy provides protection against mild chronic postnatal hypoxia in rat offspring. **Pak J Pharm Sci**, v. 25, n. 1, p. 233-238, 2012.
- ANDERSON, J. W.; JOHNSTONE B. M.; REMLEY D. T. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n. 4, p. 525-535, 1999.
- ARAÚJO, O. D. et al. Breastfeeding: factors that cause early weaning. **Rev Bras Enferm**, v. 61, n. 4, p. 488-492, 2008.
- BALE, T. L. et al. Early life programming and neurodevelopmental disorders. **Biol Psychiatry**, v. 68. n 4, p. 314-319, 2010.
- BALLARD, O.; MORROW A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin North Am**, v. 60, n. 1, p. 49-74, 2013.
- BASNAYAKE, S. D.; GREEN A. L.; PATERSON D. J. Mapping the central neurocircuitry that integrates the cardiovascular response to exercise in humans. **Exp Physiol**, v. 97 n. 1, p. 29-38, 2012.
- BETOKO, A., S. et al. Influence of infant feeding patterns over the first year of life on growth from birth to 5 years. **Pediatr Obes**, v.12, n. 1, p. 94-101, 2017.
- BLACK, J. E. et al. Environment and the aging brain. **Can J Psychol**, v. 41 n. 2, p.111-130, 1987.
- BROWN, A. Breastfeeding as a public health responsibility: a review of the evidence. **J Hum Nutr Diet**, v. 30, n.6 p. 759-770, 2017.
- CAI, H. et al. Effect of exercise on cognitive function in chronic disease patients: a meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. **Clin Interv Aging**, v. 12, p. 773-783, 2017.

CARLYLE, B. C. et al. Maternal separation with early weaning: a rodent model providing novel insights into neglect associated developmental deficits.

Dev Psychopathol, v. 24, n. 4, p. 1401-1416, 2012.

CLAPP, J. F. et al. Continuing regular exercise during pregnancy: effect of exercise volume on fetoplacental growth. **Am J Obstet Gynecol**, v. 186, n. 1, p. 142-147, 2002.

DAVIS, C. L. et al. Exercise improves executive function and achievement and alters brain activation in overweight children: a randomized, controlled trial. **Health Psychol**, v. 30, n. 1, p. 91-98, 2011.

DAYI, A. et al. Maternal aerobic exercise during pregnancy can increase spatial learning by affecting leptin expression on offspring's early and late period in life depending on gender.

The Scientific World Journal v. 2012, artigo 429803, 2012.

DOS SANTOS OLIVEIRA, L. et al. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. **Behav Processes**, v. 86, n. 1, p 75-80, 2011.

DUSTMAN, R. E. et al. Age and fitness effects on EEG, ERPs, visual sensitivity, and cognition. **Neurobiol Aging**, v. 11, n.3, p. 193-200, 1990.

ERICKSON, K. I. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 7, p. 3017-3022, 2011.

ESTEBAN-CORNEJO, I. et al. Early life programming of attention capacity in adolescents: The HELENA study. **Matern Child Nutr**. v. 14, n. 1, 2017.

FIDALGO, M., et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, v. 109, n. 3, p. 449-456, 2013.

FRAGA, M. C. et al. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. **Physiol Behav**, v. 124, n. 1, p. 100-106, 2014.

FRANCO, J. G. et al. Resveratrol prevents hyperleptinemia and central leptin resistance in adult rats programmed by early weaning. **Horm Metab Res**, v. 46, n. 10, p. 728-735, 2014.

FRANCO, J. G. et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning. **J Nutr Biochem**, v. 24 n. 6, p. 960-966, 2013.

GALTRY, J. Lactation and the labor market: breastfeeding, labor market changes, and public policy in the United States. **Health Care Women Int**, v. 18, n.5, p. 467-480, 1997

GARTNER, L. M. et al. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 129, n. 3, p. 0031-4005, 2005.

GRIESBACH, G. S. et al. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 129-139, 2004.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2007.

HAMILTON, G. F.; RHODES J. S. Exercise Regulation of Cognitive Function and Neuroplasticity in the Healthy and Diseased Brain **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 135, p. 381-406, 2015.

HERRING, A. et al. Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring **FASEB J**, v. 26, n. 1, p.117-128, 2012.

HICKS, L. H.; BIRREN, J. E. Aging, brain damage, and psychomotor slowing. **Psychol Bull**, v. 74 n. 6, p. 377-396, 1970.

HO, D. H., et al. Early life stress in male mice induces superoxide production and endothelial dysfunction in adulthood. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 310, n. 9 p. H1267-1274, 2016.

HORTA, B. L.; LORET DE MOLA, C.; VICTORA, C. G. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, v. 104 n. 467, p. 14-19, 2015.

HU, C. H. et al. Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. **J Anim Sci**, v, 91 n. 3, p. 1094-1101, 2013.

HUANG, Q. et al. Protective effects of leucine on redox status and mitochondrial-related gene abundance in the jejunum of intrauterine growth-retarded piglets during early weaning period. **Arch Anim Nutr**, v . 71, n. 2, p. 93-107, 2017.

HULSHOF, H. J. et al. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. **Behav Brain Res**, v. 216, n. 2, p. 552-560, 2011.

INTLEKOFER, K. A.; C. W. COTMAN. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, v. 57, p. 47-55, 2013.

ISHIKAWA, J.; ISHIKAWA A. The effects of voluntary running exercise coincidence with social isolation after early weaning on monoaminergic axonal development. **Neuroscience**, v. 230, p. 31-38, 2013.

ISHIKAWA, J.; NISHIMURA R.; ISHIKAWA A. Early-life stress induces anxiety-like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. **Eur J Neurosci**, v. 41, n. 4, p. 442-453, 2015.

ISHIKAWA, J. et al. Hyperlocomotor activity and stress vulnerability during adulthood induced by social isolation after early weaning are prevented by voluntary running exercise before normal weaning period. **Behav Brain Res**, v. 264: p. 197-206, 2014.

- KANARI, K. et al. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behav Brain Res**, v. 156, n. 1, p. 45-52, 2005.
- KATZ, V. L. Water exercise in pregnancy. **Semin Perinatol**, v. 20, n. 4, p. 285-291, 1996.
- KIKUSUI, T.; ICHIKAWA S.; MORI Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 5, p. 762-772, 2009.
- KIKUSUI, T. et al. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. **Behav Brain Res**, v. 175, n. 1, p. 96-103, 2006.
- KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. **Physiol Behav**, v. 81, n. 1, p. 37-42, 2004.
- KIM, J. I. et al. Breastfeeding is associated with enhanced learning abilities in school-aged children. **Child Adolesc Psychiatry Ment Health**, v. 11, n. 36, 2017.
- KNOTT, A. B. et al. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 7, p. 505-518, 2008.
- KODAMA, Y. et al. Effects of early weaning on anxiety and prefrontal cortical and hippocampal myelination in male and female Wistar rats. **Dev Psychobiol**, v. 50, n. 4, p. 332-342, 2008.
- KOLETZKO, B. Early nutrition and its later consequences: new opportunities. **Adv Exp Med Biol**, v. 569, p. 1-12, 2005.
- LEE, H. H. et al. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. **Brain Dev**, v. 28, n. 3, p. 147-154, 2006.
- LEGGET, K. T. et al. Exercise-related changes in between-network connectivity in overweight/obese adults. **Physiol Behav**, v. 158, p. 60-67, 2016.
- LIMA Nda, S. et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **Br J Nutr**, v. 105, n. 9, p. 1405-1413, 2011.
- LIMA, N. S. et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. **Horm Metab Res**, v. 45, n. 1, p. 22-30, 2013.
- LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 8, p. 799-806, 2000.
- LU, Z. et al. PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 7, p. 1011-1022, 2010.
- MANG, C. S. et al. Promoting Motor Cortical Plasticity with Acute Aerobic Exercise: A Role for Cerebellar Circuits. **Neural Plast**, v. 2016, artigo 6797928, 2016.

- MARAIS, L. et al. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. **Neurosci Res**, v. 61, n. 1, p. 106-112, 2008.
- MARCELINO, T. B., et al. Behavioral benefits of maternal swimming are counteracted by neonatal hypoxia-ischemia in the offspring. **Behav Brain Res**, v. 312, p. 30-38, 2016.
- 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, 2013.
- MARQUES-ALEIXO, I. et al. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. **Prog Neurobiol**, v. 99, n. 2, p. 149-162, 2012.
- MATHUR, N. B.; DHINGRA D. Breastfeeding. **Indian J Pediatr**, v. 81, n. 2, p. 143-149, 2014.
- McFARLAND, R. Experimental evidence of the relationship between aging and oxygen want: In search of a theory of aging. **Ergonomics**, v. 6, n. 4, 339-366, 1963.
- MIRESCU, C.; PETERS J. D.; GOULD E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 8, p. 841-846, 2004.
- MOGI, K. et al. Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. **Dev Psychobiol**, v. 58, n. 8, p. 1034-1042, 2016.
- MUELLER, K. et al. Physical exercise in overweight to obese individuals induces metabolic- and neurotrophic-related structural brain plasticity. **Front Hum Neurosci**, v. 9, n. 372, 2015.
- NAGAMATSU, L. S. et al. Exercise Mode Moderates the Relationship Between Mobility and Basal Ganglia Volume in Healthy Older Adults. **J Am Geriatr Soc** v. 64, n.1, p. 102-108, 2016.
- NAKAMURA, K. et al. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. **Behav Brain Res**, v.187, n. 2, p. 442-448, 2008.
- NASCIMENTO, C. M. et al. Physical exercise in MCI elderly promotes reduction of pro-inflammatory cytokines and improvements on cognition and BDNF peripheral levels. **Curr Alzheimer Res**, v.11, n.8, p. 799-805, 2014.
- NEEPER, S. A. et al. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res**, v. 726, n. 1-2 49-56, 1996.
- OLIFF, H. S. et al. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 61, n. 1-2, p. 147-153, 1998.
- PARK, J. W. et al. Maternal exercise during pregnancy affects mitochondrial enzymatic activity and biogenesis in offspring brain. **Int J Neurosci**, v. 123, n. 4, p. 253-264, 2013.

PARK, S. et al. Protective effect of breastfeeding with regard to children's behavioral and cognitive problems. **Nutr J**, v. 13, n. 1, p. 111, 2014.

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

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Ann Nutr Metab**, v. 58 n. 2, p. 18-28, 2011.

PI, J. et al. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 244, n. 1, 77-83, 2010.

PLOTSKY, P. M.; M. J. MEANEY. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 18, n. 3, p. 195-200, 1993.

POLETTI, R. et al. Effects of early weaning and social isolation on the expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of piglets. **Brain Res**, v. 1067, n. 1, p. 36-42, 2006.

PRAKASH, R. S. et al. Aerobic fitness is associated with gray matter volume and white matter integrity in multiple sclerosis. **Brain Res**. v. 1341, p. 41-51, 2010.

PYSH, J. J.; WEISS G. M. Exercise during development induces an increase in Purkinje cell dendritic tree size. **Science**, v. 206, n. 4415, p. 230-232, 1979.

QUITETE, F. T. et al. Anti-obesogenic effects of calcium prevent changes in the GLP-1 profile in adult rats primed by early weaning. **Mol Nutr Food Res**. v. 59, n. 4, p. 773-783, 2015.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2 153-159, 2008.

RADAK, Z. et al. Exercise, oxidative stress and hormesis. **Ageing Res Rev**, v. 7, n. 1, p. 34-42, 2008.

RADAK, Z. et al. The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. **Free Radic Res**, v. 48, n. 1, p. 84-92, 2014.

RADAK, Z. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochem Int**, v.38, n. 1, p. 17-23, 2001.

RADAK, Z. et al. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. **Free Radic Biol Med**, v. 98, p. 187-196, 2016.

RADLEY, J. J.; SAWCHENKO, P. E. A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. **J Neurosci**, v. 31, n. 26, p. 9683-9695, 2011.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

- ROCERI, M., F. et al. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 708-714, 2004.
- SANTANA, G. S. et al. Factors associated with breastfeeding maintenance for 12 months or more: a systematic review. **J Pediatr (Rio J)**, 2017.
- SCARPULLA, R. C., Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 7, p. 1269-1278, 2011.
- SCHINDER, A. F.; POO, M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. **Trends Neurosci** v. 23, n. 12, p. 639-645, 2000.
- ST-PIERRE, J., et al. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 397-408, 2006.
- STONE, V. et al. Swimming exercise enhances the hippocampal antioxidant status of female Wistar rats. **Redox Rep**, v. 20, p. 133-138, 2015.
- SUMNER, B. E. et al. Early weaning results in less active behaviour, accompanied by lower 5-HT1A and higher 5-HT2A receptor mRNA expression in specific brain regions of female pigs. **Psychoneuroendocrinology**, v. 3, n.8, p. 1077-1092, 2008.
- SUO, C., et al. Therapeutically relevant structural and functional mechanisms triggered by physical and cognitive exercise. **Mol Psychiatry**, v. 21, n. 11, p. 1633-1642, 2016.
- TAL, M. C., et al. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 8, p. 2770-2775, 2009.
- VAN DER MEULEN, J. et al. Increasing weaning age of piglets from 4 to 7 weeks reduces stress, increases post-weaning feed intake but does not improve intestinal functionality. **Animal**, v. 4, n. 10, p. 1653-1661, 2010.
- VAN HOOMISSEN, J. D. et al. Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. **Brain Res**, v. 974, n. 1-2, p. 228-235, 2003.
- VEENEMA, A. H.; NEUMANN, I. D. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 3, p. 463-467, 2009.
- VICTORA, C. G. et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. **Lancet**, v. 387, n. 10017, p. 475-490, 2016.
- VINA, J. et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. **Adv Drug Deliv Rev** v. 61, n. 14, p. 1369-1374, 2009.
- WASINSKI, F. et al. Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. **Nutr Metab (Lond)**, v. 12, n. 56, 2015.
- WHO. Breastfeeding: a vital emergency response. Are you ready?, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383634/#R40>, 2009.

Yin, J. et al. Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. **J Anim Sci**, v. 92, n. 2, p. 612-619, 2014.

YU, F., et al. Effects of aerobic exercise on cognition and hippocampal volume in Alzheimer's disease: study protocol of a randomized controlled trial (The FIT-AD trial). **Trials**, v. 15, n. 394, 2014.

ZHU, L. H. et al. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. **J Anim Sci**, v. 90, n. 8, p. 2581-2589, 2012.

ANEXO A – CARTA DE ACEITE DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UFRGS
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: 33532

Título: INVESTIGACAO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCICIO FISICO MATERNO SOBRE POSSIVEIS ALTERACOES CELULARES NO ENCEFALO DA PROLE EM UM MODELO DE DESMAME PRECOCE

Vigência: 01/08/2017 à 01/07/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO - coordenador desde 01/08/2017
CRISTIANE MATTE - pesquisador desde 01/08/2017
KAROLINE DOS SANTOS RODRIGUES - Aluno de Especialização desde 01/08/2017
Caroline Peres Klein - Aluno de Doutorado desde 01/08/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 11/09/2017 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 145 ratos Wistar adultos machos, com peso aproximado de 250 g (utilizados para o acasalamento), 290 fêmeas adultas (ratas adultas) e 384 filhotes, provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica da 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, Segunda-Feira, 4 de Dezembro de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BRASILEIRA DE BIOCIÊNCIAS

Diretrizes para Autores

Arquivo contendo as Diretrizes para os Autores, em formato Adobe PDF, pode ser obtido aqui. Leia as normas para submissão com a máxima atenção. Documentos submetidos fora das normas não poderão ser avaliados e, aos autores, será solicitada a sua correção, sob pena de arquivamento.

O documento principal da submissão deverá ser criado com o uso do modelo disponível em http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/public/modelo_principal.doc. Siga o estilo de fontes e parágrafos presentes nesse modelo.

Para submissões em língua inglesa, as quais serão priorizadas para publicação, a Revista Brasileira de Biociências exige que, se aprovados para publicação, os manuscritos passem sob nova e criteriosa revisão do texto final para publicação, a encargo dos autores. O serviço de revisão dos textos em inglês será feito por profissional designado pela Revista Brasileira de Biociências e será pago diretamente aos responsáveis pelo serviço, pelos autores. Mesmo que a versão inicial do manuscrito para avaliação tenha passado por revisão de especialista na língua inglesa, ainda assim a versão final de um manuscrito aceito deverá passar por nova revisão.

PREPARANDO OS ARQUIVOS

Os textos deverão ser formatados em uma coluna, usando a fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo e todas as margens com uma polegada (2,54 cm), em formato de papel A4. Todas as páginas devem ser numeradas sequencialmente. Não numere as linhas. O manuscrito deverá estar em formato Microsoft® Word DOC (versão 2 ou superior). Arquivos em formato RTF também serão aceitos. Não submeta arquivos em formato Adobe® PDF. O arquivo que contém o texto principal do manuscrito não deverá incluir qualquer tipo de figura ou tabela. Estas deverão ser submetidas como documentos suplementares, separadamente. Ao submeter um manuscrito, o autor responsável pela submissão deverá optar por uma das seguintes seções: ‘Artigo completo’, ‘Revisão’ ou ‘Nota científica’. Todos os manuscritos submetidos no envio on-line deverão subdivididos em DOCUMENTO PRINCIPAL e DOCUMENTO(S) SUPLEMENTAR(ES).

DOCUMENTO PRINCIPAL

Primeira página. Deverá conter as seguintes informações:

- a) Título do trabalho, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações;
- b) Nome completo e por extenso do(s) autor(es), com iniciais em maiúsculo;
- c) Título resumido do trabalho, com até 75 caracteres (incluindo espaços);
- d) afiliações e endereço completo de todos os autores (instituição financiadora (auxílio ou bolsas), deverá constar nos Agradecimentos);
- e) Identificação do autor para contato e respectivo e-mail (apenas o autor para contato deverá fornecer um e-mail).

Segunda página. Deverá conter as seguintes informações:

- a) Resumo: incluir o título do trabalho em português (entre parênteses), quando o trabalho for escrito em inglês;
- b) Abstract: incluir o título do trabalho em inglês (entre parênteses). Tanto Resumo como o Abstract deverão conter, no máximo, 250 (duzentos e cinquenta) palavras, estruturados em apresentação, contendo o contexto e proposta do estudo, resultados e conclusões (por favor, omita os títulos);
- c) Palavras-chave e key words para indexação: no máximo cinco, não devendo incluir palavras do título.

Páginas subsequentes. ‘Artigos completos’ e ‘Notas científicas’ deverão estar estruturados em Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (Resultados e Discussão podendo ser reunidos), Agradecimentos e Referências, seguidos de uma lista completa das legendas das figuras e tabelas (submetidos como documentos suplementares).

Os nomes científicos, incluindo os gêneros e categorias infragenéricas, deverão estar em itálico. As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Escrever os números até dez por extenso, a menos que sejam seguidos de unidade de medida, ou indiquem numeração de figuras e tabelas. Utilize um espaço para separar as unidades de medidas dos valores (10 m, por exemplo; não use 10m). A unidade de temperatura em graus Celsius deve ser escrita com um espaçamento entre o valor numérico (23 oC, por exemplo; não use 23oC). A posição preferencial de cada figura ou tabela não deverá ser indicada no texto. Isso ficará a critério do editor, durante a editoração. Sempre verifique que as figuras e tabelas estejam citadas no texto. No texto, use abreviaturas (Fig. 1 e Tab. 1, por exemplo). Evitar notas de rodapé. Se necessárias, utilizar numeração arábica em sequência.

As citações de autores no texto deverá seguir os seguintes exemplos: Baptista (1977), Souza & Barcelos (1990), Porto et al. (1979) e (Smith 1990, Santos et al. 1995). Citar o(s) autor(es) das espécies só a primeira vez em que as mesmas forem referidas no texto. Citações de resumos de simpósios, encontros ou congressos deverão ser evitadas. Use-as somente se for absolutamente necessário. Comunicações pessoais não deverão ser incluídas na lista de Referências, mas poderão ser citadas no texto. A obtenção da permissão para citar comunicações pessoais e dados não publicados é de exclusiva responsabilidade dos autores. Abreviatura de periódicos científicos deverá seguir o Index Medicus/MEDLINE. Citações, nas Referências, deverão conter todos os nomes dos autores (não use et al.)

As referências deverão seguir rigorosamente (sob pena de arquivamento da submissão) os seguintes exemplos (respeitar espaçamentos e uso do itálico, por favor):

Artigos publicados em periódicos:

BONGERS, F., POPMA, J., MEAVE, J. & CARABIAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

QUADRA, A. A. & AMÂNCIO, A. A. 1978. A formação de recursos humanos para a saúde. *Ciência e Cultura*, 30(12): 1422-1426.

ZANIN, A., MUJICA-SALLES, J. & LONGHI-WAGNER, H. M. 1992. Gramineae: Tribo Stipeae. *Boletim do Instituto de Biociências*, 51: 1-174. (*Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul*, 22).

Livros publicado por editoras:

CLEMENT, S. & SHELFORD, V. E. 1960. Bio-ecology: an introduction. 2nd ed. New York: J. Willey. 425 p.

LOWE-MCCONNEL, R.H. 1987. Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge: Cambridge University Press. 382 p.

Capítulos de livro:

CEULEMANS, R. & SAUGIER, B. 1993. Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A. S. (Ed.). Physiology of Trees. New York: John Wiley & Sons. p. 21-50.

NAKATANI, K., BAUMGARTNER, G. & CAVICCHIOLI, M. 1997. Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: VAZZOLER, A. E. A. M., AGOSTINHO A. A. & HAHN, N. S. (Eds.). A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá: EDUEM. p. 281-306.

Anais de encontros, congressos, etc.:

CARNEIRO, F. G. 1997. Numerais em esfero-cristais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49., 1997, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Ed. da UFMG. 1 CD-ROM.

SANTOS, R. P. & MARIATH, J. E. A. 2000. Embriologia de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: estudo da antera e grão de pólen e sua aplicação no melhoramento. In: WINGE, H. (Org.). CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS e REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Encantado, RS. Anais... Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO. p. 140-142.

Dissertações de mestrado, doutorado:

DILLENBURG, L. R. 1986. Estudo fitossociológico do estrato arbóreo da mata arenosa de restinga em Emboaba, RS. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

Links de páginas disponíveis na Internet:

POLÍTICA. 1998. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática. Disponível em: <http://www.priberam.pt/Dicionarios/dlp.htm>>. Acesso em: 8 mar. 1999.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. 2012. Disponível em:<<http://www.ipni.org>>. Acesso em: 26 ago. 2012. Para documentos com DOI® (Digital Object Identifier) conhecido, seguir o exemplo abaixo (não usar “Disponível em:<....>Acesso em:....”):

SANTOS, R.P., MARIATH, J.E.A. & HESSE, M. 2003. Pollenkit formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). Plant Syst. Evol., 237: 185-198.<<http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0257-2>>

Em trabalhos de taxonomia vegetal e florística, as seguintes normas específicas deverão ser observadas:

1. Chaves de identificação: dicotômicas, indentadas, utilizando alternativas 1-1'. Os táxons devem ser numerados em ordem alfabética, dentro de sua categoria taxonômica e na ordem em que aparecerão no texto.

2. As descrições devem ser sucintas e uniformes.

3. Autores de nomes científicos devem ser citados de forma abreviada, de acordo com Brummit & Powell (1992).

4. Citações e abreviaturas das Opus Princeps devem seguir Stafleu et al. (1976-1988). No caso de periódicos, seguir Bridson & Smith (1991). Como alternativa, seguir o International Plant Names Index (IPNI - <http://www.ipni.org/index.html>), onde as citações seguem as obras mencionadas acima.

5. Índice de nomes científicos citados no manuscrito: no caso de monografias, o índice deve relacionar, em ordem alfabética, os táxons abaixo do nível de gênero, sem os autores, colocando em negrito a página onde inicia a descrição do táxon. Os nomes válidos devem ser citados em letra normal e os sinônimos em itálico.

6. Incluir a lista de exsicatas apresentadas no manuscrito:

Schultz, A. : 12 (2.8-ICN), 25 (2.9-BLA, ICN)

12 e 25=números do coletor.

2.8=2 número do gênero e 8 número da espécie, no trabalho.

ICN=sigla do herbário onde está depositado o espécime citado.

Caso o trabalho trate apenas de um gênero:

Schultz, A. : 110 (3-ICN)

3=número da espécie.

No caso de dois ou mais coletores, citar apenas o primeiro.

Se o coletor não tiver número de coleta:

Barreto, I. L. : BLA 1325 (número do gênero e espécie, ou só o número da espécie).

7. Material examinado: deverá ser citado apenas material selecionado, um exemplar por município. Se a relação de material selecionado for muito extensa (ou se o autor não julgar necessário), citar todos os municípios. De modo a demonstrar a distribuição geográfica do táxon e não ultrapassar o número de páginas previstas, deverão ser citados apenas um ou poucos exemplares por região fisiográfica (Fortes 1959). Quando forem dois coletores usar o &. Mais de dois coletores, citar o primeiro e usar o et al. Países, estados, municípios e localidades devem ser citados em ordem alfabética.

Exemplos:BRASIL. RIO GRANDE DO SUL: Torres, 23 maio 1975, L.R. Dillenburg 17 (ICN);

Tupanciretã, 8 jul. 1977, L.R.M. Baptista et al. 911 (ICN); Uruguaiana, 25 mar. 1978; M.L. Porto s.n. (ICN 2530);

Vacaria, 1 abr. 1975, B. Irgang & P. Oliveira 45 (BLA, ICN).

Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul:

1. *Lupinus albescens* Hook. & Arn., Bot. Misc. 3: 201. 1833 (Fig. 1).

Sinonímia (citar o basônimo, quando for o caso. Citar outros sinônimos somente quando for estritamente necessário para o conhecimento do táxon na área estudada).

Descrição: baseada em material do Rio Grande do Sul, em dois parágrafos, vegetativo e reprodutivo.

Distribuição geográfica: geral e no Rio Grande do Sul, esta última utilizando as regiões fisiográficas de Fortes (1959). Não devem ser utilizados mapas com pontos de coleta no Rio Grande do Sul.

Habitat:

Observações:

Material selecionado: citar somente material do Rio Grande do Sul. Se necessário, por deficiência deste material, citar “material adicional examinado” de outras regiões.

DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

Figuras. Todas as imagens (ilustrações, fotografias, fotomicrografias, eletromicrografias e gráficos) são consideradas ‘figuras’. Figuras e tabelas devem ser fornecidos como arquivos separados (documentos suplementares), nunca incluídos no texto do documento principal. Figuras coloridas serão permitidas e os editores estimulam que os autores assim o façam. Não haverá cobrança de custos adicionais para figuras a cores, já que a impressão das mesmas (quando houver) será sempre feita em preto e branco. A Revista Brasileira de Biociências não aceitará figuras submetidas no formato GIF ou comprimidas em arquivos do tipo RAR ou ZIP. Se as figuras no formato TIFF são um obstáculo para os autores, por seu tamanho muito elevado, os autores podem convertê-las para o formato JPEG, antes da sua submissão, resultando em uma significativa redução no tamanho. Entretanto, não se esqueça que a compressão no formato JPEG pode causar prejuízos na qualidade das imagens. Assim, é recomendado que os arquivos JPEG sejam salvos nas qualidades ‘Alta’ (High) ou ‘Máxima’ (Maximum). Não forneça imagens em arquivos Microsoft® PowerPoint (geralmente geradas com baixa resolução), nem embebidas em arquivos do Microsoft Word (DOC). Arquivos contendo imagens em formato Adobe® PDF também não serão aceitos. A submissão será arquivada se conter figuras em arquivos DOC, PDF ou PPT. Cada figura deverá ser editada para minimizar as áreas de espaços em branco, otimizando o tamanho final da ilustração. Se a figura consiste de diversas partes separadas, é importante que uma simples figura seja submetida, contendo todas as partes da figura. Escalas das figuras deverão ser fornecidas com os valores apropriados e devem fazer parte da própria figura (inseridas com o uso de um editor de imagens, como o Adobe® Photoshop, por exemplo), sendo posicionadas no canto inferior esquerdo de cada figura. Ilustrações em preto e branco deverão ser fornecidas com aproximadamente 300 dpi de resolução, em formato TIFF ou JPG. Para fotografias (em preto e branco ou coloridas), fotomicrografias ou eletromicrografias, forneça imagens em TIFF ou JPG, com pelo menos, 300 dpi.

ATENÇÃO! Como na editoração final dos manuscritos o tamanho útil destinado a uma figura de largura de página (duas colunas) é de 170 mm, para uma resolução de 300 dpi, a largura mínima das figuras deve ser 2000 pixels. Para figuras de uma coluna (82 mm de largura), a largura mínima das figuras (para 300 dpi), deve ser pelo menos 1000 pixels.

Submissões de figuras fora destas características acima (larguras mínimas em pixels) serão imediatamente arquivadas. As imagens que não contêm cor devem ser salvas como ‘grayscale’, sem qualquer tipo de camada (‘layer’), como as geradas no Adobe® Photoshop, por exemplo (estes arquivos ocupam até 10 vezes mais espaço que os arquivos TIFF e JPG). Os tipos de fontes nos textos das figuras deverão ser Arial ou Helvetica. Textos deverão ser legíveis. Abreviaturas nas figuras (sempre em minúsculas) devem ser citadas nas legendas e fazer parte da própria figura, inseridas com o uso de um editor de imagens (Adobe® Photoshop, por exemplo). Não use abreviaturas, escalas ou sinais (setas, asteriscos), sobre as figuras, como “caixas de texto” do Microsoft® Word. Recomenda-se a criação de uma única estampa, contendo várias figuras reunidas, numa largura máxima de 170 milímetros (duas colunas) e altura máxima de 257 mm (página inteira). A letra indicadora de cada figura deve estar posicionada no canto inferior direito. Inclua “A” e “B” (sempre em maiúsculas, não “a”, “b”) para distingui-las colocando, na legenda, Fig. 1A, Fig. 1B, e assim por diante. Não envie figuras com legendas inseridas na base das mesmas. As legendas das figuras deverão ser enviadas no final do documento principal, imediatamente após as Referências. Não use bordas de qualquer tipo ao redor das figuras. Se houver composição de figuras (Figs 1A, 1B, etc.), use cerca de 1 mm (12 pixels para uma figura com largura de 2000 pixels) de espaço em branco entre cada figura. É responsabilidade dos autores obter a permissão para reproduzir figuras ou tabelas que tenham sido previamente publicadas.

Para cada figura, deverão ser fornecidas as seguintes informações: número da figura (em ordem numérica, usando algarismos arábicos (Figura 1, por exemplo; não abrevie) e a legenda detalhada, com até 300 caracteres (incluindo espaços).

Tabelas. Cada tabela deverá ser numerada sequencialmente, com números arábicos (Tabela 1, 2, 3, etc; não abrevie). O título das tabelas deverá estar acima das mesmas. Tabelas deverão ser formatadas usando as ferramentas de criação de tabelas (‘Tabela’) do Microsoft® Word. Colunas e linhas da tabela devem ser visíveis, optando-se por usar linhas pretas que serão removidas no processo de edição final. Não utilize padrões, tons de cinza, nem qualquer tipo de cor nas tabelas. Dados mais extensos podem ser enviados como arquivos suplementares, mas que não estarão disponíveis no próprio artigo, mas como links para consulta pelo público.