

PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
MESTRADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

CAROLINA LUFT

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ANTES DO PERÍODO GESTACIONAL
SOBRE AS ALTERAÇÕES DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL EM
CAMUNDONGOS ADULTOS ESTRESSADOS NO PERÍODO PRÉ-NATAL**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

CAROLINA LUFT

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ANTES DO PERÍODO
GESTACIONAL SOBRE AS ALTERAÇÕES DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-
ADRENAL EM CAMUNDONGOS ADULTOS ESTRESSADOS NO PERÍODO PRÉ-
NATAL**

Porto Alegre, 2017

CAROLINA LUFT

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ANTES DO PERÍODO
GESTACIONAL SOBRE AS ALTERAÇÕES DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-
ADRENAL EM CAMUNDONGOS ADULTOS ESTRESSADOS NO PERÍODO PRÉ-
NATAL**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da PUCRS para
obtenção de título de Mestre em
Medicina/Pediatria.

Orientador: Márcio Vinícius Fagundes Donadio

Porto Alegre, 2017

Ficha Catalográfica

L949a Luft, Carolina

Avaliação dos efeitos do exercício físico antes do período gestacional sobre as alterações do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em camundongos adultos estressados no período pré-natal / Carolina Luft . – 2017.

80 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Vinícius Fagundes Donadio.

1. Estresse pré-natal. 2. Exercício Físico. 3. Eixo HPA. 4. Esteira. I. Fagundes Donadio, Márcio Vinícius. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CAROLINA LUFT

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ANTES DO PERÍODO
GESTACIONAL SOBRE AS ALTERAÇÕES DO EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-
ADRENAL EM CAMUNDONGOS ADULTOS ESTRESSADOS NO PERÍODO PRÉ-
NATAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Medicina/Pediatria e Saúde da Criança da Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de
Mestre em Saúde da Criança

Aprovado em: março de 2017

BANCA EXAMINADORA

Dr. Humberto Holmer Fiori (PUCRS)

Dra. Sara Cristina Sagae Schneider (Unioeste)

“É preciso força para sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”.

(Los Hermanos)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família, em especial aos meus pais por sempre estarem ao meu lado me apoiando, compreendendo e me incentivando.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Márcio Donadio, pelos anos de aprendizado, paciência, orientação e, acima de tudo, por ter despertado em mim o amor pela pesquisa.

Agradeço ao professor Dr. Jarbas de Oliveira, por ter aberto as portas do seu laboratório desde a minha iniciação científica e ter me proporcionado muitas oportunidades e conhecimento.

Às minhas amigas Isadora Levices e Bianca Martha, muito obrigada por terem sido meu braço direito.

Às minhas colegas Gêssica Antunes, Josiane Silveira, Aline Cunha e Nailê Nuñez, o meu muito obrigada por sempre estarem ao meu lado, ajudando nos experimentos, dividindo conhecimentos e sendo grandes amigas. Vocês foram essências.

Muito obrigada ao meu grande amigo e companheiro de pesquisa, Leonardo Pedrazza. Sem a tua parceria, essa caminhada seria mais difícil.

À amiga e colega, Krist Helen Antunes, muito obrigada por todo auxílio com nas técnicas de biologia molecular.

Agradeço aos alunos do grupo GNCD, coordenado pelo professor Dr. Rodrigo Grassi, pela ajuda com os comportamentos e pela troca de conhecimentos.

A todos os meus amigos, obrigada pela compreensão nos meus momentos de ausência e por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço a CAPES e CNPq pelo suporte financeiro, possibilitando que esta pesquisa pudesse ser realizada.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Potenciais ameaças para a homeostasia podem ocorrer durante a vida *in utero*, promovendo efeitos de programação tanto no desenvolvimento neurológico quanto na função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). O eixo HPA é o centro controlador e regulador do organismo que conecta o sistema nervoso central com o sistema hormonal. Este eixo responde ao estímulo estressor e auxilia o organismo a manter a homeostasia, além de ser essencial para auxiliar no funcionamento fisiológico normal. Indivíduos fisicamente aptos e que praticam frequentemente atividades físicas exibem um menor índice de problemas de saúde, especialmente quando se deparam com situações de estresse, contribuindo na redução dos níveis de ansiedade e depressão.

OBJETIVO: Avaliar os efeitos do exercício físico antes do período gestacional sobre alterações decorrentes do estresse pré-natal em camundongos adultos.

METODOLOGIA: Fêmeas e machos Balb/c foram divididos em três grupos: controle (CTLE), estresse pré-natal por contenção (PNS) e exercício físico antes do período gestacional e estresse pré-natal por contenção (EX+PNS). O peso dos animais foi avaliado durante a gestação, e nos dias 1, 10 e 21 de vida e na vida adulta. Esses animais foram mantidos até a idade adulta (60 dias de vida) quando foram avaliados os comportamentos de medo/ansiedade, no aparato de labirinto em cruz elevada, e depressão, por meio do teste de preferência e ingestão de sacarose. Além disso, foi avaliada a expressão gênica, através da técnica de PCR em tempo real, do receptor tipo 1 do hormônio liberador de corticotrofina (CRHR1) no córtex pré-frontal, do receptor de glicocorticoide (GR) e do receptor de mineralocorticoide (MR) no hipocampo e as concentrações plasmáticas de corticosterona foram avaliadas.

RESULTADOS: Durante a gestação, as fêmeas do grupo EX+PNS apresentaram maior peso em relação ao grupo CTLE. Em relação ao peso da prole, os animais do grupo EX+PNS exibiram um aumento no peso nos dias 1, 10 e 21 de vida, comparados com o grupo PNS. Durante a vida adulta, os animais estressados no período pré-natal apresentaram menor peso, enquanto o exercício pré-gestacional promoveu um aumento no peso da prole, em relação ao grupo CTLE. Em relação aos testes comportamentais, houve uma diminuição significativa no tempo gasto no braço aberto do aparato de labirinto em cruz elevada nos animais dos grupos PNS e EX+PNS, em

ambos os sexos, demonstrando um aumento no comportamento de medo/ansiedade. O estresse pré-natal aumentou a preferência por sacarose em fêmeas e a ingestão de sacarose em ambos os sexos. No entanto, o exercício promoveu uma diminuição significativa na ingestão de sacarose, em machos e fêmeas. A expressão de CRHR1 diminuiu no córtex pré-frontal de fêmeas do grupo EX+PNS em relação ao grupo PNS. Por outro lado, o exercício antes da gestação não foi capaz de reverter a diminuição significativa nas concentrações basais de GR provocadas pelo estresse pré-natal em fêmeas adultas. Não houve diferenças significativas entre os grupos na expressão gênica de GR em machos e de MR e corticosterona em fêmeas e machos.

CONCLUSÃO: O exercício físico em esteira antes do período gestacional parece ser capaz de reduzir os efeitos do estresse pré-natal em marcadores importantes da resposta do eixo HPA de uma maneira dependente do sexo.

Palavras-chave: Estresse pré-natal. Eixo HPA. Exercício físico. Esteira.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Potential threats to homeostasis may occur during the *in utero* period, promoting programming effects on both neurological development and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function. The HPA axis acts as a control and regulatory center of the body that connects the central nervous system to the hormonal system. The axis responds to the stressor stimulus and assists the body to maintain homeostasis, as well as being essential to the normal regulatory physiological functioning. Physically fit and physically active individuals exhibit a lower rate of health problems, especially when faced with stressful situations, contributing to reduced levels of anxiety and depression.

OBJECTIVE: To evaluate the effects of physical exercise before the gestational period on changes due to prenatal stress in adult mice.

METHODS: Balb/c female and male mice were divided into three groups: control (CTLE), prenatal restraint stress (PNS) and physical exercise before the gestational period and prenatal restraint stress (EX+PNS). The weight of the animals was evaluated during gestation, days 1, 10 and 21 of life and also as adults. Animals were then maintained until adulthood (60 days of life) when fear/anxiety behaviors were evaluated in the elevated plus maze, and depression was evaluated using the preference for sucrose and the ingestion of sucrose test. In addition, real-time PCR gene expression of corticotrophin releasing hormone (CRHR1) type 1 receptor in the prefrontal cortex, glucocorticoid receptor (GR) and mineralocorticoid (MR) receptor in the hippocampus, as well as plasmatic concentrations of corticosterone were evaluated.

RESULTS: During gestation, females of the EX+PNS group presented greater weight in relation to the CTLE group. Regarding the offspring weight, animals of the EX+PNS group showed an increase in weight on days 1, 10 and 21 of life, compared to the PNS group. During the adult life, animals stressed in the prenatal period presented lower weight, while the pregestational exercise promoted an increase in the offspring weight in relation to the CTLE group. In relation to behavioral tests, there was a significant decrease in the time spent in the open arms of the elevated plus maze in the PNS and EX+PNS groups, in both sexes, demonstrating an increase in fear/anxiety behavior. Prenatal stress increased the preference for sucrose in females and sucrose intake in

both sexes. However, exercise promoted a significant decrease in sucrose intake in males and females. CRHR1 expression decreased in the prefrontal cortex of EX+PNS females compared to the PNS group. On the other hand, pregestational exercise was not able to reverse the significant decrease in basal GR concentrations caused by prenatal stress in adult females. There were no significant differences between groups in GR gene expression in males, as well as in MR and corticosterone in both females and males.

CONCLUSION: Physical exercise on the treadmill before the gestational period seems to be able to reduce the effects of prenatal stress on important markers of the HPA axis response in a sex-dependent manner.

Keywords: Prenatal stress. HPA axis. Physical exercise. Treadmill.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.....	19
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEMBE	Centro de modelos biológicos experimentais
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CRHR1	Receptor tipo 1 do hormônio liberador de corticotrofina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GR	Receptor de glicocorticoide
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HSD	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase
IPB	Instituto de pesquisas biomédicas
MR	Receptor de mineralocorticoide
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
TMB	Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Estresse.....	18
2.2 Estresse pré-natal.....	20
2.3 Exercício Físico	23
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral.....	26
4.2 Objetivos específicos	26
5. HIPÓTESES	27
6. MÉTODOS	28
6.1 Animais.....	28
6.2 Desenho Experimental.....	28
6.2.1 Resumo do Desenho Experimental	30
6.3 Procedimentos e Técnicas.....	32
6.3.1 Modelo de Estresse por Contenção.....	32
6.3.2 Estresse Pré-Natal.....	32
6.3.3 Modelo de Exercício Físico	32
6.3.4 Testes Comportamentais.....	33
6.3.4.1 Labirinto em Cruz Elevada.....	33
6.3.4.2 Consumo de Sacarose	33
6.3.5 Resposta ao estresse na vida adulta.....	34
6.3.6 Eutanásia.....	34
6.3.7 Armazenamento das Amostras.....	34
6.3.8 Corticosterona	34

6.3.9 Expressão Gênica	35
6.4 Análise Estatística.....	36
7. CONCLUSÕES	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CARTA DE APROVAÇÃO CEUA	46

1. INTRODUÇÃO

Cerca de metade da população mundial é atingida por sintomas de depressão, problemas de ansiedade ou outras doenças mentais em algum momento da vida. As causas destas doenças são pouco conhecidas, contudo diversos estudos sugerem que isto pode ser influenciado por eventos estressores ocorridos durante a gestação.^[1] Cerca de 6% das mulheres grávidas reportam altos níveis de estresse psicológico durante a gestação, os quais resultam de diversas condições como depressão, pânico ou violência doméstica.^[2] Além disso, estudos epidemiológicos realizados com humanos demonstraram que filhos de mães estressadas durante o período gestacional exibem comportamento mais ansioso, possuindo maior risco de desenvolver alterações de conduta e déficit de atenção.^[3]

Potenciais ameaças para a homeostasia podem ocorrer durante a vida *in utero*, promovendo uma marca duradoura no organismo em desenvolvimento. Fatores ambientais exercem influências no início da vida sobre o desenvolvimento estrutural e funcional dos indivíduos, gerando alterações que podem persistir por toda a vida. Este fenômeno organizacional – que abrange os eventos pré-natais ambientais, crescimento fetal alterado e o desenvolvimento de fisiopatologia de longo prazo – tem sido designado como uma programação de início da vida (“*programming*”). Estes eventos parecem ser a base das origens do desenvolvimento da vulnerabilidade a doenças crônico-degenerativas que têm sido reveladas em estudos epidemiológicos.^[4, 5] Em estudos utilizando modelos animais, tem sido verificado que a exposição fetal a eventos adversos contribui na determinação da trajetória do desenvolvimento e promove alterações permanentes na função de múltiplos sistemas.^[6] A exposição, durante o período gestacional, a situações de estresse, ansiedade e depressão, pode contribuir para o aumento do risco da prole desenvolver alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis na vida adulta.

Ao mesmo tempo, muitos autores relatam que o exercício físico regular e a prática de atividades físicas contribuem na melhoria dos sintomas decorrentes do estresse e de diversas doenças crônicas provocadas por agentes estressores. A atividade física regular e o aumento da capacidade física promovem um efeito protetor contra o desencadeamento de doenças metabólicas e psiquiátricas.^[7-10]

Desta forma, esta dissertação teve como objetivo contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos relacionados aos efeitos do exercício físico antes do período pré-natal, possibilitando um conhecimento mais profundo sobre o seu efeito à longo prazo e a sua interação com eventos estressores durante a gestação, além de contribuir para possíveis ações preventivas nestes casos. Este trabalho é composto de uma revisão da literatura, a qual apresenta os aspectos e mecanismos envolvidos nos efeitos do estresse pré-natal e na prática de exercício físico, além de um artigo científico original. Neste último, abordamos os efeitos do exercício físico antes da gestação sobre a resposta do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em animais adultos submetidos ao estresse pré-natal por contenção. Nele são avaliados os comportamentos de medo e ansiedade, por meio do teste de labirinto em cruz elevada, e a anedonia, utilizando o teste de preferência por sacarose, além da liberação de corticosterona e da expressão gênica, no hipocampo e córtex pré-frontal, de receptores envolvidos na resposta do eixo HPA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

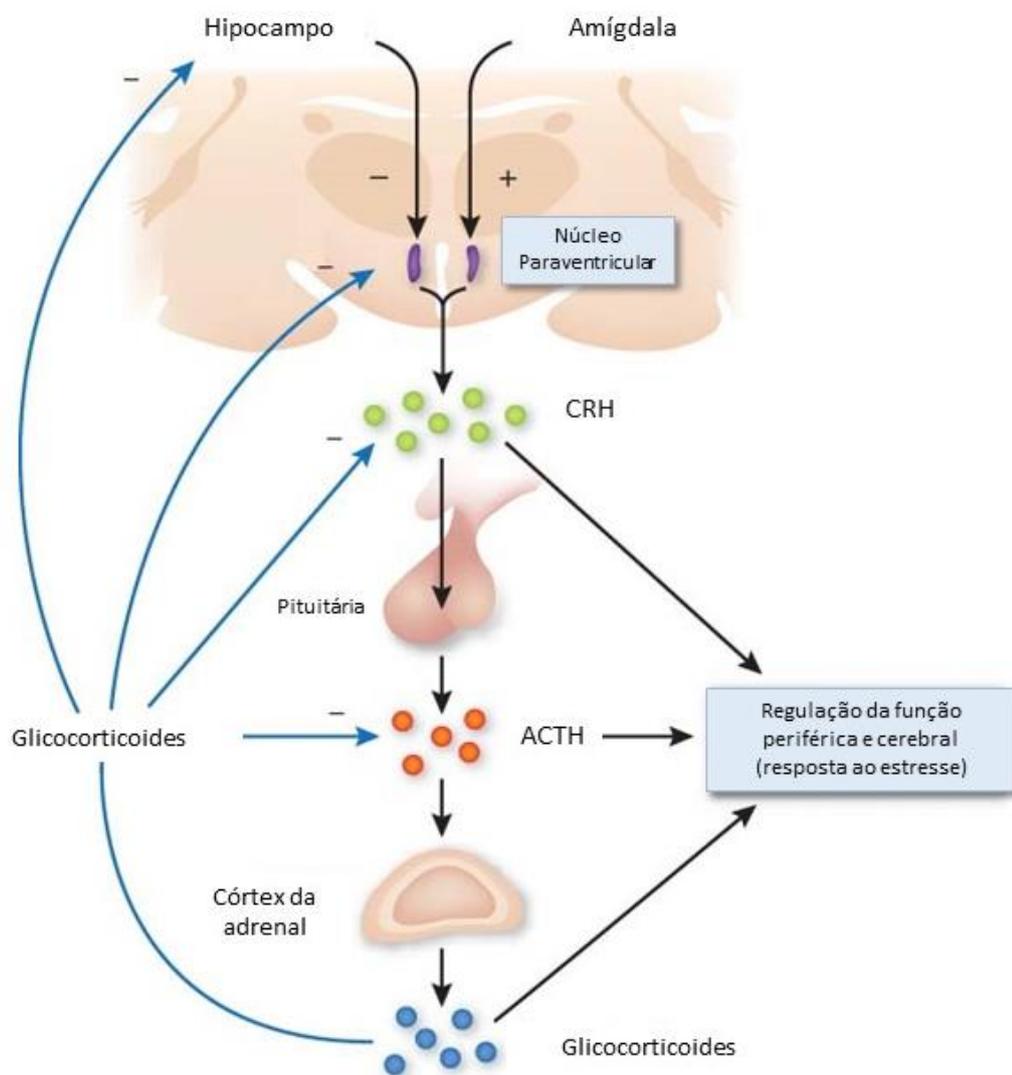
2.1 Estresse

Hans Selye, em 1936, incluiu o conceito de estresse no debate científico ao utilizá-lo nas áreas fisiológicas e biomédicas. O estresse foi primariamente definido como uma resposta inespecífica do organismo a um estímulo nocivo. Ele apontava que o estresse era diferente de uma excitação emocional ou tensão nervosa, principalmente por observar que uma mesma resposta poderia ocorrer em diferentes organismos vivos, inclusive naqueles que não possuíam sistema nervoso. Além disso, propôs, corretamente, que a intensidade do estímulo é um fator fundamental no estabelecimento da resposta ao estresse.^[11, 12]

A fim de manter suas condições internas dentro de limites toleráveis em face às diversas mudanças ambientais, os organismos vivos desenvolveram um equilíbrio dinâmico denominado homeostase, a qual é colocada em ameaça por estímulos estressores e, como resultado, um complexo repertório de respostas fisiológicas e comportamentais é ativado a fim de desestabilizar o potencial estressor. Os estressores compreendem uma gama de potenciais forças adversas que podem ser emocionais ou físicas, cuja magnitude e periodicidade do agente também são fatores significativos. Quando o estressor excede um determinado nível de severidade ou limiar temporal, o sistema homeostático adaptativo do organismo ativa respostas compensatórias que se ajustam funcionalmente ao estressor.^[13]

O eixo HPA é o centro controlador e regulador do organismo que conecta o sistema nervoso central (SNC) com o sistema hormonal. O eixo responde ao estímulo estressor e auxilia o organismo a manter a homeostasia além de ser essencial para auxiliar no funcionamento fisiológico normal.^[14] Em resposta ao estressor, o núcleo paraventricular hipotalâmico estimula a produção e secreção de dois neuropeptídios, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a arginina vasopressina, os quais atingem o lobo anterior da pituitária e ativam a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Quando liberado na circulação periférica, o ACTH estimula a secreção de epinefrina, noraepinefrina e glicocorticoides pelo córtex da adrenal.^[15] Os glicocorticoides liberados atuam na atividade de *feedback* negativo por meio da ativação de receptores de glicocorticoide (GR) e mineralocorticoide (MR) no

hipocampo, e GR no núcleo paraventricular do hipotálamo e pituitária anterior (figura 1).^[16]



Fonte: Adaptado de Nature Neuroscience.

Figura 1. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.

O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de uma variedade de alterações, desde doenças autoimunes até distúrbios mentais. O aumento da liberação simpatoadrenal de catecolaminas - inicialmente adrenalina e noradrenalina - tal como glicocorticoides adrenais, orquestram para o início do catabolismo,

mobilizando lipídeos e reservas de glicose.^[17-19] Além disso, ocorre a ativação de respostas cognitivas que incluem os sistemas que mediam os processos de atenção como aprendizado e memória.^[20] Durante o estresse, os indivíduos tornam-se hipervigilantes, o nível de atenção direcionada ao ambiente circundante é aumentado à custa de situações que não são essenciais para a sobrevivência.^[21] Ao mesmo tempo, os glicocorticoides agem em áreas específicas cerebrais, como a amígdala, para aprimorar a memória e o aprendizado.^[22] O estresse conjuntamente altera o estado emocional devido à ativação crônica dos sistemas relacionados à resposta ao agente estressor, promovendo prejuízo cognitivo, estado de ansiedade e disforia.^[23, 24]

2.2 Estresse pré-natal

Visto que o início da vida é marcado por ser um período de alta plasticidade, o crescimento e o desenvolvimento do indivíduo são moldados de acordo com o ambiente no período fetal.^[25] O conceito fisiológico de *programming* tem sido utilizado amplamente para explicar as associações entre eventos ambientais pré-natais que alteram o crescimento e o desenvolvimento fetal, os quais promovem “marcas” que permanecem ao longo da vida.^[6] Estudos desenvolvidos em animais demonstraram que o estresse pré-natal pode ter efeitos de programação tanto no desenvolvimento neurológico quanto na função do eixo HPA.^[4, 5, 26] A hiper-reatividade crônica do eixo HPA, confere ao indivíduo um estado de alerta e uma maior chance de sobrevivência. As respostas adaptativas geram alterações persistentes no funcionamento do organismo, provavelmente por meio de processos epigenéticos, potencialmente transmissíveis através das gerações.^[27] No decorrer da programação, a adversidade ambiental é transmitida para o feto e age em tecidos específicos durante períodos sensíveis para mudar as trajetórias de desenvolvimento e, portanto, a sua organização e funcionamento. Uma vez que diferentes células e tecidos são sensíveis a vários fatores em diferentes momentos, os efeitos da adversidade sobre a biologia de um indivíduo serão tecido, tempo e desafio específico.^[28]

Ainda, tem sido demonstrado em modelos experimentais com mães expostas a diversos estímulos estressores - como imobilização, barulho e choque - que este

tratamento ocasiona alterações permanentes na prole. Animais estressados no período pré-natal demonstram atraso no desenvolvimento motor na vida adulta, redução na exploração e no comportamento adaptativo, reações mais ansiosas em um ambiente não familiar, função cognitiva comprometida, além de alterações no comportamento social e sexual. Na vida adulta, estes animais também possuem altas concentrações basais sanguíneas de glicocorticoides e reduzido número de GR no hipocampo. Quando expostos ao estímulo estressor, na vida adulta, a resposta hormonal é mais rápida e forte, contudo mais prolongada, sugerindo que esta resposta hiperativa e desregulada está relacionada com um mecanismo anormal de *feedback* negativo do eixo HPA.^[29-32]

A placenta representa a conexão entre a mãe e o feto, a qual mantém ativamente a homeostase intra-uterina por meio de funções vitais incluindo a troca de nutrientes, oxigênio, secreção de hormônios e fatores de crescimento, entre outros.^[33] Diversos estudos têm proposto diferentes mecanismos que possam explicar a elevação dos níveis fetais de corticosteroides durante a exposição materna ao estresse. A enzima placentária 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD) possui a isoforma 11 β -HSD2, com apenas a atividade de desidrogenase, responsável pela conversão do cortisol materno em cortisona inativa.^[34] Em muitas espécies, as concentrações dessa enzima estão diminuídas no final da gestação – para permitir que as altas concentrações de cortisol facilitem a maturação pulmonar do feto - o que acarreta em uma maior exposição aos glicocorticoides maternos. Além disso, estudos experimentais já demonstraram que o estresse no período pré-natal reduz a expressão e atividade da 11 β -HSD2, o que poderia aumentar a exposição do feto aos hormônios maternos.^[35] Outra possibilidade seria através é da estimulação de CRH na placenta durante períodos de estresse, promovendo a ativação do eixo HPA fetal.^[36]

A exposição excessiva aos glicocorticoides maternos, causado por um evento estressor pré-natal, provoca a redução na expressão de GR e MR no hipocampo, hipotálamo e pituitária da prole, os quais são importantes locais de controle do eixo.^[37] O MR é responsável pela manutenção basal do eixo HPA, sendo altamente expresso no hipocampo e com cerca de dez vezes mais afinidade com os glicocorticoides circulantes do que o GR. Por outro lado, o GR é distribuído em todo tecido cerebral, e em situações de estresse agudo, a elevação das concentrações de cortisol

(corticosterona em roedores) satura o MR e promove a ativação do GR.^[38, 39] A redução da expressão destes receptores pode resultar na diminuição do *feedback* negativo controlado por glicocorticoides e, conseqüentemente, no aumento da atividade do eixo HPA.^[40] Para modular a atividade do eixo, os glicocorticoides efetuam uma retroalimentação no hipocampo via ligação tanto com o GR quanto com o MR. Além disso, os glicocorticoides inibem o CRH hipotalâmico, a produção de arginina vasopressina e a secreção do hormônio adrenocorticotrófico pela hipófise anterior, principalmente via GR.^[41] A exposição pré-natal aos glicocorticoides também promove alteração nos níveis de CRH circulantes especificamente no córtex pré-frontal – uma região importante na regulação cognição e da emoção.^[42] Podendo ser um potente modulador das respostas comportamentais, visto que a atividade do receptor tipo 1 de CRH (CRHR1), em roedores, está relacionada com o aumento do comportamento de medo e ansiedade.^[43]

A atividade do eixo HPA é altamente suscetível ao *programming* durante o desenvolvimento fetal, e os glicocorticoides agem como mediadores primários. Estes induzem a regulação da plasticidade do circuito neural do eixo HPA, podendo constituir um meio através do qual a exposição ao estresse desempenha um papel em um amplo espectro de anormalidades do eixo, incluindo ritmos circadianos aberrantes, resposta anormal ao estresse e desregulação basal do eixo HPA.^[44]

Machos e fêmeas apresentam diferentes respostas ao estresse em diversos estágios da vida, estas diferenças são relacionadas tanto com a organização e ativação de hormônios gonadais, quanto a genes relacionados com os cromossomos sexuais.^[43, 45, 46] Existem muitas evidências de que a exposição pré-natal aos glicocorticoides maternos promove diferentes efeitos em machos e fêmeas. Machos são mais vulneráveis a apresentarem déficits cognitivos, como de aprendizado e de memória. O estresse pré-natal é capaz de reduzir a neurogênese no hipocampo e a densidade de espinhos dendríticos no córtex pré-frontal em machos, o que pode justificar os estudos que demonstram que a exposição ao estresse durante a gestação, em machos adultos, diminui a memória em testes como de reconhecimento de objetos e localização espacial.^[47] Em fêmeas, estudos com roedores relatam uma maior resposta ao estresse, gerando um aumento na ansiedade e depressão, além de maiores concentrações de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) do receptor de CRH hipotalâmico, em animais estressados no período pré-natal.^[48]

O eixo HPA desempenha um papel fundamental na regulação dos sistemas cardiovascular, metabólico, reprodutivo e neurológico, e a desregulação deste eixo pode ser associada às diversas doenças crônicas e psiquiátricas.^[28] Da mesma maneira, a programação do eixo HPA decorrente da exposição aos glicocorticoides tem sido considerada fundamental na relação entre experiências no início da vida e o desenvolvimento de doenças crônicas ao longo da vida.^[49]

2.3 Exercício Físico

Embora a quantidade e o tipo de exercício necessário para a máxima proteção não sejam conhecidos, estudos demonstram que indivíduos fisicamente aptos e que praticam frequentemente atividades físicas exibem um menor índice de problemas de saúde, especialmente quando se deparam com situações de estresse.^[7] Além disso, o exercício físico contribui na redução dos níveis de ansiedade e neutraliza os efeitos do estresse e da depressão sobre a cognição e o humor.^[50] Os mecanismos biológicos responsáveis pela promoção dos benefícios estimulados pela prática do exercício físico incluem a otimização da resposta do sistema relacionado ao estresse (eixo HPA e SNC),^[51] melhora da capacidade cardiovascular^[8] e aumento da expressão de fatores de crescimento e plasticidade neural.^[52] A relação entre o exercício e a atividade do eixo HPA é complexa, visto que é influenciada pela duração, tipo, intensidade e cronicidade do exercício, além das características do estressor e da população utilizada.^[53-56]

A modulação da secreção de glicocorticoides em animais exercitados tem sido sugerida como uma das responsáveis pelo mecanismo de atuação do exercício.^[57] Em períodos prolongados de exercício físico, os glicocorticoides podem ser os responsáveis pela manutenção da glicose sanguínea por meio da estimulação de aminoácidos, ativação de gliconeogênese e aumento da mobilização de reservas de gordura.^[58, 59] Além disso, a prática regular de exercício físico tem sido relatada por trazer efeitos positivos em diversos sistemas biológicos, incluindo a diminuição da resposta ao estresse pelo eixo HPA.^[60]

Estudos prévios têm relatado efeitos antidepressivos e ansiolíticos do exercício físico tanto em pacientes quanto em modelos animais.^[61, 62] Além disso, o efeito ansiolítico do exercício tem sido introduzido para a prevenção de comportamento relacionados à ansiedade, em animais, promovidos pela exposição a diferentes eventos estressores como privação materna, utilização de glicocorticoides exógenos, exposição pré-natal ao etanol, entre outros.^[45, 63, 64] Em estudos utilizando exercício voluntário, além de observar-se a diminuição de marcadores de depressão, o exercício promoveu, em camundongos, quando observados em aparatos de avaliação comportamental, menor número de entradas no braço aberto no teste de cruz elevada e menor tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda.^[65, 66] Ademais, utilizando um modelo de separação materna, demonstrou-se que o exercício físico forçado é capaz de aumentar a densidade de GR na região do giro denteado, além do número de células GR positivas no núcleo paraventricular das proles exercitadas, acarretando na melhora dos sintomas envolvidos na resposta ao estresse.^[67] Em um estudo avaliando o uso de exercício moderado em esteira e comparando animais sedentários e exercitados, pôde-se observar que o exercício foi capaz de promover uma redução na secreção de ACTH em resposta a um estressor.^[68] Embora o exercício físico pareça ter efeitos protetores e terapêuticos no tratamento de doenças psiquiátricas, como depressão e ansiedade, os mecanismos envolvidos nesses benefícios ainda são pouco compreendidos. Os efeitos protetores, diante de uma situação estressora, têm focado nas respostas relacionadas ao hipocampo, uma região na qual o exercício exerce importante função na indução de neurogênese e expressão de fatores de crescimento.^[46, 69]

3. JUSTIFICATIVA

A exposição fetal a eventos estressores contribui na determinação da trajetória do desenvolvimento e promove alterações permanentes na função de múltiplos sistemas. Diversos estudos têm demonstrado que a exposição, durante o período gestacional, a situações de estresse, ansiedade e depressão pode contribuir para o aumento do risco da prole desenvolver alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis na vida adulta. Ao mesmo tempo, estudos têm demonstrado que a prática regular de exercício físico é um importante componente para o tratamento de diversas doenças. Desta forma, este estudo pretende contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos fisiológicos relacionados aos efeitos a longo prazo do exercício físico antes do período pré-natal, possibilitando um conhecimento mais profundo sobre a sua interação com eventos estressores neste período e contribuindo para possíveis ações preventivas nestes casos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do exercício físico antes do período gestacional sobre alterações decorrentes do estresse pré-natal em camundongos adultos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do exercício físico antes do período gestacional sobre a resposta comportamental em camundongos adultos submetidos ao estresse pré-natal por contenção;
- Avaliar os efeitos do exercício físico antes do período gestacional sobre a expressão gênica de GR e MR no hipocampo de camundongos adultos submetidos ao estresse pré-natal por contenção;
- Avaliar os efeitos do exercício físico antes do período gestacional sobre a expressão gênica de CRHR1 no córtex pré-frontal de camundongos adultos submetidos ao estresse pré-natal por contenção;
- Avaliar os efeitos do exercício físico antes do período gestacional sobre as concentrações hormonais de corticosterona em camundongos adultos submetidos ao estresse pré-natal por contenção.
- Avaliar se há diferenças sexuais nos efeitos do exercício físico antes do período gestacional sobre as alterações induzidas pelo estresse.

5. HIPÓTESES

- O exercício físico antes da gestação é capaz de alterar o comportamento de medo/ansiedade e de ingestão de sacarose promovido pelo estresse pré-natal;
- O exercício físico antes da gestação promoverá uma diminuição na expressão gênica de CRHR1 no córtex pré-frontal em comparação aos animais submetidos ao estresse pré-natal;
- O exercício físico antes da gestação promoverá um aumento na expressão gênica de GR, MR no hipocampo em comparação aos animais submetidos ao estresse pré-natal;
- O exercício físico antes da gestação diminuirá a secreção de corticosterona diante de um evento estressor em comparação à resposta ao estresse de animais submetidos ao estresse pré-natal;
- O exercício físico antes da gestação promoverá alterações nos mecanismos de resposta ao estresse dependentes do sexo.

6. MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CEMBE) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

6.1 Animais

O trabalho foi realizado com camundongos machos e fêmeas Balb/c de laboratório, provenientes do CEMBE. Os animais foram mantidos em ambiente de temperatura controlada ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e alimento por pelo menos 10 dias antes de qualquer procedimento experimental. Os camundongos foram mantidos em caixas de acrílico transparente, com cama de maravalha esterilizada e, tanto as caixas quanto a cama e os bebedouros eram trocados por material limpo e estéril conforme rotina do vivário.

6.2 Desenho Experimental

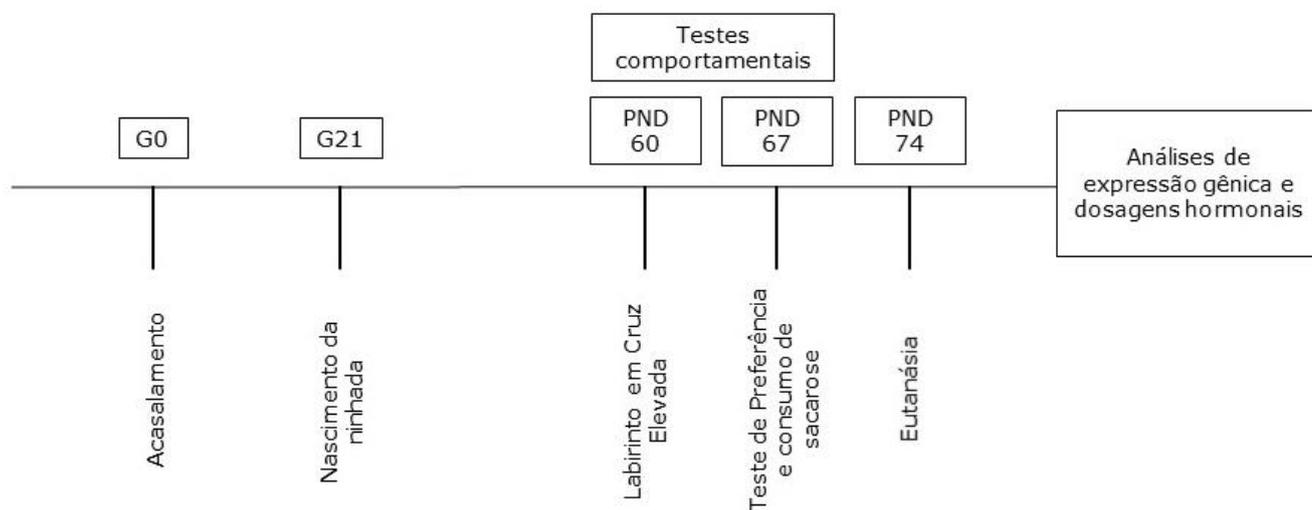
Fêmeas Balb/c foram divididas em três grupos experimentais: 1) CTLE – controle; 2) PNS - estresse pré-natal por contenção; 3) EX+PNS - exercício físico antes do período gestacional e estresse pré-natal por contenção. Os animais do grupo CTLE foram mantidos nas caixas e apenas manipulados na rotina de limpeza.

O ciclo estral das fêmeas foi verificado previamente ao acasalamento por meio da visualização por microscopia do material vaginal coletado. Durante o período fértil, as fêmeas foram colocadas junto com machos da mesma raça, durante o ciclo escuro, para permitir o acasalamento. Com a confirmação do acasalamento, o qual foi considerado o dia 0 de gestação (G0), as fêmeas prenhes foram randomizadas, dispostas individualmente e pesadas no G1, G8 e G15. Após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram padronizadas em 6 animais e o desmame foi realizado no 21º dia (PND 21). Fêmeas e machos foram acondicionados em caixas distintas com,

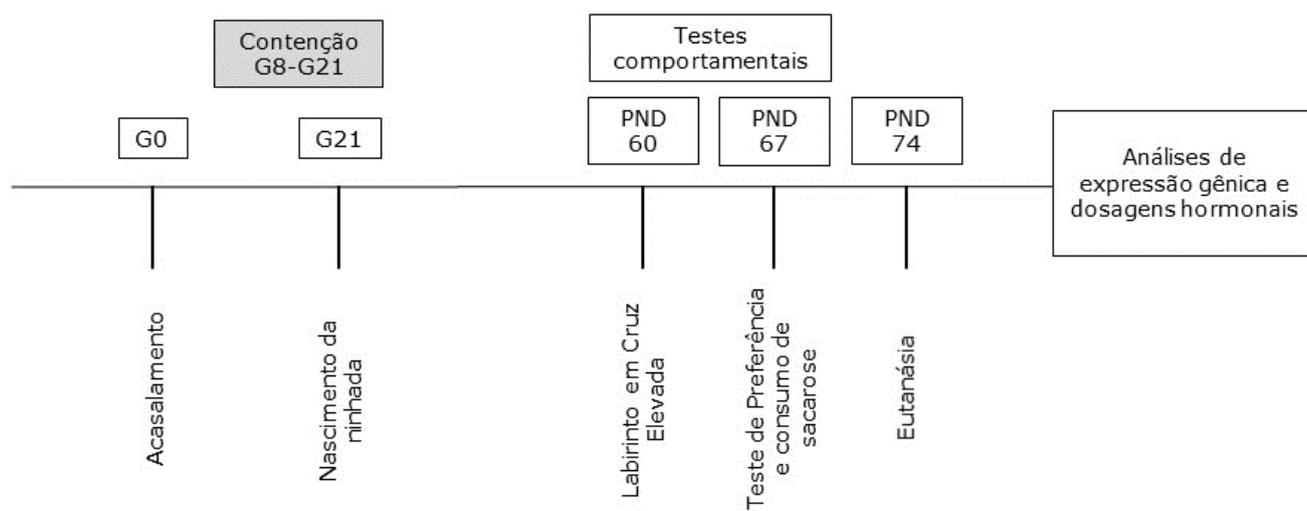
no máximo, 5 animais por caixa. O acompanhamento do crescimento foi feito através da verificação do peso nos dias 1, 10, 21 e 74 de vida. Estes animais foram mantidos até a idade adulta para a realização dos testes comportamentais de labirinto em cruz elevada e de preferência por sacarose, nos dias 60 e 67 de vida, respectivamente. No 74º dia de vida os animais foram eutanasiados para a realização dos procedimentos de obtenção das amostras. Dois animais de cada sexo, por ninhada, foram submetidos ao protocolo de estresse por contenção durante 30 minutos previamente à eutanásia. Os demais animais foram retirados das suas caixas e imediatamente eutanasiados. Estes animais somente foram trazidos para a sala de procedimentos no momento da eutanásia, a fim de evitar o contato com o estímulo olfativo de sangue – o qual poderia acarretar na elevação de parâmetros relacionados ao estresse. Foi retirado o encéfalo para avaliação da expressão gênica de GR, MR - no hipocampo – e de CRHR1 - no córtex pré-frontal. Além disso, foi feita a coleta de sangue para dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona.

6.2.1 Resumo do Desenho Experimental

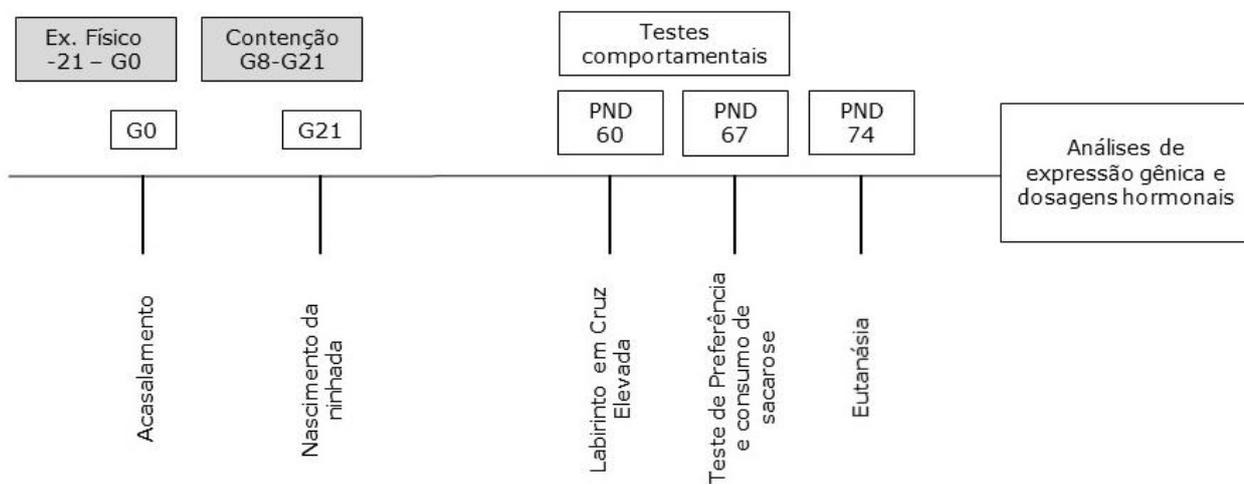
Grupo Controle



Grupo PNS



Grupo EX+PNS



6.3 Procedimentos e Técnicas

6.3.1 Modelo de Estresse por Contenção

O aparato consiste em um cilindro fechado, confeccionado em acrílico cristal, com 34 mm de altura, 42 mm de largura, 100 mm de circunferência e 10 furos laterais de 6 mm para entrada e saída de ar. A região frontal e traseira do aparato é removível e travada por manípulos.

6.3.2 Estresse Pré-Natal

O estresse pré-natal foi aplicado, por meio do modelo de contenção descrito anteriormente, nas fêmeas dos grupos PNS e EX+PNS. O protocolo foi realizado a partir do 8º dia de gestação, durante 30 minutos em dias intercalados, até o dia do nascimento da prole. As fêmeas do grupo CTLE não sofreram nenhuma intervenção durante o período pré-natal.

6.3.3 Modelo de Exercício Físico

Visto que os camundongos são animais com hábitos noturnos, os animais praticaram o protocolo de exercício físico a partir da última hora do ciclo claro. As fêmeas do grupo EX+PNS foram submetidas ao exercício físico em esteira motorizada, diariamente, somente durante as 3 semanas que precederam o dia do acasalamento (G0). Os animais foram familiarizados com a esteira em sessões de velocidade de 5 m/min, durante 10 minutos, nos três dias anteriores ao início do protocolo. As fêmeas foram submetidas ao exercício físico na velocidade de 10 m/min durante 60 minutos, 5 dias na semana. Os animais que se recusaram a praticar o exercício físico de forma espontânea foram excluídos do estudo. Os camundongos do grupo CTLE e PNS realizaram apenas atividades espontâneas em suas gaiolas.^[70]

6.3.4 Testes Comportamentais

Quando adultos, os animais machos e fêmeas, foram submetidos a dois testes comportamentais: teste de labirinto em cruz elevada (*elevated plus-maze*) para avaliação de medo e ansiedade, e teste de consumo de sacarose, para avaliação da anedonia. Os testes iniciaram na primeira hora do ciclo escuro e, para a realização do teste de labirinto em cruz elevada, os animais foram habituados na sala do teste durante 30 minutos. Os parâmetros do labirinto em cruz elevada foram analisados utilizando o *software Stoelting ANY-maze*.

6.3.4.1 Labirinto em Cruz Elevada

O teste consiste em de dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15 cm) unidos equidistantemente produzindo um campo central em comum (5 x 5 cm), com altura de 66 cm do chão. No início do teste, os animais foram colocados na plataforma central com a cabeça direcionada para o braço fechado e permaneceram no aparato durante 10 minutos.^[71] Foi avaliado o tempo gasto nos braços abertos. Ao término do teste, os animais foram retirados, devolvidos às suas caixas e a superfície do aparato foi higienizada com álcool 70%.

6.3.4.2 Consumo de Sacarose

Para a avaliação da anedonia, os animais receberam, durante 24 horas, duas garrafas: uma contendo solução de sacarose 1% e outra com apenas água. Para prevenir possíveis efeitos por preferência de posição para beber, a localização das garrafas foi alterada após 12h do início do teste. Nenhuma privação de água ou alimento foi aplicada antes do teste. O consumo da água e da solução de sacarose foi estimado em todos os grupos experimentais por meio da pesagem das garrafas antes e após a realização do teste. A preferência por sacarose foi calculada de acordo com

a porcentagem de consumo de solução de sacarose em relação ao consumo total (água e água com sacarose), e o consumo de sacarose foi avaliado em relação à porcentagem de sacarose ingerida corrigida pelo peso do animal.^[72, 73]

6.3.5 Resposta ao estresse na vida adulta

Para avaliar a resposta do eixo HPA diante de um segundo estímulo estressor na vida adulta, os animais foram subdivididos em dois grupos: decapitados em condições basais ou submetidos a um protocolo de contenção (descrito anteriormente) durante 30 minutos e imediatamente decapitados.

6.3.6 Eutanásia

Após uma semana da realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação. A utilização deste método é aceita mediante justificativa e, no caso do presente projeto, consistiu na necessidade de coleta de sangue fresco para dosagem de hormônios que são extremamente sensíveis a estímulos estressores, além de permitir a rápida e efetiva retirada do encéfalo.

6.3.7 Armazenamento das Amostras

Após a eutanásia dos animais, os encéfalos foram retirados e armazenados em *RNA-Later* (Applied Biosystems) por 24h a 4°C e, após isto, transferidos para freezer -80°C até o processamento final. O sangue foi **coletado**, armazenado em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e centrifugado a 4°C em 3000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, para a coleta **do** plasma sanguíneo.

6.3.8 Corticosterona

Para a dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona foi utilizado o *kit* comercial de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Mouse/Rat Cortisol ELISA, Sigma-Aldrich, USA). Para a avaliação foram utilizados 25 µL dos padrões, dos controles, de diluente e das amostras de plasma em placa de 96 poços. Foi adicionado em todos os poços da placa 100 µL do conjugado e colocada durante 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Após, foi retirado o líquido dos poços e lavado 3 vezes com 300 µL de *wash buffer* (tampão de lavagem). Em seguida, foi adicionado 100 µL do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em todos poços e incubado durante 15 minutos em temperatura ambiente sem agitação. Por fim, foi adicionado 50 µL do *stop solution* e a placa foi colocada sob agitação durante 10 minutos e lida em leitor de placa de ELISA (EZ Read 400, Biochrom Ltd, UK) no comprimento de onda de 450 nm.

6.3.9 Expressão Gênica

Foi realizada a expressão gênica de GR e MR no hipocampo, e de CRHR1 no córtex pré-frontal. O RNA celular total foi extraído pelo método de Trizol (ThermoFisher - Scientific) segundo as instruções do fabricante. O RNA foi ressuspendido em 20 µL de água livre de nuclease (Ambion®) e convertido em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) (GoScript™ Reverse Transcription System Protocol - Promega), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. A concentração final de cDNA foi analisada por método fluorimétrico (Qubit® - ThermoFisher – Scientific) utilizando *kit* comercial (Qubit® dsDNA HS Assay - ThermoFisher – Scientific).

A expressão gênica foi realizada em PCR quantitativo de tempo real (Step One Plus – Applied Biosystems) utilizando 16 ng de cDNA. As amostras foram preparadas em duplicata e a expressão relativa de mRNA foi calculada pelo método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) adotando gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como gene endógeno de referência. Um controle negativo para cada primer foi utilizado em cada placa para verificar possível contaminação. As medidas dos reagentes para a amplificação foram calculadas baseadas na incorporação do marcador fluorescente SYBR® Green (Applied Biosystems) na dupla fita de cDNA para cada reação de amplificação.

O conjunto de *primers* específicos para cada gene foram: GR (direto 5' GGAATAGGTGCCAAGGGTCT 3'; reverso 5' GAGCACACCAGGCAGAGTTT 3'), MR (direto 5' CCAGTTCTCCGTTCTCTGTA 3'; reverso 5' CTTGAGCACCAATCCGGTAG 3'), CRHR1 (direto 5' TGAGTGTTAGCGATGCCTTG 3'; reverso 5' TCCTACCACTGAGGACTGG 3') e GAPDH (direto 5' GGGGAGCCAAAAGGGTCATC 3'; reverso 5' GACGCCTGCTTCACCACCTTCTTG 3').

6.4 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A normalidade dos dados foi testada através do teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados foram expressos utilizando média e erro padrão da média. Para a avaliação das diferenças entre os grupos experimentais (CTLE, PNS e EX+PNS) foi utilizada ANOVA de uma via seguida do pós-teste de *Tukey*. Já para avaliação da interação entre os grupos experimentais e a resposta ao estresse, foi utilizada ANOVA de duas vias seguidas do pós-teste de *Tukey*. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

7. CONCLUSÕES

Em geral, esta dissertação demonstrou os efeitos de um protocolo de três semanas de exercício físico em esteira antes do período gestacional, avaliando os efeitos desse protocolo sobre as alterações induzidas pelo estresse pré-natal por contenção durante as duas últimas semanas de gestação. Evidenciamos um importante efeito sexual nas respostas dos mecanismos de atuação do exercício físico sobre o eixo HPA. Os resultados do presente estudo indicam que o exercício físico é capaz de promover alterações no ganho de peso das mães durante a gestação, bem como da prole ao longo da vida. Além disso, o exercício físico antes da gestação foi capaz de atenuar os efeitos promovidos pelo estresse pré-natal em marcadores de depressão, em ambos os sexos, e da expressão gênica de CRHR1 no córtex pré-frontal de fêmeas. Por outro lado, apesar do estresse pré-natal ter gerado alterações dependentes do sexo, o exercício físico parece não ter efeito na avaliação comportamental de medo/ansiedade, na expressão gênica dos receptores envolvidos na resposta de *feedback* negativo do eixo HPA e na secreção corticosterona.

Os resultados deste estudo podem auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos relacionados com o envolvimento do exercício físico antes da gestação, além de contribuir para a busca de novos tratamentos para doenças relacionadas ao estresse. Contudo, mais estudos devem empregados na busca de um melhor entendimento sobre as respostas desencadeadas pelo estresse pré-natal e a atuação do exercício, além das possíveis diferenças entre os sexos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franklin TB, Russig H, Weiss IC, Graff J, Linder N, Michalon A, et al. *Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations*. *Biological psychiatry*. 2010;68(5):408-15.
2. Woods SM, Melville JL, Guo Y, Fan MY, Gavin A. *Psychosocial stress during pregnancy*. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;202(1):61 e1-7.
3. O'Connor TG, Heron J, Golding J, Glover V. *Maternal antenatal anxiety and behavioural/emotional problems in children: a test of a programming hypothesis*. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2003;44(7):1025-36.
4. Seckl JR, Meaney MJ. *Glucocorticoid programming*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1032:63-84.
5. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. *Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids*. *The Journal of physiology*. 2006;572(Pt 1):31-44.
6. Seckl JR. *Physiologic programming of the fetus*. *Clinics in perinatology*. 1998;25(4):939-62, vii.
7. Gerber M, Puhse U. *Review article: do exercise and fitness protect against stress-induced health complaints? A review of the literature*. *Scandinavian journal of public health*. 2009;37(8):801-19.
8. Huang CJ, Webb HE, Zourdos MC, Acevedo EO. *Cardiovascular reactivity, stress, and physical activity*. *Frontiers in physiology*. 2013;4:314.
9. Rethorst CD, Wipfli BM, Landers DM. *The antidepressive effects of exercise: a meta-analysis of randomized trials*. *Sports Med*. 2009;39(6):491-511.
10. Gligoroska JP, Manchevska S. *The effect of physical activity on cognition - physiological mechanisms*. *Materia socio-medica*. 2012;24(3):198-202.
11. Selye H. *A syndrome produced by diverse noxious agents*. 1936. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 1998;10(2):230-1.

12. Selye H. *Confusion and controversy in the stress field*. Journal of human stress. 1975;1(2):37-44.
13. Chrousos GP, Gold PW. *The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis*. Jama. 1992;267(9):1244-52.
14. Dallman MF BS, Viau V. Hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Encyclopedia of stress.2000. p. 468-77.
15. Aguilera G. *HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging*. Experimental gerontology. 2011;46(2-3):90-5.
16. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. *Stress and the brain: from adaptation to disease*. Nature reviews Neuroscience. 2005;6(6):463-75.
17. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. *Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions*. Endocrine reviews. 1984;5(1):25-44.
18. Brindley DN, Rolland Y. *Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis*. Clin Sci (Lond). 1989;77(5):453-61.
19. Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Sebastian RJ. *The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons*. Annals of the New York Academy of Sciences. 1995;771:730-42.
20. Arnsten AF. *The biology of being frazzled*. Science. 1998;280(5370):1711-2.
21. McEwen BS. *Protective and damaging effects of stress mediators*. The New England journal of medicine. 1998;338(3):171-9.
22. Cahill L, McGaugh JL. *Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory*. Trends in neurosciences. 1998;21(7):294-9.
23. Nemeroff CB. *The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions*. Molecular psychiatry. 1996;1(4):336-42.

24. Heilig M, Koob GF, Ekman R, Britton KT. *Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration*. Trends in neurosciences. 1994;17(2):80-5.
25. Lindsay RS, Bennett PH. *Type 2 diabetes, the thrifty phenotype - an overview*. British medical bulletin. 2001;60:21-32.
26. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. *Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat*. Endocrinology. 2001;142(5):1692-702.
27. Silveira PP, Portella AK, Goldani MZ, Barbieri MA. *Developmental origins of health and disease (DOHaD)*. Jornal de pediatria. 2007;83(6):494-504.
28. Harris A, Seckl J. *Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease*. Hormones and behavior. 2011;59(3):279-89.
29. Weinstock M. *Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis?* Neuroscience and biobehavioral reviews. 1997;21(1):1-10.
30. Schneider ML, Roughton EC, Koehler AJ, Lubach GR. *Growth and development following prenatal stress exposure in primates: an examination of ontogenetic vulnerability*. Child development. 1999;70(2):263-74.
31. Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK. *Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility?* Psychological bulletin. 2004;130(1):115-42.
32. Clarke AS, Wittwer DJ, Abbott DH, Schneider ML. *Long-term effects of prenatal stress on HPA axis activity in juvenile rhesus monkeys*. Developmental psychobiology. 1994;27(5):257-69.
33. Jansson T, Powell TL. *Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches*. Clin Sci (Lond). 2007;113(1):1-13.

34. Chapman K, Holmes M, Seckl J. *11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action*. *Physiological reviews*. 2013;93(3):1139-206.
35. Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. *Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm*. *Endocrine reviews*. 2000;21(5):514-50.
36. Sandman CA, Wadhwa PD, Chicz-DeMet A, Dunkel-Schetter C, Porto M. *Maternal stress, HPA activity, and fetal/infant outcome*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1997;814:266-75.
37. Seckl JR. *Prenatal glucocorticoids and long-term programming*. *European journal of endocrinology*. 2004;151 Suppl 3:U49-62.
38. Funder JW. *Glucocorticoid receptors*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1992;43(5):389-94.
39. Reul JM, de Kloet ER. *Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation*. *Endocrinology*. 1985;117(6):2505-11.
40. Navarrete M, Nunez H, Ruiz S, Soto-Moyano R, Valladares L, White A, et al. *Prenatal undernutrition decreases the sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rat, as revealed by subcutaneous and intra-paraventricular dexamethasone challenges*. *Neuroscience letters*. 2007;419(2):99-103.
41. Vieau D, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Molendi-Coste O, Laborie C, et al. *HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring*. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32 Suppl 1:S16-20.
42. Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP. *The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor*. *The European journal of neuroscience*. 2003;18(8):2357-64.
43. Bale TL, Vale WW. *CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors*. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2004;44:525-57.

44. Levy BH, Tasker JG. *Synaptic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress*. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2012;6:24.
45. Brocardo PS, Boehme F, Patten A, Cox A, Gil-Mohapel J, Christie BR. *Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise*. *Neuropharmacology*. 2012;62(4):1607-18.
46. Ernst C, Olson AK, Pinel JP, Lam RW, Christie BR. *Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis?* *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*. 2006;31(2):84-92.
47. Weinstock M. *Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour*. *Neurochemical research*. 2007;32(10):1730-40.
48. Zohar I, Weinstock M. *Differential effect of prenatal stress on the expression of corticotrophin-releasing hormone and its receptors in the hypothalamus and amygdala in male and female rats*. *Journal of neuroendocrinology*. 2011;23(4):320-8.
49. Reynolds RM. *Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: two decades of testing the hypothesis- 2012 Curt Richter Award Winner*. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(1):1-11.
50. Clark PJ, Brzezinska WJ, Thomas MW, Ryzhenko NA, Toshkov SA, Rhodes JS. *Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6J mice*. *Neuroscience*. 2008;155(4):1048-58.
51. Sadeghi M, Peeri M, Hosseini MJ. *Adolescent voluntary exercise attenuated hippocampal innate immunity responses and depressive-like behaviors following maternal separation stress in male rats*. *Physiology & behavior*. 2016;163:177-83.
52. Knaepen K, Goekint M, Heyman EM, Meeusen R. *Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects*. *Sports Medicine*. 2010;40(9):765-801.

53. Campeau S, Nyhuis TJ, Sasse SK, Kryskow EM, Herlihy L, Masini CV, et al. *Hypothalamic pituitary adrenal axis responses to low-intensity stressors are reduced after voluntary wheel running in rats*. Journal of neuroendocrinology. 2010;22(8):872-88.
54. Leal-Cerro A, Gippini A, Amaya MJ, Lage M, Mato JA, Dieguez C, et al. *Mechanisms underlying the neuroendocrine response to physical exercise*. Journal of endocrinological investigation. 2003;26(9):879-85.
55. Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos GP. *Exercise and the stress system*. Hormones (Athens). 2005;4(2):73-89.
56. Stranahan AM, Lee K, Mattson MP. *Central mechanisms of HPA axis regulation by voluntary exercise*. Neuromolecular medicine. 2008;10(2):118-27.
57. Chang YT, Chen YC, Wu CW, Yu L, Chen HI, Jen CJ, et al. *Glucocorticoid signaling and exercise-induced downregulation of the mineralocorticoid receptor in the induction of adult mouse dentate neurogenesis by treadmill running*. Psychoneuroendocrinology. 2008;33(9):1173-82.
58. Shephard RJ, Sidney KH. *Effects of physical exercise on plasma growth hormone and cortisol levels in human subjects*. Exercise and sport sciences reviews. 1975;3:1-30.
59. Tharp GD. *The role of glucocorticoids in exercise*. Medicine and science in sports. 1975;7(1):6-11.
60. Salmon P. *Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory*. Clinical psychology review. 2001;21(1):33-61.
61. Blumenthal JA, Babyak MA, Doraiswamy PM, Watkins L, Hoffman BM, Barbour KA, et al. *Exercise and pharmacotherapy in the treatment of major depressive disorder*. Psychosomatic medicine. 2007;69(7):587-96.
62. Lapmanee S, Charoenphandhu J, Charoenphandhu N. *Beneficial effects of fluoxetine, reboxetine, venlafaxine, and voluntary running exercise in stressed male rats with anxiety and depression-like behaviors*. Behavioural brain research. 2013;250:316-25.

63. Baek SS, Jun TW, Kim KJ, Shin MS, Kang SY, Kim CJ. *Effects of postnatal treadmill exercise on apoptotic neuronal cell death and cell proliferation of maternal-separated rat pups*. Brain & development. 2012;34(1):45-56.
64. Kim HG, Lim EY, Jung WR, Shin MK, Ann ES, Kim KL. *Effects of treadmill exercise on hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis induced by chronic administration of corticosterone in rats*. Neuroscience letters. 2008;434(1):46-9.
65. Aguiar AS, Jr., Stragier E, da Luz Scheffer D, Remor AP, Oliveira PA, Prediger RD, et al. *Effects of exercise on mitochondrial function, neuroplasticity and anxiety-depressive behavior of mice*. Neuroscience. 2014;271:56-63.
66. Santos-Soto IJ, Chorna N, Carballeira NM, Velez-Bartolomei JG, Mendez-Merced AT, Chorny AP, et al. *Voluntary running in young adult mice reduces anxiety-like behavior and increases the accumulation of bioactive lipids in the cerebral cortex*. PloS one. 2013;8(12):e81459.
67. Park JK, Lee SJ, Oh CS. *Treadmill exercise exerts ameliorating effect on isolation-induced depression via neuronal activation*. Journal of exercise rehabilitation. 2013;9(2):234-42.
68. Lanza JF, Sanchez-Roige S, Gagliano H, Fuentes S, Bayod S, Camins A, et al. *Physiological and behavioural consequences of long-term moderate treadmill exercise*. Psychoneuroendocrinology. 2012;37(11):1745-54.
69. Castren E, Voikar V, Rantamaki T. *Role of neurotrophic factors in depression*. Current opinion in pharmacology. 2007;7(1):18-21.
70. Aksu I, Baykara B, Ozbal S, Cetin F, Sisman AR, Dayi A, et al. *Maternal treadmill exercise during pregnancy decreases anxiety and increases prefrontal cortex VEGF and BDNF levels of rat pups in early and late periods of life*. Neuroscience letters. 2012;516(2):221-5.
71. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. *Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat*. Journal of neuroscience methods. 1985;14(3):149-67.

72. Willner P. *Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation.* Psychopharmacology. 1997;134(4):319-29.

73. Van den Hove DL, Leibold NK, Strackx E, Martinez-Claros M, Lesch KP, Steinbusch HW, et al. *Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system.* European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology. 2014;24(4):595-607.

ANEXO

CARTA DE APROVAÇÃO CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 34/2015 - CEUA

Porto Alegre, 11 de junho de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

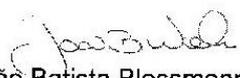
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00446, intitulado **“Efeitos do exercício físico no período gestacional sobre alterações induzidas pelo estresse pré-natal em camundongos adultos”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
180 animais	Mus musculus	12/2015 – 12/2018

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Márcio Vinícius F. Donadio

IPB

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br