



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

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PARENTAL EM ESTEIRA SOBRE A MEMÓRIA  
ESPACIAL E A PLASTICIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO DE FILHOTES DE RATOS  
WISTAR**

Dissertação de Mestrado

**Ethiane Segabinazi**

Porto Alegre  
2016

Ethiane Segabinazi

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PARENTAL EM ESTEIRA SOBRE A MEMÓRIA  
ESPACIAL E A PLASTICIDADE SINÁPTICA NO HIPOCAMPO DE FILHOTES DE RATOS  
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Marcuzzo

Porto Alegre  
2016

Dedico essa dissertação às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais (Sérgio e Margarida), meus irmãos (Fabiane e Alexandre) e meus sobrinhos e cunhado (Felipe, Carmela e Erasmo).

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente, a Deus por ouvir minhas preces;
- À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Marcuzzo, por todos os ensinamentos, pela amizade, paciência e confiança no decorrer dessa longa caminhada;
- Aos amigos do PND: André, Chris, Filipe, Figue, Fran, Gabi e Otávio, pelo empenho e dedicação no trabalho em equipe, pela amizade, troca de conhecimento e pelos momentos de descontração;
- Agradecimento especial à Francele Valente Piazza por todo conhecimento que sempre compartilhou comigo desde a minha graduação até aqui, pela ajuda com a imuno e DO e principalmente pela amizade;
- Aos queridos amigos do laboratório de Histofisiologia Comparada: Silvia, Heloísa, Bruna, Pati e Ramiro, pelas discussões científicas e auxílio em experimentos, pelas risadas, conversas e companheirismo. Agradecimento especial a Helo, que nos ajudou diversas vezes nos experimentos;
- A Marília, pela amizade, parceria, apoio e sugestões;
- A Camila, Núbia, Fran Lirio, Charlanne e Nicoli pela paciência, compreensão, risadas, festas e amizade;
- Aos amigos que ganhei com o mestrado: Lizeth, Krislei, Luiza e Flávia, pelo apoio, troca de conhecimento e parceria;
- Aos meus orientadores da vida, Sérgio e Margarida Segabinazi, pelo amor incondicional, apoio e carinho que sempre devotaram a mim;
- Ao meu irmão Alexandre, pela grande amizade e companheirismo de sempre;
- À minha irmã Fabiane, pelo amor, incentivo e por juntamente ao Erasmo ter me dado dois presentões que alegram as nossas vidas: Felipe e Carmela;
- Às minhas tias queridas: Leonida e Jenny, pelo apoio, carinho e orações;
- Às minhas amigas de longa data, por todo apoio e por tudo que representam na minha vida: Angela, Juliana, Thayná e Josiane. Amo muito vocês!
- Aos amigos que a UFRGS me trouxe: Marcus Michels, Igor, Carlinha, Ane, Marcos Kulman e Mel pelo carinho, apoio, festas, risadas e pela amizade. Cada um tem um lugar especial no meu coração. Agradecimento especial ao Marcus Michels e ao Igor por serem pessoas extraordinárias na minha vida e pelo auxílio com o artigo e referências, AMO TODOS VOCÊS!
- À dona Maria, Sr. Tolotti e Rudá pela amizade, carinho e apoio, vocês são muito especiais para mim;
- À banca avaliadora, pelas sugestões e disponibilidade;
- Ao CNPq, pela bolsa de estudos e financiamento da pesquisa;

- Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRGS, pela oportunidade de estudo.

“ Eu aprendi que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-a.”

*William Shakespeare*

## RESUMO

Períodos específicos do desenvolvimento (incluindo os períodos pré-concepção e pré-natal) são altamente vulneráveis a modificações do ambiente, como a dieta e o estresse. Portanto, o estilo de vida dos pais influencia na saúde dos filhos. Entre os inúmeros benefícios do exercício físico, estudos pré-clínicos têm relacionado a prática de atividade física durante a gestação a um melhor desempenho cognitivo da prole, o que também foi visto no único estudo que investigou a prática de atividade física paterna sobre esse parâmetro. Nesse contexto, este é o primeiro estudo até então delineado para investigar como a atividade física parental (ambos os progenitores) pode influenciar o nível de estresse materno, o desenvolvimento sensório-motor, a memória espacial e a plasticidade sináptica no hipocampo da prole, o que confere relevância e originalidade a pesquisa. Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFRGS (27587). Nove ratos Wistar machos e treze fêmeas adultos foram divididos em 2 grupos: sedentários ou exercitados. O protocolo de exercício físico forçado para os ratos machos ocorreu previamente ao acasalamento e consistiu em corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos na velocidade de 5 m/min, 20 min/dia (60 % VO<sub>2</sub> máx), 5 dias consecutivos/semana em um período total de 22 dias. Após a confirmação do acasalamento, parte das ratas prenhas foram submetidas ao protocolo de exercício no período gestacional, a uma velocidade de 6,6 m/min (30 % VO<sub>2</sub>máx), 20 min/dia, 5 dias consecutivos/semana, durante toda a gestação. Os filhotes machos foram divididos em quatro grupos conforme a realização ou não da atividade física parental: (1) filhotes de pais sedentários e mães sedentárias no período gestacional (SS); (2) filhotes de pais sedentários e mães exercitadas no período gestacional (SE); 3) filhotes de pais exercitados e mães sedentárias no período gestacional (ES); (4) filhotes de pais exercitados e mães exercitadas durante a gestação (EE). Uma semana após o desmame (P21), as mães foram decapitadas e as suas glândulas adrenais foram retiradas e pesadas como medida de estresse. O peso corporal dos filhotes foi analisado no dia de seu nascimento (P0), P7, P14 e P53 (previamente a perfusão transcardíaca). Do P1 ao P21, o desenvolvimento sensório-motor dos animais foi avaliado diariamente por meio da avaliação de marcos do desenvolvimento (n: 11-13 animais por grupo). Entre P47 e P51, a aprendizagem e a memória espacial dos filhotes foi avaliada utilizando o labirinto aquático de Morris (n: 4 - 9 animais por grupo). A análise da proteína sinaptofisina na região do hilo do giro denteado do hipocampo foi realizada a partir de imunomarcações e por meio de densitometria óptica (n: 4 - 5 animais por grupo). Não houve diferença entre os grupos experimentais quanto ao peso absoluto ou relativo das glândulas adrenais das mães, peso corporal dos filhotes, dia de apresentação de cada marco do desenvolvimento, desempenho no teste do labirinto aquático de Morris e conteúdo de sinaptofisina no hipocampo da prole. Esses resultados sugerem que o protocolo de exercício físico parental empregado em nosso estudo não gera estresse materno significativo, não tem efeito sobre o desenvolvimento físico e sensório-motor, a memória espacial e também não altera a expressão de sinaptofisina no hipocampo de filhotes de ratos Wistar.

**Palavras-chave: Exercício Físico Parental, Desenvolvimento Sensório-Motor, Plasticidade Sináptica, Memória Espacial.**

## ABSTRACT

Specific developmental periods (including preconception and prenatal) are highly vulnerable to environmental changes such as diet and stress. Therefore, parental lifestyle influences the health of children. Preclinical studies have associated the mother's physical activity practice during pregnancy and prior to conception to a better offspring cognitive function, which was also seen in the only study that investigates the practice of parental physical activity on this parameter. This is the first research designed to study how parental physical activity can influence the maternal stress level, sensory-motor development, spatial memory and synaptic plasticity of the offspring, giving relevance and originality in research. All procedures were approved by the UFRGS Ethics Committee (27587). Nine male and 13 female Wistar adult rats were submitted or not to physical exercise. Forced exercise protocol for male rats were performed previously to mating and consisted of treadmill running (speed of 5 m/min, 20 min/day at 60%  $VO_2$  max, 5 consecutive days/week) during 22 days. After confirmation of pregnancy, part of female rats were submitted to treadmill running (speed of 6,6 m/min, 20 min/day at 30 %  $VO_2$ max, 5 consecutive days/week) throughout pregnancy. After birth, the male pups were divided in four groups: (1) offspring from sedentary father and mother (SS); (2) offspring from sedentary father and exercised mother (SE); (3) offspring from exercised father and sedentary mother (ES); (4) offspring from exercised father and exercised mother (EE). A week after weaning (P21), mothers were decapitated and their adrenal glands were removed and weighed as a measure of stress. Body weight of the pups was analyzed at birth day (P0), P7, P14 and P53 (before transcardiac perfusion). From P1 to P21, the sensorymotor development of pups was evaluated daily by the developmental milestones (n: 11-13 animals per group). Between P47 and P51, the spatial learning and memory of the offspring was assessed using the Morris Water Maze (n: 4 - 9 animals per group). The expression of synaptophysin in the hilus of dentate gyrus of the hippocampus was verified by immunostaining and measured by optical densitometry (n: 4 - 5 animals per group). No difference was found among the experimental groups regarding absolute or relative weight of adrenal glands from of mothers, body weight of puppies, the day when each developmental milestone was acquired, the performance in the Morris water maze task or the synaptophysin expression in hippocampus. These data suggest that the parental exercise protocol used in this study does not generate significant maternal stress, has no effects on physical and sensorimotor development of offspring or in spatial memory and synaptic plasticity of the hippocampus.

**Keywords: Parental Physical Exercise, Sensorimotor Development, Synaptic Plasticity, Spatial Memory.**



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

### Língua Portuguesa

ATP.....	Trifosfato de Adenosina
BDNF.....	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
CA.....	Corno de Ammon
cols.....	Colaboradores
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
DNMT1.....	DNA metiltransferase 1
EUA.....	Estados Unidos da América
FGF.....	Fator de Crescimento de Fibroblasto
GAP-43.....	Proteína 43 Associada ao Crescimento
GD.....	Giro Denteado
IGF-1.....	Fator de Crescimento semelhante a Insulina tipo 1
LTP.....	Potenciação de Longa Duração
LTD.....	Depressão de Longa Duração
LPS.....	Lipopolissacarídeo
miRNAs.....	microRNAs
O <sub>2</sub> .....	Oxigênio Molecular
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
PSD-95.....	Proteína de Densidade Pós-Sináptica 95
RNA <sub>m</sub> .....	Ácido Ribonucleico Mensageiro
VO <sub>2</sub> máx.....	Consumo Máximo de Oxigênio

### Língua Inglesa

ACOG.....	<i>American College of Obstetrician and Gynecologists</i>
DOHaD.....	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>

## ARTIGO

AOI.....	Area of interest
ARC.....	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
BDNF.....	Brain-derived neurotrophic factor
BSA.....	Bovine Serum Albumin
CA.....	Cornus Ammonis
cm.....	Centimeters
DAB.....	3,3- diaminobenzidine
days/week.....	Days per week
DG.....	Dentate Gyrus
DNA.....	Deoxyribonucleic acid
E.....	East
E.....	Exercised mothers
EE.....	Offspring from exercised fathers and mothers
ES.....	Offspring from exercised fathers and sedentary mothers
G.....	Gestational day
GluN2B.....	Glutamate [N-methyl D-aspartate] receptor subunit epsilon-2
g.....	Grams
h.....	Hours
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Dihydrogen dioxide
H&E.....	Hematoxylin and Eosin
i.p.....	Intraperitoneal
IU.....	International unit
log.....	Logarithm
M.....	Molar
m/mim.....	Meters per minute
mg/Kg.....	Milligrams per kilogram
mg/mL.....	Milligrams per milliliter
min.....	Minutes

min/day.....	Minutes per day
miRNAs.....	microRNAs
ml.....	Milliliter
mm.....	Millimeter
mRNA.....	Messenger RNA
N.....	North
° C.....	Degrees Celsius
OD.....	Optical densitometry
P.....	Postnatal day
<i>p</i> .....	<i>p value</i>
PBS.....	Phosphate buffer saline
PBS-Tx.....	PBS containing 0,1% Triton X-100
pH.....	Potential of hydrogen
PSD-95.....	Postsynaptic density protein 95
s.....	Seconds
S.....	Sedentary mothers
S.....	South
SE.....	Offspring from sedentary father and exercised mother
SEM.....	Standard error of mean
SNAP-25.....	Synaptosomal-associated protein 25
SS.....	Control offspring
SYP.....	Synaptophysin
T test.....	T-test
USA.....	United States of America
W.....	West

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Tipos de exercício físico quanto a motivação. A) Exercício físico voluntário em roda de corrida de livre acesso. B) Exercício físico forçado em tanque de natação e esteira ergométrica adaptada para ratos. Adaptado de Brooks e Dunnet (2009) e Spindler (2012). ..... 3
- Figura 2: A) Circuito de treinamento acrobático composto por obstáculos como rampas, gangorras e escadas. B) Exercício de força em sistema de agachamento com sobrecarga. Adaptado de Black et al. (1990) e Tamaki et al. (1992)..... 4
- Figura 3: Experiências maternas como, por exemplo, subnutrição, exposição ao estresse crônico ou infecções podem alterar o metabolismo materno, levando a um prejuízo da funcionalidade placentária, o que por sua vez, pode modificar a transmissão de fatores de crescimento e nutrientes. Dessa maneira, a programação epigenética de células somáticas e germinativas da prole é modificada, podendo influenciar o seu fenótipo ou ainda de outra próxima geração. Modificado de Bale, 2015. Modificado de Bale, 2015..... 10
- Figura 4: Hipótese sobre a relação entre a dose de exercício materno e efeitos no epigenoma e fenótipo dos filhos. Adaptado de Chalk e Brown (2014). ..... 11
- Figura 5: Desenho esquemático evidenciando que a exposição paterna a diversos fatores ambientais previamente à concepção pode transmitir informação às próximas gerações via alterações epigenéticas em células germinativas. Modificado de Curley et al. (2011)..... 12
- Figura 6 : Provável mecanismo pelo qual o exercício físico induz modificações epigenéticas nos espermatozoides. O exercício físico influencia o metabolismo e o eixo HHT na geração F0, que, por sua vez, alteram as marcas epigenéticas no período da espermatogênese. Metilação de DNA, modificação de histonas e dos níveis de RNAs não codificantes nos espermatozoides são as alterações epigenéticas mais importantes que podem causar uma mudança fenotípica na prole. Modificado de Murachov et al. (2015)..... 14
- Figura 7: Na maioria dos mamíferos a espermatogênese dura cerca de 6 a 8 semanas, na maior parte desse período, a linhagem germinativa encontra-se suscetível a fatores ambientais que podem modular as suas marcas epigenéticas, que por sua vez, podem modificar o fenótipo da prole. Adaptado de Bale, 2015. .... 15
- Figura 8: Metilação do DNA na linhagem germinativa como um dos mecanismos epigenéticos propostos para a transmissão de informação às próximas gerações. As marcas epigenéticas necessitam passar ilesas pelos ciclos de reprogramação epigenética no zigoto e embrião para poder transmitir a informação à prole. Adaptado de Hughes (2014). ..... 15
- Figura 9: Esquema de um corte coronal do encéfalo de um rato no nível do hipocampo, mostrando as três vias que conectam as diferentes estruturas da formação hipocampal (Adaptado de Purves, 2010). ..... 16

## ARTIGO

Figure 1. Experimental Design. G1: first gestational day. P0: day of birth. The male and female progenitors were divided into two groups each: exercised and sedentary in preconception period or during pregnancy, respectively. The experiment was designed to obtain offspring of four experimental groups according to the fulfillment or not of parental physical activity: (1) offspring from sedentary father and mother (SS); (2) offspring from sedentary father and exercised mother in pregnancy (SE); (3) offspring from exercised father and sedentary mother in the gestational period (ES); (4) offspring from exercised father and exercised mother in the pregnancy (EE).  
 .....45

Figure 2. A) Escape latency was similar between groups at any day of training period ( $p > 0.05$ , ANOVA with repeated measures). Except for the offspring from exercised fathers and sedentary mothers (ES), the other groups decreased the latency to find the platform during the training period. However, the SE group did not learn faster than the control (SS) and EE groups.\* The mean of escape latency on the third day of training was less than in the first day of training for SS ( $p = 0.03$ ) and EE ( $p = 0.002$ ). # The SE group had a lower escape latency mean on the fourth day of training compared to the first day ( $p = 0.03$ ). No difference was observed between the average latency of the four days of training in the ES group ( $p > 0.05$ ). In the probe trial, the animals spent similar time in the opposite (B) and target (C) quadrants ( $p > 0.05$ , two-way ANOVA). Data expressed as mean  $\pm$  SEM. Experimental groups: control offspring (SS,  $n = 4$ ), offspring of sedentary father and exercised mother (SE,  $n = 9$ ), offspring of exercised fathers and sedentary mothers (ES,  $n = 9$ ) and offspring of exercised fathers and mothers (EE,  $n = 6$ ).  
 .....46

Fig 3. SYP expression in the dentate gyrus (DG) of hippocampus. A) Photomicrograph of coronal section of dorsal hippocampus stained with hematoxylin and eosin, showing the three regions of DG: molecular layer, granular layer and hilus (target region of the study). 200x magnification. Scale bar = 50  $\mu$ m. B) Representative photomicrographs of immunohistochemistry for SYP in coronal sections of DG from different groups. 200x magnification. Scale bar = 50  $\mu$ m. C) Optical Density (OD) measurement of SYP staining intensity in the hilus of DG described as mean  $\pm$  SEM. 4-5 animals per group. Experimental

groups: control offspring (SS), offspring of sedentary father and exercised mother (SE), offspring of exercised father and sedentary mother (ES) and offspring of exercised father and mother (EE).....47

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

Table 1. Body weight (g) expressed as mean  $\pm$  SEM of control offspring (SS), offspring of sedentary father and exercised mother (SE), offspring of exercised fathers and sedentary mothers (ES) and offspring of exercised fathers and mothers (EE) in different postnatal days.....44

Table 2. Latency to the acquisition of developmental milestones (postnatal days) in control offspring (SS), offspring of sedentary father and exercised mother (SE), offspring of exercised fathers and sedentary mothers (ES) and offspring of exercised fathers and mothers (EE). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM.....44

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Exercício Físico.....	1
1.2. Efeitos do Exercício Físico sobre o Sistema Nervoso.....	4
1.3. Exercício Físico Parental.....	6
1.3.1. Exercício Físico Maternal .....	6
1.3.2. Exercício Físico Paternal.....	11
1.4. Hipocampo, Memória e Exercício Físico.....	15
1.5. Plasticidade Sináptica e Exercício Físico .....	19
<b>2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....</b>	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Objetivo Geral .....	23
3.2. Objetivos Específicos .....	23
<b>4. MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
4.1. Artigo: <b>Parental exercise is safe for the physical and sensorimotor development but does not alter synaptic plasticity or the spatial memory of Wistar rat offsprings.</b> .....	24
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>48</b>
<b>6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Exercício Físico: Conceito

A atividade física pode ser definida como qualquer movimento do corpo realizado pelos músculos esqueléticos e que provoque gasto de energia como, por exemplo, tarefas domésticas, laborais, de lazer ou deslocamentos. Por outro lado, o exercício físico consiste em um tipo de atividade física planejada, estruturada e repetitiva (Caspersen et al., 1985). No Brasil, segundo o Ministério do Esporte (2015), 54,1% da população entre 14 e 75 anos pratica algum exercício físico e os 45,9% restantes são sedentários, o que corresponde a 67 milhões de pessoas. Essa mesma pesquisa também revelou que as modalidades de atividade física mais praticadas pelos brasileiros são a caminhada, em primeiro lugar, seguida de ciclismo, corrida, musculação, ginástica e academia.

Nos últimos anos, a incidência global do sedentarismo tem aumentado de forma preocupante, sendo que na Argentina 68,3% da população é sedentária, 40,5% nos EUA, 48% na Itália, 15,6% na Índia, 52,4% na África do Sul e 20,8% na Rússia (Brasil, Ministério do Esporte, 2015). Está bem consolidado na literatura que o sedentarismo pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas e que a atividade física regular está inversamente associada à grande parte das causas de mortalidades em adultos (Guimarães & Ciolac, 2014; Brown et al. 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011) recomenda a prática semanal de no mínimo 150 minutos de exercício físico moderado para adultos, como medida de combate ao sedentarismo.

A prática regular de atividade física faz parte de um estilo de vida saudável e pode proporcionar inúmeros efeitos benéficos à saúde, como a redução do risco de acidente vascular cerebral, de mortalidade relacionada a doenças cardiovasculares, do desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo II, depressão, fraturas osteoporóticas, obesidade, câncer de mama e câncer de colo (Aune et al., 2015; Boyle et al., 2012; Cauley et al, 2013; Kovács et al., 2015; Kuwahara et al., 2015; Lee e Paffenbarger, 1998; Merom et al., 2016; Wu et al., 2013). De fato, o exercício físico é capaz de influenciar o funcionamento de diversos sistemas, uma vez que melhora funções hemodinâmicas, hormonais, metabólicas, neurológicas, respiratórias e cardíacas (Fletcher et al., 1996).



Além de ser considerado uma medida preventiva, o exercício físico pode ser utilizado como terapia coadjuvante em várias patologias, tais como: hipertensão arterial, osteoartrite, diabetes *mellitus*, aterosclerose, doença coronariana, osteoporose, disfunção erétil e obesidade (Donnelly et al., 2009; Loprinzi & Edwards, 2015; Taket al., 2005; Zanesco e Antunes, 2007). Pesquisas pré-clínicas tem contribuído na elucidação dos mecanismos de ação que embasam os efeitos do exercício físico sobre a saúde, os quais dependem da modalidade, intensidade, frequência e duração do treino (Gomes da Silva et al., 2016; Narath et al., 2001).

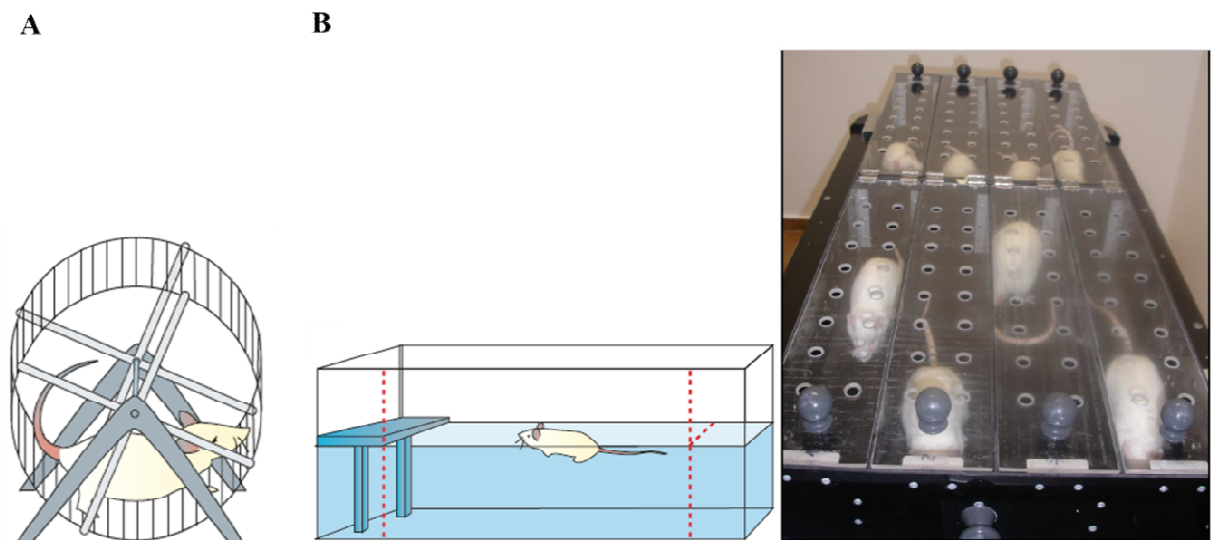
O exercício físico pode ser classificado quanto a intensidade e motivação. Conforme o primeiro critério, o exercício é dividido em leve, moderado ou intenso. Essa categorização é baseada na taxa de consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2m\acute{a}x}$ ), o qual consiste na capacidade máxima de captação e utilização do oxigênio inspirado pelo organismo para gerar trabalho. Protocolos de exercício leve são determinados na faixa de 20% a 50% do  $VO_{2m\acute{a}x}$ , protocolos de exercício moderado na faixa de 50% a 70% do  $VO_{2m\acute{a}x}$  e protocolos de exercício intensos levam ao consumo maior que 80% do  $VO_{2m\acute{a}x}$  (Drummond et al., 2005).

Conforme a fonte de energia utilizada para o exercício físico, ele pode ser ainda classificado em duas categorias: anaeróbico (de resistência) ou aeróbico. O exercício anaeróbico ou de resistência consiste em atividades realizadas em alta intensidade durante períodos curtos como arremesso de peso e lançamento de dardo (8 a 10 segundos), os quais demandam energia proveniente do metabolismo anaeróbico através dos sistemas fosfagênio e glicolítico. Tais vias metabólicas disponibilizam energia de forma rápida aos músculos para esforço máximo, sem a utilização de  $O_2$ . Em contrapartida, o exercício aeróbico envolve atividades físicas prolongadas como corrida de longas distâncias (duração superior a 180 segundos) e utilizam o metabolismo oxidativo como fonte energética. Nesse sistema, o ATP é produzido na presença de  $O_2$  através de uma série de reações a nível das mitocôndrias, o que torna esse sistema mais lento no aporte energético em comparação aos sistemas anaeróbicos. Durante o início de uma atividade física todos os sistemas energéticos estão ativados, mas a intensidade e duração do esforço definirão o sistema predominante (Fundação Vale, 2013).

Estudos experimentais mostram que o exercício de baixa a moderada intensidade tem efeitos positivos para funções cognitivas e patologias como isquemia cerebral e privação de oxigênio e glicose. Por outro lado, exercícios de alta intensidade tem efeitos negativos nesses casos devido ao estresse provocado pelo nível de esforço (Scopel et al., 2006; Shih et al., 2013; Shimada et al., 2013; Soya et al., 2007). No entanto, a função motora pode ser aprimorada por protocolos de exercício físico de alta intensidade (Yang et al., 2012). Isso

sugere que os efeitos do exercício físico dependem da sua intensidade e da susceptibilidade do alvo de estudo.

Quanto à motivação, o exercício pode ser classificado como voluntário ou forçado, sendo que essa classificação se aplica melhor a protocolos utilizados na pesquisa básica (Figura 1). Estudos que avaliam efeitos de exercício forçado costumam realizar treinamento de nado forçado ou corrida em esteira ergométrica adaptada para animais (Figura 1b) (Ke et al., 2011; Radáket al., 2001). Essa categoria tem a vantagem do controle preciso sobre variáveis como intensidade, frequência e duração do esforço (Dishman et al., 2006). Por outro lado, estudos utilizando exercício voluntário geralmente empregam rodas de corrida com livre acesso (Figura 1a) (Mondonet al., 1985; Russel et al., 1987). Nessa última modalidade, o controle das variáveis torna-se complicado devido à natureza voluntária do esforço, o qual é individual e não padronizado pelo experimentador (Dishman et al., 2006).

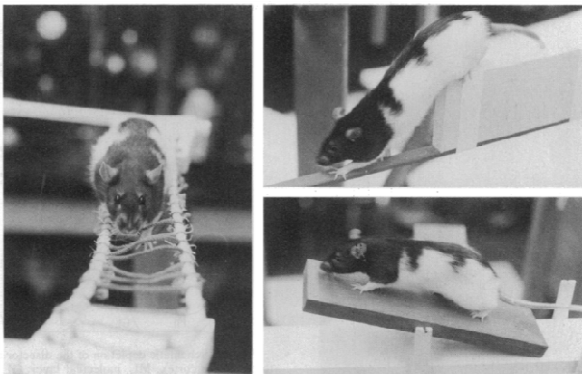


**Figura 1.** Tipos de exercício físico quanto a motivação. A) Exercício físico voluntário em roda de corrida de livre acesso. B) Exercício físico forçado em tanque de natação e esteira ergométrica adaptada para ratos. Adaptado de Brooks e Dunnet (2009) e Spindler (2012).

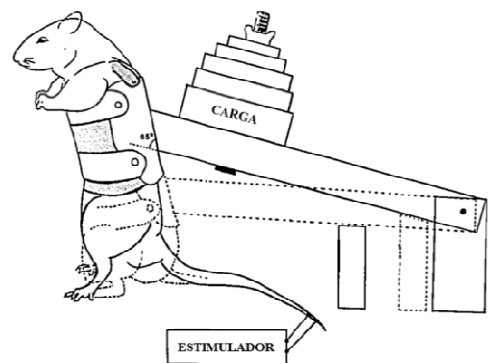
Além de modalidades repetitivas e rítmicas há o exercício acrobático, que consiste no treinamento de animais em circuitos repletos de objetos e obstáculos a serem transpostos (Figura 2a) (Black et al., 1990). Nesse tipo de protocolo o grau de dificuldade progride com o treino, trabalhando o equilíbrio, a coordenação e a aprendizagem motora (Anderson et al., 1996). O exercício acrobático difere dos exercícios forçado e voluntário pelo seu movimento seriado, enquanto que as modalidades forçada e voluntária são constituídas de movimentos contínuos (Lambert et al., 2005). Por fim, existem também os exercícios de força ou

resistência que têm como um objetivo aumentar a força e causar hipertrofia muscular pela utilização de carga (Figura 2b) (Lee et al., 2004). O peso é pode ser adicionado à cauda do animal durante tarefas de natação, em escalada de escadas verticais ou ao tronco do animal em exercícios de agachamento e levantamento de peso por salto vertical em água. Em todos esses protocolos pode-se aumentar a carga gradativamente (Evangelista et al., 2003; Franco et al., 2011; Ilha et al., 2008; Tamaki et al., 1992).

A



B



**Figura 2.** A) Circuito de treinamento acrobático compostos por obstáculos como rampas, gangorras e escadas. B) Exercício de força em sistema de agachamento com sobrecarga. Adaptado de Black et al. (1990) e Tamaki et al. (1992).

Os efeitos do exercício físico também podem ser classificados em agudos e crônicos. Os efeitos dos primeiros podem ser observados logo após a exposição a uma única sessão de exercício físico, enquanto que os efeitos crônicos necessitam de exposição frequente para serem desencadeados (Thompson et al., 2001). No entanto, também é possível se analisar o efeito agudo de um protocolo crônico de exercício físico bem como o efeito tardio de uma sessão única de exercício (Elsner et. al., 2016).

## 1.2. Efeitos do Exercício Físico sobre o Sistema Nervoso

A influência benéfica que o exercício físico exerce sobre a atividade cerebral tem sido muito bem documentada. De fato, o exercício físico provoca interesse nos pesquisadores quanto aos seus efeitos específicos sobre funções cognitivas e também quanto ao seu potencial como estratégia terapêutica não farmacológica frente a patologias neurodegenerativas e/ou psiquiátricas, ou mesmo para manutenção de um encéfalo saudável (Cassilhas et al., 2016).

Em indivíduos saudáveis e senis, a prática de atividade física acelera o processamento cognitivo, aperfeiçoa habilidades mentais, pode levar ao aumento de volume do hipocampo e

do lobo temporal, além de elevar os níveis séricos do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) (Chodzko e Moore; 1994; Dustman et al., 1984; Elsayed et al., 1980; Erickson et al., 2011). Durante uma atividade física, estruturas cerebrais relacionadas a funções motoras e sensoriais como o córtex motor, cerebelo, núcleos da base, córtex somatossensorial, visual e auditivo exibem grande atividade neuronal. Em menor grau, o hipocampo também apresenta aumento da sua atividade neuronal, demonstrada pelo maior metabolismo de glicose e provavelmente pelo maior fluxo sanguíneo nessas regiões, o que as tornam mais suscetíveis a plasticidade induzida pelo exercício físico (Vissing et al., 1996).

De fato, o exercício é uma fonte de estímulo que pode favorecer as reações moleculares envolvidas no processamento da memória (Roig et al., 2013). Como exemplo disso, pode-se citar a elevação da concentração sérica de neurotransmissores como noradrenalina e dopamina e do fator trófico BDNF após uma única sessão de exercício. Tais alterações podem embasar o efeito positivo que o exercício exerce sobre as fases de codificação, consolidação e retenção da memória (Roig et al., 2013; Winter et al., 2007). Além do aumento na produção de outros fatores tróficos como o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), o exercício físico também pode favorecer a neurogênese hipocampal e influenciar positivamente a Potenciação de Longa Duração (LTP) (Gómez-Pinilla et al., 1998; Van Praag et al., 1999b).

Com relação a algumas patologias do sistema nervoso, o exercício físico possui efeito ansiolítico e antidepressivo, proporciona uma melhora cognitiva em portadores de Alzheimer, pode aliviar sintomas motores, de humor e cognitivos em portadores de Parkinson, atenua os sintomas do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e reduz o declínio de habilidades cognitivas e sensorio-motoras causado pelo envelhecimento (Berchicci et al., 2014; de Andrade et al., 2013; Hunsberger et al., 2007; Radak et al., 2001; Raglin, 1990; Reynolds et al., 2016; Yun et al., 2014).

Alguns dos possíveis mecanismos biológicos pelos quais a prática de exercício físico modula a função cerebral têm sido propostos, como por exemplo, a promoção da angiogênese, o aumento na densidade de espinhos dendríticos, o aumento da expressão de BDNF e de marcadores de plasticidade sináptica (sinapsina e sinaptofisina), a influência positiva sobre a neurogênese hipocampal e proliferação astrocítica, bem como a redução do estresse oxidativo e da neuroinflamação (Black et al., 1987; Camiletti et al., 2013; Garcia et al., 2012; Hopkins et al., 2011; Kohman et al., 2013; Li et al., 2005; Van Praag, 1999a). No entanto, a natureza exata pela qual o exercício exerce seus efeitos no encéfalo ainda não foi completamente estabelecida (Morgan et al., 2015).

### 1.3. Exercício Físico Parental

#### 1.3.1. Exercício Físico Maternal

A gravidez é um estado que demanda inúmeras adaptações anatômicas e fisiológicas que tem por objetivo o desenvolvimento fetal. Tais alterações podem ser detectadas logo após a concepção, durante toda gestação e findam quase totalmente nos períodos do puerpério e lactação (Carlin e Alfirevic, 2008; Ouzounian e Elkayam, 2012; Tan e Tan, 2013). Em décadas passadas, as mulheres eram desestimuladas a seguir com práticas de atividade física durante a gravidez, sendo aconselhadas a diminuir ou cessar atividades ocupacionais, especialmente nos estágios finais da gestação. Esse aconselhamento era baseado na crença de em um maior risco de prematuridade devido a um possível aumento da contratilidade uterina pela atividade ou exercício físico (Clarke et al., 2004; Juhl et al., 2008; Spinnewijn et al., 1996).

Somente em meados da década de 90, após o *American College of Obstetrician and Gynecologists* (ACOG) reconhecer que a atividade física regular deveria ser estimulada durante a gestação, a prática começou a ser implantada (ACOG, 1994). De acordo com a ACOG, a atividade física de intensidade leve à moderada é recomendada a todas as grávidas, mesmo as sedentárias que desejam iniciá-la durante a gestação. As gestantes fisicamente ativas antes de engravidar podem manter suas atividades inclusive no primeiro trimestre gestacional. Tanto o exercício aeróbico quanto o anaeróbico são recomendados na gestação e ensaios clínicos têm mostrado que são seguros e não geram efeitos adversos na gestação e nos filhos (Fieril et al., 2014; White et al., 2014; US Department of Health and Human Services, 2008; Uzendoski et al., 1990).

No Brasil, poucas gestantes realizam atividade física e ainda tendem a reduzir suas atividades com o avançar da gestação (Domingues et al., 2007). Isso pode ser relacionado à crença errônea de que o exercício poderia causar parto prematuro, como foi dito anteriormente. No entanto, estudos clínicos têm mostrado que o exercício é benéfico para a gestante, uma vez que diminui os desconfortos relacionados a gravidez, auxilia na manutenção do condicionamento físico e produz bem-estar, e para a prole também, já que diminui a chance de partos prematuros em mulheres com sobrepeso (Guendelman et al., 2013; Heffernan, 2000; Uzendoski et al., 1990).

No âmbito clínico, estudos mostram que os filhos de mães exercitadas têm sua função cognitiva aprimorada. Isso foi evidenciado por um melhor desempenho em escalas de avaliações neonatais, de inteligência e de comunicação oral (Clapp et al., 1999, 1996). A prática de exercício físico durante a gestação também foi relacionada a um incremento no desenvolvimento da linguagem, uma vez que os filhos de mães exercitadas na gravidez apresentavam vocabulário mais complexo aos 15 meses de idade em comparação aos filhos de mães sedentárias (Jukic et al., 2013). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos que o exercício materno pode ter sobre desenvolvimento de outras habilidades cognitivas nas crianças.

Estudos experimentais prévios mostram que protocolos de corrida em esteira ergométrica ou natação durante a gestação podem aumentar a neurogênese hipocampal e os níveis de RNAm de BDNF no hipocampo da prole, além de aprimorar o desempenho dos filhotes em tarefas que avaliam a memória aversiva (esquiva inibitória) e espacial (*T-maze*) (Kim et al., 2007; Lee et al., 2006; Parnpiansil et al., 2003). Gomes da Silva e colaboradores (2016) observaram que os filhotes de mães exercitadas em esteira ergométrica apresentam maior quantidade de neurônios e células da glia no hipocampo, além de possuírem maior conteúdo de BDNF nessa mesma estrutura. Essas alterações podem justificar o melhor desempenho desses animais observado na tarefa do labirinto aquático de Morris (memória espacial) frente aos filhotes de ratas sedentárias.

Protocolos de exercício pré-natal voluntário em roda de corrida também promoveram aumento da neurogênese hipocampal (Bick-Sander et al., 2006) e melhora no desempenho em testes de memória espacial (Akhavan et al., 2008; Robinson et al., 2014) por parte dos filhotes de mães exercitadas. Além de aprimorar a função cognitiva de animais saudáveis, o exercício voluntário durante a gestação foi capaz de proteger neurônios hipocampais contra o dano causado pela hipóxia em ratos neonatos (Akhavan et al., 2012). Também foi verificado que o exercício materno forçado em esteira foi capaz de atenuar o déficit de memória aversiva em filhotes expostos ao Lipopolissacarídeo (LPS) no período pré-natal (Kim et al., 2015).

A gestação é um período crítico para a programação do desenvolvimento do sistema nervoso e uma das janelas de susceptibilidade mais estudadas (Bale, 2015). A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos propostos como mediadores da reprogramação fetal a partir de experiências maternas, como por exemplo: deficiência nutricional, estresse e infecções (Figura 3). Fatores ambientais como os citados anteriormente podem influenciar a maturação e o desenvolvimento do encéfalo por meio das alterações que provocam na metilação original do DNA ou mesmo por adicionar mais grupamentos metis, estabelecendo,

assim, novas marcas epigenéticas, num processo chamado reprogramação (Bale et al., 2010). Os mecanismos precisos pelos quais as experiências maternas podem influenciar a longo prazo a saúde da prole são complexos e dependem, dentre outras características, do tipo de fator ao qual a mãe está se expondo e se o tempo de exposição coincide com a janela de susceptibilidade do desenvolvimento de um determinado sistema. A duração da exposição a um fator ambiental pode definir se sua ação ocorrerá sobre alguns genes específicos ou abrangente a todo o epigenoma. A quantidade de exposição também é importante para estabelecer amplitude de seus efeitos, que podem ser agudos ou mesmo ultrapassar gerações (se houver modificações no epigenoma da linhagem germinativa) (Bale, 2015; Bale et. al., 2010).

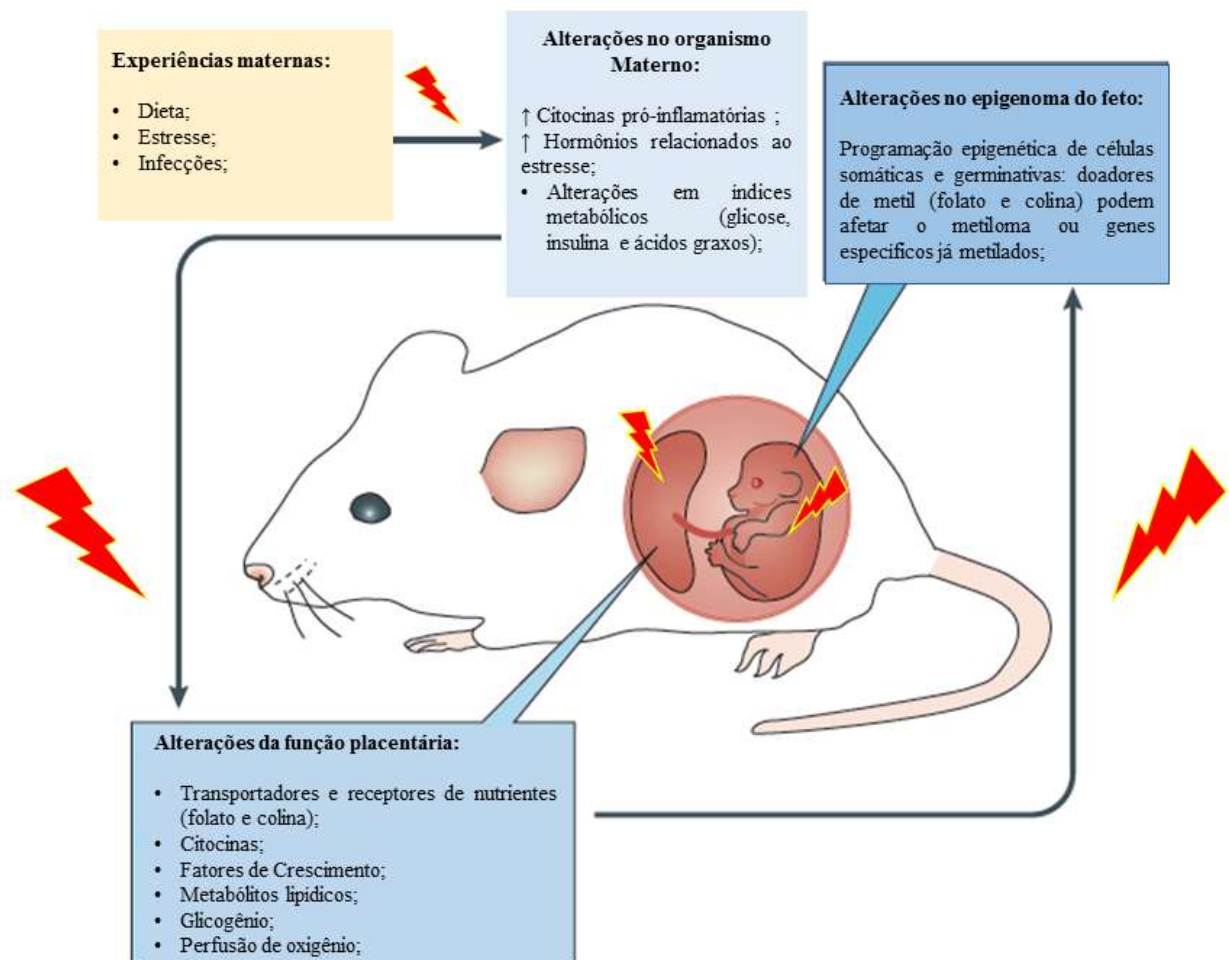
Diferentes fatores ambientais, como o estresse pré-natal, dieta e infecções repercutem em fenótipos semelhantes, o que indica que há uma quantidade restrita de sinais que passam do ambiente uterino materno para o feto em desenvolvimento e que distintos fatores podem compartilhar os mesmos mecanismos a fim de reprogramar o desenvolvimento fetal. É provável que uma célula possa responder a uma gama limitada de sinais bioquímicos e que diferentes fatores ambientais possam agir nas mesmas cascatas de sinalização e nos mesmos efetores que modificam as marcas epigenéticas existentes ou criam novas, programando fenótipos similares a partir de experiências distintas. Os sinais evolutivamente mais importantes são os envolvidos no metabolismo energético, os quais podem definir o futuro condicionamento físico do indivíduo, tais como insulina, glicose, ácidos graxos, glicocorticoides e citocinas inflamatórias (Figura 3) (Bale, 2015).

Estudos pré-clínicos observaram que os filhotes de fêmeas que realizaram exercício voluntário em roda de corrida antes e durante a gestação apresentaram melhor tolerância a glicose, menor nível de insulina, triglicerídeos e menor peso corporal e porcentagem de massa gorda em comparação aos filhotes de ratas sedentárias (Standford et. al., 2015). Quando associado a modelos de obesidade materna, o exercício pré-natal tem se mostrado eficaz em proteger a prole dos efeitos da exposição intrauterina a dieta rica em gordura (Bae-Gartz et al., 2016; Raipura et al., 2015; Standford et al., 2015). Nesses estudos, foi demonstrado que o exercício voluntário materno pode melhorar a tolerância a glicose e aproximar da normalidade os níveis de insulina, de glicose, de GLUT4 muscular, o percentual de gordura e a concentração de IL-6 no soro, hipotálamo e tecido adiposo da prole que foi exposta também a protocolos de dieta materna no período pré-natal para induzir modelo de obesidade materna (Bae-Gartz et al, 2016; Raipura et al., 2015; Standford et al., 2015).

Vega et al. (2015) relataram que as mães exercitadas e expostas a protocolos de dieta rica em gordura tiveram menor aumento do nível de leptina, corticosterona, glicose, insulina, triglicerídeos, colesterol e estresse oxidativo. Além disso, Wasinski et al. (2015) sugerem que o exercício materno (antes e durante a gestação) é capaz de prevenir o desenvolvimento de obesidade na prole que consumiu dieta rica em gordura no período pós-natal. Nessa pesquisa, os filhotes de mães exercitadas mesmo sendo expostos a uma dieta rica em gordura, apresentaram menor peso, massa gorda, consumo calórico e níveis de IL-6 e maior sensibilidade a insulina em comparação com a prole de mães sedentárias que também consumiram a mesma dieta.

Todos esses dados sugerem que o exercício físico também é um fator ambiental que altera o metabolismo e sistema endócrino materno, como ocorre no caso de infecções, estresse e dieta, mas programa o desenvolvimento da prole de maneira positiva. O exercício seria um fator ambiental benéfico por ter efeito oposto aos desses eventos nocivos, ainda que possa agir sobre os mesmos sistemas e moléculas, mas o fazendo de uma forma diferente para reprogramar o epigenoma da prole de forma que essa manifeste um fenótipo positivo, sobretudo, no metabolismo. De fato, segundo Laker et al. (2014), o exercício materno previne distúrbios metabólicos e a hipermetilação do gene *PgC-1 $\alpha$*  nos filhotes, os quais são provocados pela dieta materna rica em gordura.



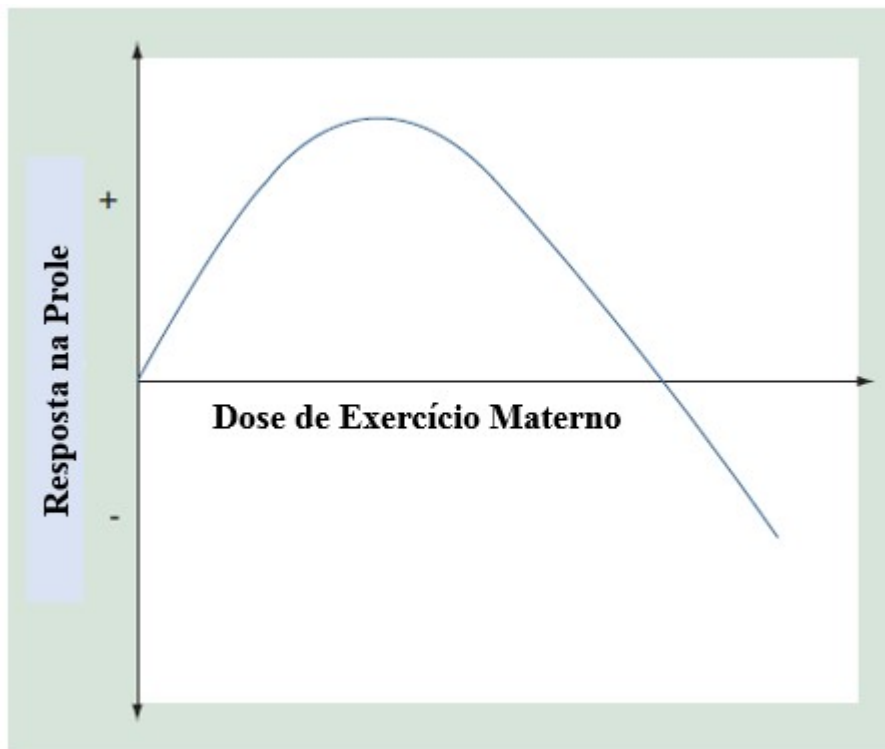


**Figura 3.** Experiências maternas como, por exemplo, subnutrição, exposição ao estresse crônico ou infecções podem alterar o metabolismo materno, levando a um prejuízo da funcionalidade placentária, o que por sua vez, pode modificar a transmissão de fatores de crescimento e nutrientes. Dessa maneira, a programação epigenética de células somáticas e germinativas da prole é modificada, podendo influenciar o seu fenótipo ou ainda de outra próxima geração. Modificado de Bale, 2015.

Quanto a programação do exercício materno sobre o sistema nervoso da prole, já foi relatado anteriormente em estudos pré-clínicos, que essa estratégia leva ao melhor desempenho em tarefas de memória aversiva e espacial da prole bem como eleva os seus níveis hipocámpais de mRNA e do próprio BDNF (Gomes da Silva et al., 2016; Robinson e Bucci, 2014; Akhavan et al., 2008; Kim et al., 2007; Lee et al., 2006; Parnpiansil et al., 2003). Na clínica, foi observado que filhos de mães exercitadas durante a gestação tem sua função cognitiva aprimorada, o que foi evidenciado em avaliações neonatais, de inteligência e de comunicação oral (Clapp et al., 1999, 1996). Esses dados tanto da pesquisa básica quanto da clínica sugerem que o exercício físico durante a gravidez é um estímulo benéfico ao desenvolvimento do sistema nervoso (Gomes da Silva et al., 2016).

Chalk e Brown (2014) sugerem que o exercício pré-natal, quando realizado em intensidade leve a moderada, altera o epigenoma da prole de forma a exercer influência

benéfica sobre o seu desenvolvimento. No entanto, quando o exercício pré-natal é praticado em alta intensidade, seus efeitos sobre a programação epigenética ocorrem em sentido oposto, restringindo o crescimento fetal. Isso deve-se provavelmente ao fato de que o exercício intenso pode ser uma fonte de estresse ao organismo materno. O efeito do exercício gestacional sobre o feto pode ser ilustrado em uma curva dose-resposta. Quanto maior for a intensidade de exercício (dose), mais prejudiciais serão seus efeitos sobre o desenvolvimento da prole (resposta). Já intensidades leves a moderadas (dose mais baixa, nível ótimo de atividade) tem efeitos positivos sobre o desenvolvimento dos filhos (Figura 4). Essa hipótese e a curva dose-resposta foram formuladas com base em dados provenientes de pesquisas pré-clínicas, uma vez que, segundo esses autores, não há estudos investigando os efeitos do exercício materno sobre o epigenoma da prole humana.

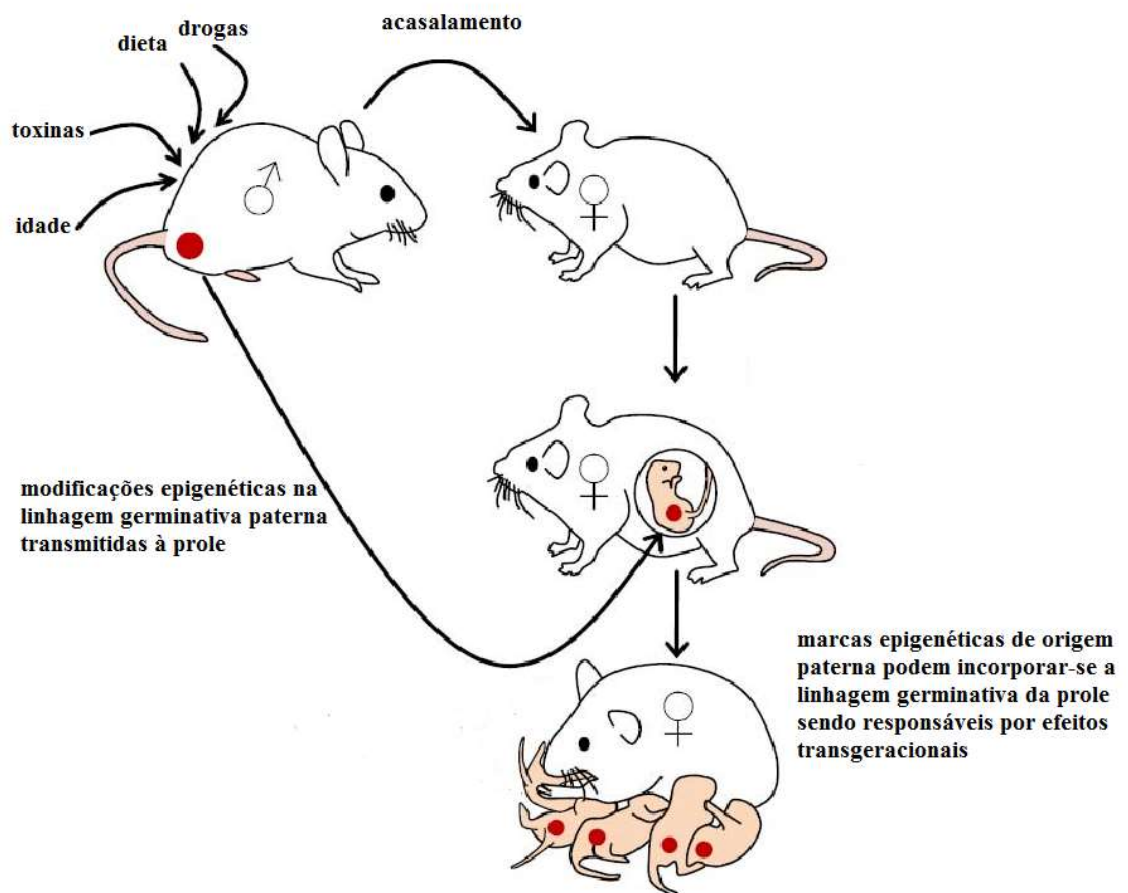


**Figura 4.:** Hipótese sobre a relação entre a dose de exercício materno e efeitos no epigenoma e fenótipo da prole. Adaptado de Chalk e Brow (2014).

### 1.3.2. Exercício Físico Paternal

Recentemente tem aumentado o interesse na observação da influência das experiências de vida/comportamento paternos sobre o desenvolvimento da prole. Estudos têm relacionado a exposição dos pais a fatores ambientais como dieta, drogas e toxinas antes da concepção,

com alterações no fenótipo dos filhos e também dos netos, o que sugere efeitos transgeracionais (Curley et al., 2011; Figura 5). Anderson e colaboradores (2006) mostraram que ao submeter camundongos machos a 24 horas de privação alimentar duas semanas antes da concepção, os filhotes apresentaram alterações em níveis séricos de glicose, corticosterona e Hormônio do Crescimento semelhante a Insulina tipo 1 (IGF-1). Da mesma maneira que a nutrição, a exposição dos pais ao álcool e a cocaína também mostrou-se capaz de afetar a prole, sendo documentados efeitos negativos em testes de memória, aprendizado, desenvolvimento motor e volume cerebral (Abel et al., 2004; He et al., 2006; Meek et al., 2007).



**Figura 5.** Desenho esquemático evidenciando que a exposição paterna a diversos fatores ambientais previamente à concepção pode transmitir informação às próximas gerações via alterações epigenéticas em células germinativas. Modificado de Curley et al. (2011).

A influência paternal pode ser mais precisamente avaliada em relação aos seus efeitos sobre a programação fetal. A vantagem em se utilizar modelos paternos está na ausência de fatores como o parto, cuidado pós-natal e lactação. Uma vez que em ambientes laboratoriais os machos não participam da criação dos filhotes, a transmissão paterna da informação

ambiental a prole ocorreria de maneira pura, sem sofrer influência de vieses como pode acontecer na transmissão materna (Bale, 2015).

Um provável mecanismo que pode explicar como as experiências paternas programam a saúde da prole e/ou de gerações seguintes são as modificações epigenéticas, tais como metilação de DNA, metilação e acetilação de histonas e expressão de microRNAs durante a espermatogênese dos progenitores (Figura 6, 7 e 8 Hughes, 2014). Por exemplo, camundongos obesos expressam de forma anormal 11 microRNAs em seu esperma e, em consequência disso, as duas gerações seguintes apresentam resistência à insulina (Fullston et al., 2013). Por outro lado, o perfil metabólico da prole feminina desses camundongos obesos foi restaurado quando esses foram expostos a natação e/ou alteração na dieta, tendo os níveis de microRNAs espermáticos aberrantes normalizados (McPherson et al., 2015).

Na hipótese de Murashov et al. (2016), é sugerido que experiências paternas, como o exercício físico crônico causariam alterações metabólicas no organismo do progenitor (F0), tais como: aumento da formação de ROS (espécies reativas de oxigênio), danos ao DNA, estresse oxidativo e alterações no eixo hipotálamo-hipófise-testículo (HHT). Esses eventos teriam ação direta sobre o epigenoma dos espermatozoides influenciando a metilação do DNA, as modificações de histonas e os níveis de miRNAs espermáticos. As alterações metabólicas causadas pelo exercício crônico anteriormente mencionadas, podem levar às mesmas epimutações no espermatozoide de uma forma indireta. Nesse processo, as alterações metabólicas provocadas pelo exercício levariam a modificações no sistema endócrino e nervoso, sobretudo no hipotálamo, o qual pode influenciar novamente o metabolismo, numa alça de retroalimentação. Esses sistemas produziriam hormônios, neuropeptídeos e fatores tróficos que induziriam as epimutações, já descritas anteriormente, nas células germinativas. Os autores supõe que as experiências paternas alterem os níveis de miRNA no espermatozoide via eixo HHT. Ambas as formas causam epimutações que podem resultar em transmissão de traços adquiridos a próxima geração (Figura 6).

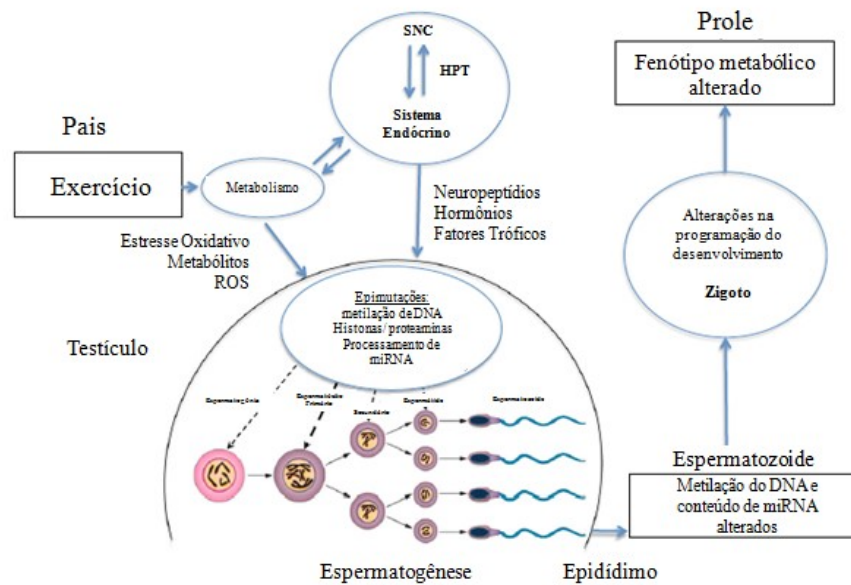
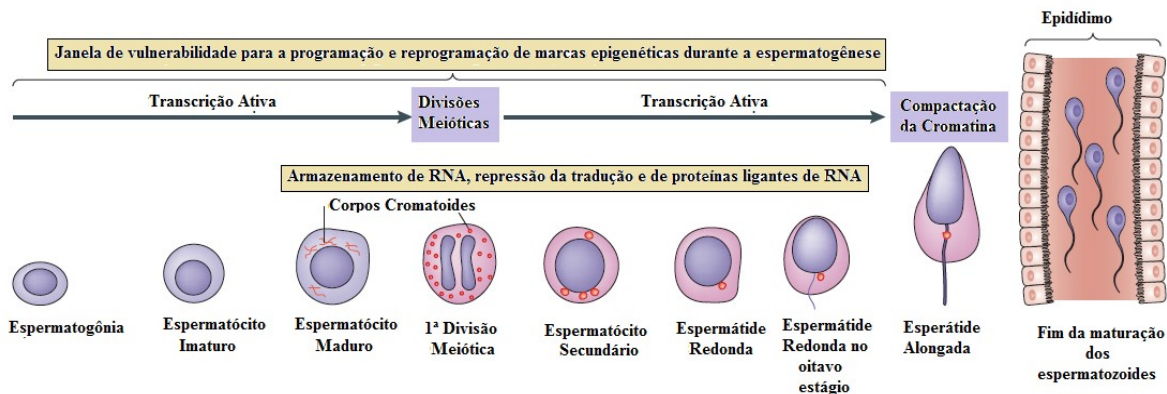


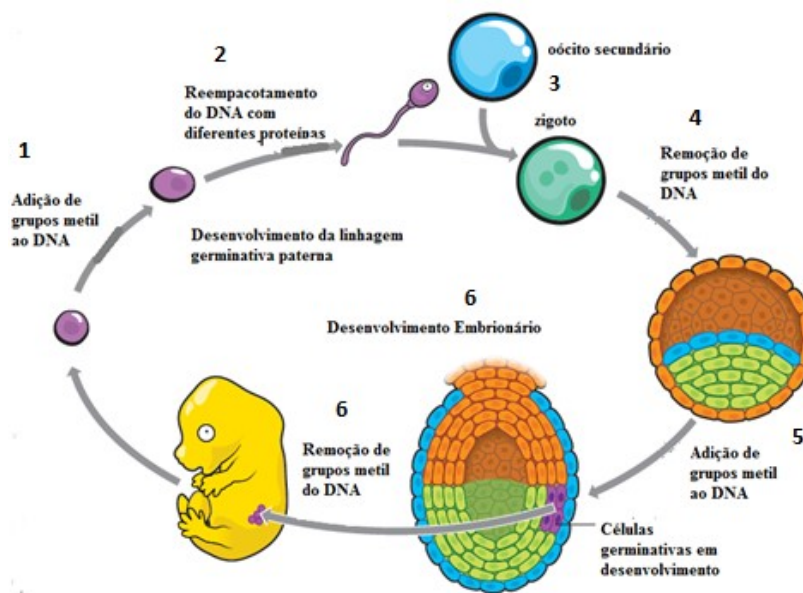
Figura 6: Provável mecanismo pelo qual o exercício físico induz modificações epigenéticas nos espermatozoides. O exercício físico influencia o metabolismo e o eixo HHT na geração F0, que, por sua vez, alteram as marcas epigenéticas no período da espermatogênese. Metilação de DNA, modificação de histonas e dos níveis de RNAs não codificantes nos espermatozoides são as alterações epigenéticas mais importantes que podem causar uma mudança fenotípica na prole. Modificado de Murachov et al. (2016).

Os escassos estudos pré-clínicos e clínicos abordando o papel do exercício físico paterno na programação da saúde da prole investigam seus efeitos metabólicos (Murashov et al., 2016), o desenvolvimento embrionário e fetal (McPherson et al., 2013) e o peso ao nascimento (Fan et al., 2015). Em um estudo desenvolvido por Yin e cols. (2013), o exercício físico forçado em esteira ergométrica nos camundongos pais foi capaz de gerar efeitos positivos no encéfalo dos filhotes machos. Os autores relataram melhora de parâmetros de locomoção, de memória espacial durante a tarefa do Labirinto Aquático de Morris e do conteúdo de BDNF e de reelina (glicoproteína envolvida na plasticidade sináptica) no hipocampo dos filhotes.

A maioria dos estudos dessa temática concentra-se em investigar os efeitos prejudiciais de experiências paternas negativas sobre a vida dos seus descendentes. São poucos estudos com enfoque na influência de um estilo de vida saudável e transmissão de benefícios à saúde das futuras gerações. São necessários estudos que abordem os efeitos da exposição parental a experiências positivas, para que se compreendam os seus mecanismos de ação e posterior utilização como estratégia profilática frente à exposição a fatores ambientais nocivos.



**Figura 7:** Na maioria dos mamíferos, a espermatogênese dura cerca de 6 a 8 semanas. No decorrer desse período, a linhagem germinativa encontra-se suscetível a fatores ambientais que podem modular as suas marcas epigenéticas e, por sua vez, modificar o fenótipo da prole. Adaptado de Bale, 2015.



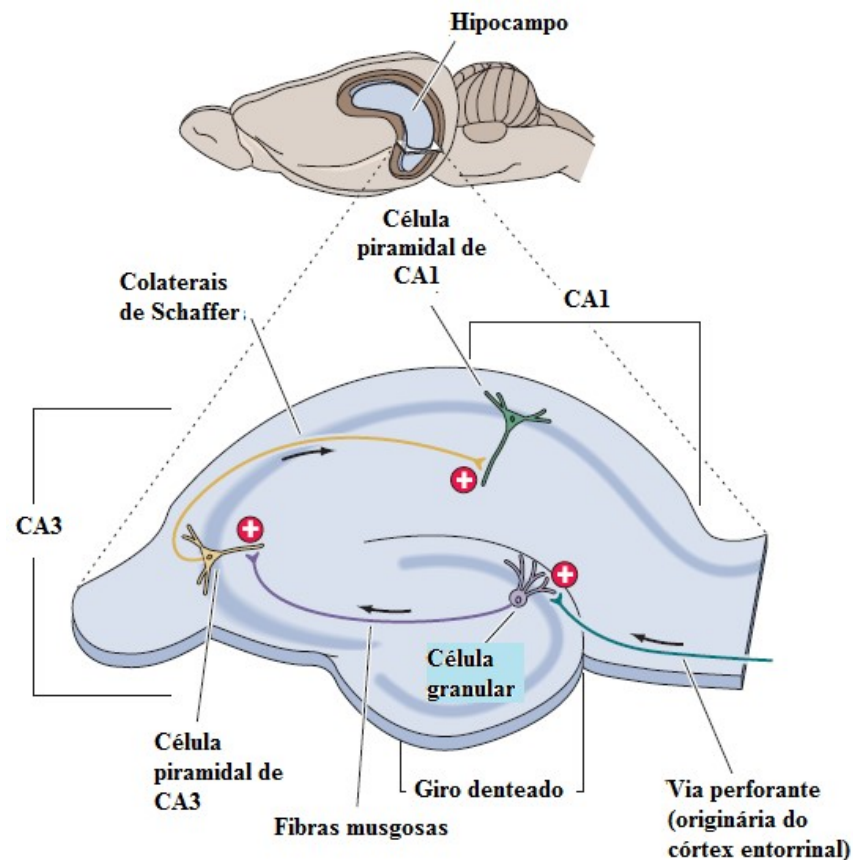
**Figura 8.** Metilação do DNA na linhagem germinativa como um dos mecanismos epigenéticos propostos para a transmissão de informação às próximas gerações. As marcas epigenéticas necessitam passar ilesas pelos ciclos de reprogramação epigenética no zigoto e embrião para poder transmitir a informação à prole. Adaptado de Hughes (2014).

#### 1.4. Hipocampo, Memória e Exercício Físico

Dentre as várias estruturas encefálicas, o hipocampo é uma das mais estudadas e com maior plasticidade na fase adulta, estando relacionada ao processamento da memória espacial (Cassilhas et al., 2016; Leuner et al., 2010). Quanto a sua morfologia, apresenta-se como um córtex trilaminar dobrado sobre si mesmo que localiza-se no lobo temporal dos hemisférios cerebrais (El Falougy et al., 2008; Squire et al., 2004). Segundo sua divisão anatômica é constituído pelo Corno de Amon e giro denteado (GD). O Corno de Amon, por sua vez, é

subdivido em quatro regiões (CA1, CA2, CA3 e CA4) e há um predomínio de neurônios piramidais (Langston et al., 2010; El Falougy et al., 2008; Figura 9). O giro denteado (GD) é constituído por 3 camadas: a molecular (mais externa), a granular (intermediária) e a camada de células polimórficas, também chamada de hilo do giro denteado (GD), a qual é a camada mais profunda e é composta por pelo menos 21 tipos diferentes de neurônios (Amaral e Witter, 1989; Amaral, 1978; Blackstad et al., 1970).

O termo formação hipocampal inclui o giro denteado (GD), o hipocampo, o complexo subicular (subículo, pré-subículo e parassubículo) e o córtex entorrinal. Essas estruturas estão interligadas formando um circuito composto por três vias: a via perforante (que se origina no córtex entorrinal e termina no GD); as fibras musgosas, que seguem das células granulares do GD até CA3; e as colaterais de Schaffer das células piramidais de CA3, que terminam sobre CA1 (Figura 9) e por fim, eferências partem de CA1 com destino ao subículo (Langston et al., 2010). Em cada um desses três contatos sinápticos excitatórios pode-se observar o fenômeno de plasticidade sináptica funcional chamado de LTP, que consiste no aumento da eficácia dessas sinapses e que está envolvido na formação e evocação de memórias (Bennett, 2000; Bliss e Collingridge, 1993).



**Figura 9.** Esquema de um corte coronal do encéfalo de um rato no nível do hipocampo, mostrando as três vias que conectam as diferentes estruturas da formação hipocampal (Adaptado de Purves, 2010).

A região ventral do hipocampo está envolvida principalmente com processos relacionados a ansiedade, enquanto o hipocampo dorsal atua majoritariamente no aprendizado e memória, sobretudo a espacial (Bannerman et al.; 2014). Sendo assim, o hipocampo faz parte do sistema límbico tendo papel crucial em processos emocionais, como o medo condicionado. No processamento de uma informação aversiva, o hipocampo transmite a amígdala informações a respeito do contexto, nela se dá a associação entre o contexto do ambiente e o evento nocivo, enquanto no hipocampo ocorre a consolidação do contexto em que ocorreu o evento nocivo (Sanders et al., 2003).

Além de compor o sistema límbico, o hipocampo também é responsável pelo processamento e consolidação de memórias declarativas. Memórias explícitas ou declarativas se referem ao conhecimento de coisas, indivíduos, lugares e ao significado que eles carregam. Esse tipo de memória pode ser classificada em duas categorias: episódica e semântica. A memória episódica consiste em recordações de eventos experimentados pelo indivíduo em meio a um contexto (tempo e espaço). Já a memória semântica é o oposto, consiste no conhecimento de um fato sem levar em consideração o contexto no qual ocorreu a sua aprendizagem (Sharma et al., 2010).

Em 1976, o grupo de pesquisa de O'Keefe mostrou a existência de neurônios no hipocampo de ratos que respondem somente quando o animal encontra-se numa localização específica do seu meio, denominando esses neurônios como "célula de lugar" e os relacionando com a memória espacial. A memória espacial requer a integridade hipocampal, sendo considerada um tipo de memória episódica, uma vez que diz respeito a retenção de informações sobre a localização em um determinado ambiente (Paul et al., 2009; Sharma et al., 2010). Experimentalmente, a memória espacial pode ser avaliada em testes comportamentais como o labirinto aquático de Morris, labirinto em T, teste de objeto reposicionado, labirinto radial, entre outros (Kim et al., 2006; Parnpiansil et al., 2003; Pereira et al., 2007; Revsin et al., 2009).

Recentemente, estudos têm associado o exercício físico a aprendizagem e a memória espacial, as quais são dependentes do hipocampo (Cassilhas et al., 2016). Lees e Hopkins (2013) atribuíram a melhora de índices acadêmicos, funções cognitivas e psicossociais de crianças à prática de exercício aeróbico. O exercício físico também foi associado positivamente ao desempenho de adolescentes no labirinto aquático de Morris virtual (Herting et al., 2012). Em estudos de neuroimagem, foi observado que o volume hipocampal de crianças ativas fisicamente era maior em comparação às sedentárias e, conseqüentemente, as



primeiras demonstraram melhor desempenho em tarefas de memória (Chaddock et al., 2010). Cassilhas e colaboradores (2007, 2012) observaram que tanto o exercício aeróbico, quanto o de resistência, aprimoram a memória espacial de humanos e roedores.

As diferentes regiões do hipocampo têm uma capacidade plástica e possuem determinados tipos celulares que podem responder de maneira diferente ao exercício físico (Voss et al., 2013). Um estudo prévio mostra que o GD de camundongos pode duplicar a quantidade de neurônios após exposição ao exercício físico (van Praag et al., 1999a). Além de potencializar a neurogênese hipocampal, o exercício físico também aumenta a arborização dendrítica e modula a liberação e utilização de neurotransmissores, induzindo a neuroplasticidade por meio desses e outros mecanismos (Eadie et al., 2005; Meeusen et al., 2005; Meeusen et al., 1995; Stranahan et al., 2007; Stranahan et al., 2006; van Praag et al., 2005).

Filhotes de mães submetidas a diferentes protocolos de exercício físico durante a gestação têm sua memória espacial aprimorada em testes como labirinto em T e labirinto aquático de Morris. Esse achado pode ser atribuído a influência benéfica do exercício materno sobre a neurogênese hipocampal, níveis de RNAm de BDNF e da própria neurotrofina no hipocampo da prole (Gomes da Silva et al., 2016; Lee et al., 2006; Kim et al., 2007; Parnpiansil et al., 2003). Filhos de camundongos machos exercitados anteriormente ao acasalamento também tiveram melhor desempenho no labirinto aquático de Morris, aumento nos níveis de BDNF e da neurogênese hipocampal (Yin et al.; 2013).

Com base nesses dados pré-clínicos, nós acreditamos que o exercício físico parental, de ambos os progenitores, pode programar positivamente a neuroplasticidade no hipocampo da prole e por consequência, o seu desempenho cognitivo, sobretudo a memória espacial. Os parâmetros de plasticidade que supomos ser influenciados beneficemente pelo exercício parental são: a neurogênese hipocampal (proliferação, sobrevivência e diferenciação de células progenitoras em novos neurônios na camada granular do GD) e a plasticidade sináptica (modificação da eficiência de uma sinapse ou formações de novos contatos sinápticos). Esses mecanismos podem ser justificados, dentre outras razões, pelo provável aumento dos níveis de fatores de crescimento, como o BDNF, o qual analisaremos no futuro.

Aqui, avaliamos a expressão de sinaptofisina na região do hilo do giro denteado, como um indicativo de formação de novas sinapses. Também como perspectiva, analisaremos futuramente a expressão de reelina no hipocampo, uma glicoproteína extracelular envolvida na organização/migração dos neurônios durante o período fetal e que, na vida pós-natal, promove a maturação neuronal, modulando a eficiência sináptica pelo aumento da LTP

(Durakoglugil et. al., 2009; Qiu et al., 2007; Qiu et al., 2006). No hipocampo adulto, é expressa no hilo do giro denteado e no estrato lacuoso-molecular do Corno de Amon (Pesold et. al., 1998). Estudos sugerem que a relina tem a importante função de manutenção da integridade sináptica, colaborando assim, com a manifestação comportamental do aprendizado e memória em tarefas espaciais (Pujadas et. al., 2010; Herz & Chen, 2006).

Assim, avaliando os níveis dessas duas proteínas teremos informações complementares a respeito dos efeitos do exercício físico parental sobre aspectos diferentes da plasticidade sináptica: sinaptogênese (sinaptofisina) e integridade e funcionamento da sinapse (reelina). Essa avaliação é importante pois a plasticidade sináptica no hipocampo é considerada fundamental para o processamento da memória (Shih et al., 2013), podendo ser um mecanismo pelo qual o exercício programa positivamente o desempenho cognitivo da prole.

### **1.5. Plasticidade Sináptica e Exercício Físico**

A neuroplasticidade pode ser definida como a capacidade que o sistema nervoso possui de alterar a organização e função (mecanismos e processos fisiológicos) de suas estruturas em resposta a experiência (treinamento, aprendizado ou mesmo a um dano) (Cai et al., 2014). A neuroplasticidade é intensa nos períodos iniciais do desenvolvimento e vai diminuindo com o passar da idade, mas acompanha o indivíduo até o fim da vida (Cai et al., 2014; Gomes da Silva et al., 2016). Há diversos tipos de plasticidade, entre elas, podemos citar a regenerativa, axônica, sináptica e dendrítica (Navarro et al., 2007; Men et et al., 2003; Christopherson et al., 2005; Losonczy et al., 2008). A plasticidade sináptica pode ser a base da formação de memórias. Ela consiste em alterações do funcionamento ou eficiência de uma sinapse que podem durar horas ou períodos maiores, o que é observado nos fenômenos de LTP e Depressão de Longa Duração (LTD) (Malinow e Malenka, 2002). Na fase tardia da LTP pode ocorrer estabilização de sinapses existentes ou até mesmo a formação de novos contatos sinápticos pelo brotamento de espinhos dendríticos (Toni et al., 1999).

A sinaptogênese requer a interação entre neurônios pré e pós-sinápticos por meio de proteínas estruturais, moléculas de adesão e proteínas associadas às vesículas pré-sinápticas (Fang et al, 2013; Kim and Sheng, 2004; Washbourne et al., 2004). A pesquisa básica se vale de marcadores pré-sinápticos (sinaptofisina, sinapsina) e pós-sinápticos (PSD-95, neuroligina I) para analisar a formação de novos contatos sinápticos (Fang et al., 2013; Fernandes et al.,

2013). No presente estudo, a plasticidade sináptica no hipocampo da prole de ratos Wistar foi avaliada utilizando-se como marcador a sinaptofisina. Esse marcador é uma glicoproteína presente nas membranas de vesículas pré-sinápticas do terminal axonal. Sugere-se que modificações no seu conteúdo estão relacionadas a alterações vesiculares (Calhoun et al., 1996; Nithianantharajah et al., 2004; Schmitt et al., 2009; Wiedenmann et al., 1986). A plasticidade sináptica no hipocampo é considerada imprescindível para o processamento da memória (Shih et al., 2013) e estudos básicos têm demonstrado que ela pode ser um dos mecanismos que justificam o melhor desempenho cognitivo por parte dos indivíduos que o praticam, como descrito a seguir.

Hescham et al. (2009) observaram que o exercício voluntário em roda de corrida de livre acesso aumentou os níveis de sinaptofisina no hipocampo de ratos jovens e saudáveis. Revilla e cols. (2014) verificaram que um modelo de Alzheimer causava um decréscimo na expressão de sinaptofisina e PSD-95 no hipocampo de camundongos. Entretanto, os níveis desses marcadores foram restaurados nos animais submetidos a um protocolo de exercício voluntário em roda de corrida de livre acesso.

Protocolos de exercício forçado também se mostraram capazes de influenciar a plasticidade sináptica no hipocampo de animais. A corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos atenuou o declínio da expressão de sinaptofisina, PSD-95, neuroligina 1 e  $\beta$ -neurexina de ratos submetidos a um modelo de estresse (Fang et al., 2013). O exercício de intensidade leve em esteira também produziu um aumento da plasticidade sináptica de animais expostos a um modelo de isquemia cerebral (Shih et al., 2013). Em contrapartida, nesse mesmo estudo de Shih, o treinamento de alta intensidade gerou estresse evidenciado por altos níveis de corticosterona e não teve efeito benéfico sobre a memória espacial e parâmetros de plasticidade sináptica, o que ressalta a diferença dos efeitos quando o mesmo tipo de exercício é feito em intensidades diferentes.

No que se refere à influência do exercício parental sobre a plasticidade sináptica hipocampal da prole, foi observada uma maior expressão de reelina (glicoproteína extracelular envolvida na plasticidade sináptica) na camada granular e de células piramidais do giro denteado (GD) e região CA2 e CA3 do hipocampo de filhotes de mães exercitadas voluntariamente durante a gestação. Entretanto, esse estudo não encontrou diferença significativa entre os níveis de sinaptofisina no hipocampo de filhotes de mães sedentárias ou exercitadas (Herring et al., 2012). Yin et al. (2013) observaram que os filhotes de camundongos machos exercitados previamente a concepção possuíam níveis elevados de

reelina em CA1,CA2,CA3 e GD em comparação com os filhotes de camundongos sedentários.

Não foram encontrados estudos na literatura com o objetivo de avaliar o efeito do exercício de ambos os progenitores sobre a cognição e plasticidade dos filhotes. Entretanto, pelo exposto anteriormente, já tem sido visto que o exercício parental pode causar benefícios à cognição dos descendentes e a plasticidade sináptica pode ser um dos prováveis mecanismos que justificam esse efeito.

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Estudos epidemiológicos relacionam a influência de fatores ambientais no início da vida com alterações genéticas no indivíduo, determinando o padrão de saúde-doença dos descendentes (Ravelli et al., 1976; van Os e Selten, 1998). Essas ideias atualmente estão agrupadas em um ramo de conhecimento científico sob a nomenclatura de “origens desenvolvimentais da saúde e doença” (conhecido pela sigla DOHaD, do inglês *Developmental Origins of Health and Disease*). Esse ramo descreve como o início da vida interage com fatores parentais e ambientais, induzindo ajustes precoces e determinantes de desfechos ao longo da vida.

Essa programação do organismo da prole acontece tanto negativa, induzindo o desenvolvimento de doenças na vida adulta como obesidade, diabetes, doenças mentais, quanto positivamente. Intervenções benéficas nessas janelas de tempo poderiam reduzir os riscos e também limitar a transmissão de doenças para a próxima geração. As pesquisas nesse âmbito possuem implicações substanciais para as sociedades em transição e para a política de saúde global. Porém muito se estuda sobre os efeitos adversos no desenvolvimento e pouco se sabe sobre estratégias para prevenir doenças.

O exercício físico parental poderia programar benéficamente o desenvolvimento fetal. Portanto, é necessário investigar seus mecanismos de ação para talvez utilizá-lo futuramente como estratégia profilática ou terapêutica frente à exposição pré-natal a fatores ambientais nocivos. Além disso, é imprescindível conhecer os efeitos de diferentes modalidades e intensidades de exercício parental sobre a prole, para que se possa orientar essa prática corretamente, sem colocar em risco a saúde dos progenitores e filhos. Visto isso, a hipótese do presente estudo é que a atividade física de ambos os progenitores (pai antes da concepção e mãe durante a gestação) module benéficamente o desenvolvimento da prole, a função cognitiva e a plasticidade sináptica no hipocampo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar se o exercício físico parental exerce efeito benéfico no desenvolvimento, na memória espacial e na plasticidade sináptica do hipocampo de filhotes de ratos Wistar.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Analisar os efeitos do exercício físico paterno (prévio à concepção) e materno (durante o período gestacional) sobre:

- O peso absoluto e relativo das glândulas adrenais das progenitoras, como uma medida indireta do nível de estresse;
- O ganho de peso corporal e a função sensório-motora dos filhotes, no intuito de averiguar se o protocolo de exercício físico afeta o desenvolvimento da prole;
- A memória espacial dos filhotes;
- A expressão da proteína sinaptofisina na região do hilo do giro denteado (GD) do hipocampo dos filhotes;

#### **4. MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO**

**4.1. Artigo: Parental exercise is safe for the physical and sensorimotor development but does not alter synaptic plasticity or the spatial memory of Wistar rat offsprings.** Ethiane Segabinazi, Christiano Spindler, Francele Valente Piazza, André Luís Ferreira de Meirelles, Filipe Mega, Otávio Américo Augustin, Gabriela dos Santos Salavaggio, Matilde Achaval, Simone Marcuzzo.

*Artigo a ser submetido à Brain Research.*

**Parental exercise is safe for the physical and sensorimotor development but does not alter synaptic plasticity or the spatial memory of Wistar rat offsprings.**

Ethiane Segabinazi<sup>a,b</sup>, Christiano Spindler<sup>a,b</sup>, Francele Valente Piazza<sup>a,b</sup>, André Luís Ferreira de Meirelles<sup>a,b</sup>, Filipe Mega<sup>a,b</sup>, Otávio Américo Augustin<sup>b</sup>, Gabriela dos Santos Salavaggio<sup>b</sup>, Matilde Achaval<sup>a,b</sup>, Simone Marcuzzo<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

**Communicating author:**

Simone Marcuzzo

Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS. Brazil.

E-mail: [simone.marcuzzo@ufrgs.br](mailto:simone.marcuzzo@ufrgs.br)

Tel.: +55-51-33083624



## Abstract

Our aim was to analyze the effects of parental exercise during pregestational (father) and gestational (mother) periods in the prenatal stress level, physical/sensorymotor development, spatial memory and synaptic plasticity in the hilus of the dentate gyrus (DG) hippocampus region of offspring. Adult male Wistar rats were submitted to running on a horizontal motorized treadmill (5 m/min for 20 min/day - 60%  $VO_2$ max, 5 consecutive days/week) in a period of 22 days prior to conception. Pregnant rats were submitted to running on a horizontal motorized treadmill (6,6 m/min for 20 min/day - 30%  $VO_2$ max, 5 consecutive days/week) during the whole pregnancy. After birth, the male pups were divided in four groups: (1) offspring from sedentary parents (SS); (2) offspring from sedentary father and exercised mother (SE); (3) offspring from exercised father and sedentary mother (ES); (4) offspring from exercised parents (EE). A week after weaning (P21), mothers were decapitated and their adrenal glands were removed and weighed as a measure of stress. The male pups were weighted at day of birth (P0), at P7, P14 and P53 and assessed for neonatal developmental milestones from postnatal day 1 to 21. Between P47 and P51, the spatial learning and memory of the offspring was assessed using the Morris Water Maze. The synaptophysin expression in the hilus of DG region of the hippocampus was analyzed using images from immunohistochemistry by optical densitometry. There was no difference between groups regarding absolute or relative weight of adrenal glands from the mothers, body weight and day of presentation of developmental milestones, the performance in the Morris water maze and synaptophysin expression of the offspring. These results suggest that our parental exercise protocol has no effect on the development and not change the hippocampal synaptic plasticity of pups.

**Keywords:** Parental Physical Exercise, Sensorimotor Development, Spatial Memory, Synaptic Plasticity.

## 1. Introduction

Brain development is a plastic event that starts in the intrauterine environment, continues until the end of adolescence and to a lesser degree, the whole life. Exposure to several environmental factors in this time window can influence the functional maturation of the brain and define its integrity throughout life (Andersen, 2003; Gomes da Silva et al., 2016). Preclinical studies show that prenatal exposure to stress, gestational diabetes and infections cause functional deficits in the nervous system of the offspring (Bale, 2005; Kim et al., 2015; Kim et al., 2014). Overweight and maternal obesity during pregnancy were also related to behavioral deficits in the offspring such as anxious behavior and changes in associative learning and motivation (Rodriguez et al., 2012).

While the transgenerational outcomes of maternal experiences are well documented, few studies have investigated possible paternal ways of information transmission (Bale, 2015). Epidemiological researches reported that father's exposition to several chemicals in the preconceptional period such as toxins, drugs and endocrine disruptors, are related to changes in the developmental and behavioral phenotypes of their children (Curley et al., 2011; Little, 1987; Pembrey et al., 2006). When male mice and rats were exposed to alcohol or cocaine prior to conception, their offspring showed changes like hyperactivity, aggressiveness, poor stress tolerance, impaired spatial working memory and visuospatial attention, developmental delay and decreased brain volume (Abel, 2004; Abel, 1989; He et al., 2006; Meek et al., 2007).

Most of the studies address the harmful effects of negative experiences of parents in the development of the offspring. Little is known about the effects of a healthy parental lifestyle and the transmission of benefits to future generations. However, some human and animal studies have shown that environmental stimuli such as physical activity during pregnancy seems to modulate positively the brain development (Gomes da Silva et al., 2016). Clap et al. (1999, 1996) showed that children of mothers exercised in the prenatal period have best outcomes in neurodevelopmental evaluations with five days of life and showed better cognitive performance in oral communication and general intelligence in evaluations at five years old.

In animal studies, it was observed that treadmill running or swimming during pregnancy improved the performance of the pups in the T maze test and inhibitory avoidance. Besides, it increased hippocampal neurogenesis in the offspring and BDNF mRNA levels in

this brain structure (Lee et. al., 2006; Kim et. al., 2007; Parnpiansil et. al., 2003). Voluntary exercise in a free access running wheel during pregnancy also had positive effects on hippocampal neurogenesis and cognitive tasks that assessed spatial memory (Akhavan et al., 2008; Bick-Sander et al., 2006; Robinson et al., 2014). Pups of male mice trained a in a treadmill prior to mating had a better performance in mobility and spatial memory ratings in the Morris Water Maze test and an increase in BDNF and reelin (glycoprotein involved in synaptic plasticity) levels in the hippocampus (Yin et al., 2013).

Thus, the hypothesis of the present study was that physical activity of both parents (father prior to conception and mother during the pregnancy) is able to program the offspring brain, producing positive outcomes in development, cognitive skills and synaptic plasticity in the hippocampus.

## 2. Results

### 2.1. Mother's Adrenal Glands Weight

The unpaired T test revealed that there is no significant difference between groups in relation to absolute (S:  $0.095 \pm 0.009$  g, n = 6; E:  $0.104 \pm 0.012$  g, n = 7;  $t_{(11)} = 0.539$ ,  $p = 0.600$ ) or relative weight of mother's adrenal glands (S:  $0.0003 \pm 0.00002$  g, E:  $0.0003 \pm 0.0004$  g;  $t_{(11)}=0.875$ ,  $p = 0.399$ ) one week after weaning. This suggests that moderate exercise in gestational period did not cause significant stress in the mothers.

### 2.2. Physical and sensorimotor development

ANOVA for repeated measures showed no significant difference between groups for body weight at birth (P0), P7, P14 and P53 (Table1,  $F_{(1,47)} = 0.062$ ,  $p = 0.803$  to *Maternal exercise factor*;  $F_{(1,47)} = 0.668$ ,  $p = 0.417$  to *Paternal exercise factor*;  $F_{(1,47)} = 0.346$ ,  $p = 0.558$  to *Maternal exercise x Paternal exercise interaction*). According to two-way ANOVA, there was also no significant difference between groups as the presentation day of all developmental milestones (Table 2).

### 2.3. Spatial memory assessment

#### 2.3.1. Information Acquisition

As shown on Figure 2a, ANOVA for repeated measures showed that the mean of escape latency at each of the four training days was similar among the four groups ( $F_{(1, 24)} = 0.505$ ,  $p = 0.484$  for *Maternal exercise factor*;  $F_{(1, 24)} = 2.297$ ,  $p = 0.142$  for *Paternal exercise*

factor;  $F_{(1, 24)} = 1.437, p = 0.242$  for *Maternal exercise x Paternal exercise interaction*). A significant effect of *Time factor* ( $F_{(3,72)} = 23.440, p < 0.0001$ ), but not for the interactions *Time factor x paternal factor* ( $F_{(3,72)} = 0.306, p = 0.820$ ), *Time factor x maternal factor* ( $F_{(3,72)} = 1.76, p = 0.160$ ) and *Time factor x Paternal factor x Maternal factor* ( $F_{(3,72)} = 2.041, p = 0.115$ ) was found.

When analyzing the learning curve from each group separately, a significant decreased in the latency to find the platform was observed in the third day compared to the first one for control offsprings (SS,  $p = 0.03$ ) and offsprings of exercised parents (EE,  $p = 0.002$ ), and in the fourth day of training for offsprings from sedentary fathers and exercised mothers (SE,  $p = 0.03$ ). There was no difference in the time spent to find the platform among the four training days for offsprings of exercised fathers and sedentary mothers (ES,  $p > 0.05$ ).

### 2.3.1. Information Retention

Regarding the time spent in the opposite quadrant in the probe trial, two-way ANOVA revealed significant effect of *Maternal exercise x Paternal exercise interaction* ( $F_{(1,26)} = 6.302; p = 0.018$ ), but not for isolated factors (*Maternal exercise factor* -  $F_{(1,26)} = 1.290; p = 0.266$ ; *Paternal exercise factor* -  $F_{(1,26)} = 0.070; p = 0.79$ ; Figure 2b). However, in the Tukey's *post hoc* test, no significant difference between the groups were found ( $p > 0.05$ ). Concerning the time spent in the target quadrant during the probe trial, there was no significant difference between groups even in two-way ANOVA (*Maternal exercise factor* -  $F_{(1,26)} = 0.305, p = 0.585$ ; *Paternal exercise factor* -  $F_{(1,26)} = 0.899, p = 0.351$  and *Maternal exercise x Paternal exercise factor* -  $F_{(1,26)} = 1.360; p = 0.254$ ; Figure 2c).

### 2.4. SYP immunoreactivity in the hilus of DG of hippocampus

According to the two-way ANOVA, experimental groups had similar synaptophysin expression in the hilus of the dentate gyrus (Figure 3a), once there was no significant difference in the optical densitometry measurements (*Maternal exercise factor* -  $F_{(1,15)} = 4.535, p > 0.05$ ; *Paternal exercise factor* -  $F_{(1,15)} = 1.909, p = 0.187$  - *Maternal exercise x Paternal exercise interaction* -  $F_{(1,15)} = 1.911, p = 0.911$ ; Figure 3c).

## 3. Discussion

To our knowledge, this is the first study that examined the effects of parental exercise (paternal and maternal in preconceptional and gestational periods, respectively) on development, spatial memory and synaptic plasticity of the offspring. Physical exercise

during pregnancy did not change the weight of adrenal glands of mothers. In addition, no differences were found in relation to the weight gain of the pups, day of presentation of each developmental milestone and in the synaptophysin expression in the hilus of the dentate gyrus of pups. The spatial memory data are yet preliminary due to the need to increase the sample used.

Exercise can be a physiological stressor (Rönn and Ling, 2013) and it is known that exposure to stress in the uterus may cause permanent physiological and developmental damages to the offspring (Said et al., 2015). The gestational exercise protocol used in this study was of low intensity and therefore probably did not cause significant stress in the mothers, once the absolute and relative weight of adrenal glands did not change. Then, we believe the pups of exercised parents were not exposed to prenatal stress because their development was similar to those observed for control pups. Rosa et al. (2011) also showed that the voluntary physical exercise in pregnant rats positively influences fetal growth without increasing levels of maternal corticosterone, that is, without starting a maternal physiological response to stress. Furthermore, the parental exercise protocol used in this study did not affect the length of gestation, litter size and it was not observed any vaginal bleeding, abortions or stillborn pups (data not shown).

The offspring from different groups showed similar body weight and development. Adequate body weight is considered an indicative of normal growth, so that malnutrition can lead to delayed motor development (Gramsbergen et al., 1992; Rousset et al., 2013). Our result is consistent with the hypothesis of Chalk and Brown (2014), in which physical exercise during pregnancy only causes damage to the offspring when it is done at high intensity. Also, clinical studies (Hellenes et al., 2014; Lokey et al., 1991) have shown that regular moderate exercise during pregnancy is not harmful to mother and fetus and does not have an adverse effect on the neurodevelopment of the child. Clapp et al. (1998) observed normal growth and development of one-year-old children from pregnant exercised mother. We did not find studies about paternal exercise effects on the physical sensorymotor development of its descendants.

The learning curve analysis of each group showed that SS (offspring from sedentary father and mother), SE (offspring from sedentary father and exercised mother) and EE (offspring from exercised father and mother) groups learned the location of the platform. However, the SE group have not learned faster than the control (SS) e EE groups. Surprisingly, the offspring from exercised fathers and sedentary mothers (ES) did not learn the platform location, since there was no difference between the latency to find it during the

training period. The escape latency mean at each of the four training days and the time spent in the opposite and target quadrants was similar between the groups, suggesting that parental training did not influence the information acquisition or retention in the Morris Water Maze test. However, these data are preliminary because the control group has only 4 animals and group sizes used in Morris Water Maze analyses normally have 15-20 animals per group (Gomes da Silva et al., 2016; Pereira et al., 2007).

An increase in the sample size would lead to a greater reliability of our data, that are opposed to some studies that report improved performance of pups from exercised mothers in cognitive tasks, such as inhibitory avoidance, novel object recognition, T maze and Morris water maze (Lee et al., 2006; Kim et al., 2007; Parnpiansil et al., 2003; Robinson et al., 2014). Besides the sample size, this discrepancy in results can be attributed to the exercise protocols used in each of these studies, which differ in the nature of the exercise (some being voluntary, forced treadmill or swimming), intensity, frequency, total and daily time of submission to exercise and evaluation period of the puppies.

On the other hand, Gomes da Silva et al. (2016) did not observe significant differences between the performance of offspring from exercised or sedentary mothers in the inhibitory avoidance. In the water maze test, it was found that the offspring of exercised mothers learn the platform location faster than the control group, showing better ability to acquire information, ie, better learning. Nonetheless, it did not differ from the offspring of sedentary mothers in other parameters that evaluate the retention of information, ie, spatial memory. Those results were also found by Akhavan et al. (2013).

About the effect of paternal exercise on the cognition of offspring, Yin et al. (2013) observed a better performance in the Morris water maze test in the offspring of exercised male mice, which also differs from our result. In the study of Yin et al. (2013) male mice were exercised on a treadmill for 6 weeks, 5 days a week, 60 min/Day to 12 m/min (75% VO<sub>2</sub>max). In the paternal preconception exercise protocol used in our study, the animals were exercised on the treadmill for 22 days, 5 days a week, 20 min/day to 5 m/min (60% VO<sub>2</sub>max). The protocol used by Yin et al. (2013) has twice the total period of training and more than twice the duration of daily exercise session and speed of our protocol. These factors together with higher intensity might have been responsible for the observation beneficial effects on spatial memory of the offspring of exercised mice in the study of Yin et al. (2013). This suggests that perhaps our paternal exercise protocol has not been strong enough to program the development of the offspring in order to see positive effects on your memory.

In our study, parental exercise did not change the synaptophysin expression in the hilus of the offspring DG. Similarly, Herring et al. (2012) observed no significant difference between synaptophysin levels in the hippocampus of pups from exercised and sedentary mice. However, the pups from exercised mothers had higher expression of Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) and reelin in the hippocampus. Yin et al. (2013) also found increased expression of reelin in CA1, CA2, CA3 and DG regions of hippocampus in pups from male mice trained in preconceptional period compared to pups from sedentary male mice. These set of data suggest that parental exercise is able to promote synaptic plasticity by specific modification of some proteins involved in synaptogenesis, such as reelin. Nevertheless, synaptophysin does not seem to be one of the markers affected by parental exercise. Synaptophysin is a protein present in presynaptic vesicles and may be related to the formation of new vesicles and activity-dependent synapses (Fernandes et al., 2013; Tarsa e Goda, 2002).

The ARC protein is a cytoskeletal protein, a marker of neuritic arborization, whereas reelin is an extracellular glycoprotein capable of modifying the efficiency of already existing synapses (Yin et al, 2013; Herring et al., 2012). In these studies, these plasticity parameters were positively influenced by parental exercise. However, other studies evaluating other synaptogenesis markers in the hippocampus of pups of exercised parents, such as PSD-95 (postsynaptic density protein 95) and synapsin (present in presynaptic vesicles) are needed to confirm this or not (Fang et al., 2013, Fernandes et al., 2013).

There is no consensus in the literature even on the effects of exercise on synaptic plasticity in healthy animals. Studies have shown increased expression of markers pre and post-synaptic as synaptophysin, SNAP25,  $\beta$ -neurexin, neuroligin, GluN2B and PSD-95 in the hippocampus of exercised animals on a treadmill or a free-running wheel (Fang et al., 2013; Hu et al., 2009). However, Fernandes et al. (2013) found no significant differences in the expression of synaptophysin, synapsin and PSD-95 in the hippocampus of animals exercised on a treadmill. Mice exercised voluntarily also did not show any change in their levels of hippocampal synaptophysin and PSD-95 (Revilla et al., 2014). These inconsistent data points to the need for more studies in order to understand the mechanisms by which exercise can influence synaptic plasticity.

## 4. Conclusion

This study investigates for the first time the influence of parental exercise (both progenitors) on offspring development, cognition and synaptic plasticity. We showed that moderate paternal and mild maternal exercise has no effect on physical and sensorimotor development of the offspring. This finding is very positive in the sense that corroborates previous data showing that physical exercise of low intensity during pregnancy is not harmful to mother and offspring, may be recommended. Our data also shows that the paternal moderate exercise is also safe development of the offspring. This information along with literature too can encourage an active lifestyle and healthy by parents. However, we can not verify positive effects of parents exercise in the spatial memory and synaptic plasticity of the offspring. Further studies should be performed using different protocols in different periods to a better understand the parents exercise influences in the neurodevelopment of the offspring.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the members of Laboratory of Comparative Histophysiology and Matilde Achaval, MD, PhD, CNPq1A researcher. This research was supported by Brazilian funding agency: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 5. Experimental Procedure

### 5.1. Ethical Considerations

All procedures performed in this study were previously approved by the Ethical Committee at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (27587). All rats were treated according to policy guidelines of the Society for Neuroscience and EC Directive 86/609/EEC for animal experiments. We did all efforts in order to minimize the animal suffering and also to reduce the number of animals.

### 5.2. Animals

Initially, nine adult Wistar male rats and thirteen female obtained from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil), with 60 days old, were used. The animals were accommodated in standard plexiglass housing boxes (410 x 340 x 160 mm), 3-4 rats per cage, under a 12:12 h light/dark cycle, in a temperature-controlled environment ( $20 \pm 1$  °C), with food and water available *ad libitum*.



### 5.3. Parental Physical Exercise Protocol

After the acclimatization period to the environment (7 days), males and females were randomly divided between sedentary and exercised. In order to determine the race speed, the indirect measurement of maximum oxygen consumption ( $VO_2$  max) was used. In this evaluation, animals were placed individually on the treadmill and the speed was increased progressively (3 m/min) every 3 minutes until exhaustion (the animal refuses to run on the treadmill) (Elsner et al., 2011). The latency to fatigue (min) and the maximum speed (m/min) achieved by each animal are considered the performance parameters.

The pre-conceptual exercise protocol for males ( $n = 6$ ) consisted of running on a horizontal motorized treadmill for 20 min/day, 5 consecutive days/week in a total period of 22 days. During the first four minutes of a daily exercise session, the rats ran at a speed of 1.75 m/min. From the fourth to the sixteenth minute the speed was 5 m/min (60%  $VO_2$ max) and the remaining four minutes were ran again at 1.75 m/min (adapted from Parnpiansil et al., 2003). The sedentary males ( $n = 3$ ) were handled exactly as the experimental animals and they were left on the treadmill for 5 min without any stimulus to run (Elsner et al., 2011).

After the males exposition to physical exercise (Figure 1), the estrous cycle of females was checked daily and in proestrus phase they were housed overnight with a male to mate. The day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the conception day, day 0 of gestation (G0).

Females exercised during pregnancy ( $n = 7$ ) were submitted to a forced exercise protocol on a treadmill for 20 min/day, 5 consecutive days/week, between G1 and G21. During the first four minutes of a daily exercise session, the rats ran at a speed of 3.09 m/min. From the fourth minute to sixteenth the speed was 6.6 m/min (30%  $VO_2$ max) and in the remaining four minutes females ran again to 3.09 m/min (adapted from Parnpiansil et al., 2003). The sedentary females ( $n = 6$ ) also were left on the treadmill for 5 min without any stimulus to run. A week after weaning, mothers were decapitated and their adrenal glands were weighed to get their absolute and relative weight (weight of the two adrenal glands added in g/body weight in g) to control the stress level (Revsin et al., 2009).

### 5.4. Experimental Groups

The experimental groups in this study were composed of 78 puppies from 13 different litters. Part of pups were allocated to cognitive analyzes, while others to neonatal and

histological analysis. Litters belonging to the same group were offspring of different males. The day of birth was considered postnatal day 0 (P0). Litters were standardized between 5 and 8 animals each, which remained with the mother until the P21, when they were weaned. The pups were divided into four groups according to the fulfillment or not of parental physical activity: (1) offspring from sedentary father and mother (SS); (2) offspring from sedentary father and exercised mother in pregnancy (SE); (3) offspring from exercised father and sedentary mother in the gestational period (ES); (4) offspring from exercised father and exercised mother in the pregnancy (EE).

### 5.5. Neonatal Development

The body weight of the pups was analyzed in P0, P7, P14 e P53 (before euthanasia). The sensorymotor development of the animals was evaluated daily at from P1 to P21, based in Marcuzzo et al. (2010) and Poggi et al. (2005). Briefly, the developmental milestones was evaluated as follow: (1) surface righting - pup capacity, positioned in supine, to return to prone position again (2) cliff aversion - pup capacity, positioned with the snout and forepaws on the edge of a surface, to move away from the edge avoiding a fall; (3) forelimb grasp - pup ability to hold on to a cable located 15 cm from the surface by the forepaws for at least 1 second; (4) stability on an inclined surface (negative geotaxis) – pup ability, positioned on an inclined surface 45° upside down, to turn around and climb; (5) hind limb proprioceptive placing - reflection of placing the hindlimb in response to proprioceptive stretch; (6) open-field activity assessment - pup ability to exit a circle of 13 cm in diameter; (7) audio startle - involuntary jump of the pup in response to the sound of a metal object dropped for 10 cm of distance from the animal; (8) eye opening - it is noted the day on which the animals completely open their eyes. It was verified the postnatal day on which the animals could perform for the first time each task within a maximum time of 30s. Both the weight and the analysis of developmental milestones were composed of an *n* of 11 to 13 animals per group. Each group is formed from 2-4 litters diferentes, which may have 2-7 animals from each litter in order to avoid the litter effect.

### 5.6. Spatial memory analysis

Between P47 and P51, the pups were submitted to Morris Water Maze test in order to assess spatial memory, based on Pereira et al. (2007) (Figure 1). The maze consists of a

circular pool of 120 cm in diameter and 40 of depth, containing water at 23°C of temperature, divided into four quadrants and had four points named as starting positions (N, S, W and E) that are starting points during training period. The apparatus is in a room containing visual cues on the walls, which serve as a reference for the animal. In a specific quadrant (target quadrant), a platform of 10 cm in diameter is placed 2 cm below the water surface. The test was performed during five days, the first four days were destined to animal training and the last day was the test itself. Each day of training, animals were submitted to 4 trials, with 15 min of interval among the trials. A trial consisted of placing the rat with the head directed towards the wall of the pool from one of the starting points and measuring the time spent to find the platform. If by the end of one minute it had not found the platform, the animal was then driven gently to it where the rat remained for 10s. At the end of each trial, the rats were dried and returned to their housing boxes. The mean of daily latency to find the platform (taking into account the four trials of each training day) was verified. In the last day, each animal were tested by exposed to only one trial, which is placed at starting point N in the opposite quadrant to the platform location, but without the platform. In this trial, it was recorded the time spent by the animals in the opposite and target quadrants in order to assess the retention of information. All trials of the five days were registered by a video acquisition system for posterior analysis. In this test, the SS group were composed by 4 rats, the SE and ES by 9 each and the EE group by 6 animals. In this evaluation each group is formed from 1-3 litters diferentes, which may have 1-6 animals from each litter in order to avoid the litter effect.

### 5.7. Histological Procedures

At P53, 4-5 animals from each group were deeply anesthetized with sodium thiopental (50mg/kg i.p.; Cristália, Brazil) and lidocaine (10mg/mL) injected with 1000 U of heparin (Cristália, Brazil). Using a peristaltic pump (Milan, Brazil, 30mL/min), the animals were then submitted to transcardiac perfusion with 200 mL of saline solution followed by 250mL of 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) diluted in 0.1M phosphate buffer (PB; pH 7.4). After dissection, brains were post-fixed in 4% paraformaldehyde for 4 hours at room temperature, cryoprotected by immersion in increasing concentrations of sucrose solutions (15% and 30%) (Synth, Brazil) diluted in PB at 4°C until the samples sink. Subsequently, the brains were frozen in isopentane (Merk, Germany) cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing for immunohistochemistry. In a cryostat (CM1850, Leica, Germany), slices of the dorsal hippocampus (2.30 to 4.52 mm posterior to the bregma; Paxinos and Watson, 1982)

with a thickness of 40  $\mu\text{m}$ , were performed. Every fourth section (160  $\mu\text{m}$  apart) were collected in previously gelatin coated slices for posterior immunohistochemistry.

#### 5.8. Synaptophysin (SYP) Immunohistochemistry

Immunohistochemistry for synaptophysin was performed in order to identify changes in presynaptic vesicles, as synaptogenesis indicator, based on Piazza et al. (2014). The slices were washed in PBS twice and incubated with 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluted in PBS for 30 min to block endogenous peroxidase activity. Then, samples were washed again in PBS followed by two washes in PBS with 0.4% Triton-x (PBS-Tx). The sections were incubated during 48h with primary antibody (anti-SYP, mouse, 1:200, Sigma Aldrich, USA) in bovine serum albumin 3% (BSA; Sigma Aldrich, USA) diluted in PBS-Tx. After 3 washes in PBS-Tx, the slices were incubated with the secondary antibody rabbit anti-mouse IgG conjugated with peroxidase diluted in BSA (1:500; Sigma Aldrich, USA), at room temperature, during 2h. After 3 washes in PBS, the immunohistochemical reaction was revealed in a solution of 0.06% 3,3-diaminobenzidine (DAB; Sigma Aldrich, USA) and 10% hydrogen peroxide for 5 min. Finally, samples were washed three times in PBS, dehydrated in increasing concentrations of alcohol (95% and 100%), clarified with xylene and covered with Canada balsam (Chemical Reaction, Brazil) and coverslips. A control negative slide were performed replacing the primary antibody by PBS. All the samples were exposed to each step of immunohistochemistry at the same time, with the same solutions and conditions with the aim of attenuate differences in the staining and background.

#### 5.9. SYP optical densitometry

The immunohistochemical reaction product to synaptophysin antibody was measured by means regional semi-quantitative optical densitometry (OD). Using an Optiphot-2 microscope ( $\times 200$ , Nikon, Japan) coupled to a CMOS camera (518CU, Micrometrics, USA), digitalized images of DG region of the dorsal hippocampus were obtained (Figure 3a). All lighting and magnification conditions were held constant in the analysis. In the Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, USA), the digital images were converted to an 8-bit gray scale (0–255 gray levels). In each image, the expression of synaptophysin was measured by the mean of optical densitometry of 3 squares inserted in the hilus region of DG of hippocampus (Figure 3b), measuring 5114.316  $\mu\text{m}^2$  each one (area of interest, AOI). The background was corrected and optical densitometry was calculated according to Xavier et al.

(2005):  $OD(x,y) = -\log[(INT(x,y) - BL)/(INC - BL)]$ . Where “OD” is the optical density; “INT (x,y)” or intensity is the intensity at pixel (x,y), “BL” or black is the intensity generated when no light goes through the material and “INC” is the intensity of the incidental light. In this analysis 4-5 animals were used per group and, for each animal, 12 images were analyzed (6 sections per animal, both left and right sides). Each group is formed from 1-3 litters different, which may have 1-3 animals from each litter in order to avoid the litter effect.

#### 5.10. Statistical analysis

Initially, samples were submitted to the Shapiro-Wilk normality test in the software GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) in order to verify if the data follow a normal distribution. The absolute and relative adrenal weight of mothers were submitted to a T test unpaired. The body weight gain and the escape latency in the four training days of Morris Water Maze were analyzed by ANOVA for repeated measures. The developmental milestones, the time spent in the opposite and target quadrants in the last day of Morris Water Maze test and data from optical densitometry were submitted to two-way ANOVA, having as independent variables the paternal exercise and maternal exercise during the pregnancy. Differences between groups were considered significant when  $p < 0,05$ . Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed using the software Statistica version 11.0 (StatSoft, Inc., USA).

## 6. References

- Abel, E.L., Moore, C., Waselewsky, D., Zajac, C., Russell, L.D, 1989. Effects of cocaine hydrochloride on reproductive function and sexual behavior of male rats and on the behavior of their offspring. *J.Androl.*10, 17–27.
- Abel, E., 2004. Paternal contribution to fetal alcohol syndrome. *Addict Biol.*; 9, 127–33.
- Akhavan, M.M., Emami-Abarghoie, M., Safari, M., Sadighi-Moghaddam, B., Vafaei, A.A., Bandegi, A.R., 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.
- Akhavan, M.M., Miladi-Gorji, H., Emami-Abarghoie, M., Safari, M., Sadighi-Moghaddam, B., Vafaei, A.A., Rashidy-Pour, A., 2013. Maternal Voluntary Exercise during Pregnancy Enhances the Spatial Learning Acquisition but not the Retention of Memory in Rat Pups via a TrkB mediated Mechanism: The Role of Hippocampal BDNF Expression. *Iran J Basic Med Sci.* 16: 955 – 961.

- Andersen, S.L., 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 3–18.
- Bale, T.L., 2005. Is mom too sensitive? Impact of maternal stress during gestation *Frontiers in Neuroendocrinology*. 26, 41–49.
- Bale, T.L., 2015. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature Reviews. Neuroscience*.16, 332 - 344.
- Bick-Sander, A., Steiner, B., Wolf, S.A., Babu, H, Kempermann, G., 2006. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *PNAS*. 103, 3852–3857.
- Chalk TE, Brown WM. 2014. Exercise epigenetics and the fetal origins of disease. *Epigenomics* 6(5),469-472.
- Clapp, J.F., 1996. Morphometric and neurodevelopmental outcome at age five years of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *J.Pediatr.*129, 856–863.
- Clapp, J.F., Simonian, S., Lopez, B., Appleby-Wineberg, S., Harcar-Sevcik, R., 1998. The one-year morphometric and neurodevelopmental outcome of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *Am. J. Obstet .Gynecol.* 178, 594–599.
- Clapp, J.F., Lopez, B., Harcar-Sevcik, R., 1999. Neonatal behavioral profile of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 91–94.
- Curley, J.P., Mashoodh, R., Champagne, F.A., 2011. Epigenetics and Origins of Paternal Effects *Hormones and Behavior*. 59, 306-314.
- Elsner, V.R., Lovate,G.A., Bertoldi, K., Vanzella, C., Santos,F.M., Spindler, C., De Almeida, E.F., Nardin, P., Siqueira, I.R., 2011. Effect of diferent exercise protocols on histone deacetylases activities in rat hippocampus.*Neuroscience*.192, 580–587.
- Fang, Z.H., Lee, C.H., Seo, M.K., Cho, H.Y., Jung Goo Lee, J.G., Leec, B.J., Sung Woo Park, S.W., Kim, Y.H., 2013. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. *Neuroscience Research* .76, 187–194.
- Fernandes, J., Baliego, L.G.Z., Peixinho-Pena, L.F., de Almeida, A.A., Venancio, D.P., Scorza, F.A., de Mello, M.T., Arida, R.M., 2013. *Brain Research*. 1529, 66,73.
- Gomes da Silva, S., Aparecido de Almeida, A., Fernandes, J., Lopim, G.M., Cabral, F.R., Scerni, D.A., de Oliveira-Pinto, A.V., Lent, R., Arida, R.M., 2016. Maternal Exercise during Pregnancy Increases BDNF Levels and Cell Numbers in the Hippocampal Formation but Not in the Cerebral Cortex of Adult Rat Offspring. *Plos One*. 11, 1-15.
- Gramsberger, A., Westerga, J., 1992.Locomotor development in undernourished rats. *Behav. Brain. Res.* 48, 57-64.

He, F., Lidow, I.A., Lidow, M.S., 2006. Consequences of paternal cocaine exposure in mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 198–209.

Hellenes, O.M., Torstein, V., Lohaugen, G.C., Salvesen, K.A., Stafne, S.N., Morkved, S., Evensen, K.A.I., 2014. Regular moderate exercise during pregnancy does not have an adverse effect on the neurodevelopment of the child. *Acta Pædiatrica.* 104, 285–291.

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. *The FASEB Journal.* 26, 117 – 128.

Hu, S., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., Frautschya, S.A., 2009. Exercise can increase small heat shock proteins (sHSP) and pre- and post-synaptic proteins in the hippocampus. *Brain Research.* 1249, 191-201.

Hughes V., 2014. The Sins of The Father. *Nature News Feature.* 507, 22 – 24.

Kim, H., Lee, S.H., Kim, S.S., Yoo, J.H., Kim, C.J., 2007. The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 243–249.

Kim, Y. H. , Sung Y. H., Lee, H.H., Ko, I.G., Kim, S.E., Shin, M. S., Kim, B.K., 2014. Postnatal treadmill exercise alleviates short-term memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups born to diabetic rats. *Journal of Exercise Rehabilitation.* 10(4), 209-217.

Kim, K., Sung, Y.H., Seo, J.H., Lee, S.W., Lim, B.V., Lee, C.Y., Chung, Y.R., 2015. Effects of treadmill exercise-intensity on short-term memory in the rats born of the lipopolysaccharide-exposed maternal rats. *Journal of Exercise Rehabilitation.* 11(6), 296-302.

Lee, H.H., Kim, H., Lee, J.W., Kim, Y.S., Yang, H.Y., Chang, H.K., 2006. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain. Dev.* 28, 147–154.

LeMoyne, E.L., Curnier, D., St-Jacques, S., Ellemberg, D., 2012. The effects of exercise during pregnancy on the newborn's brain: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 13:68, 2-7.

Little RE. 1987. Mother's and father's birthweight as predictors of infant birthweight. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1:19-31.

Lokey, E.A., Tran, Z.V., Wells, C.L., Myers, B.C., Tran, A.C., 1991. Effects of physical exercise on pregnancy outcomes: a meta-analytic review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 23:1234-1239.

Marcuzzo, S., Dutra, M.F., Stigger, F., Nascimento, P.S., Ilha, J., Kalil-Gaspar, P.I., Achaval M., 2010. Different effects of anoxia and limb-immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain & Develop.* 32, 323-31.

- Meek, L.R., Myren, K., Sturm, J., Burau, D., 2007. Acute paternal alcohol use affects offspring development and adult behavior. *PhysiolBehav.* 91, 154–60.
- 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.
- Paxinos, G., Watson, C. 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic, Sydney.
- Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J, Team AS. 2006. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 14(2):159-166.
- Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA. 2007. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87(1):101-108.
- Piazza, F.V., Segabinazi, E., Centenaro, L.A., do Nascimento, P.S., Achaval, M.E., Marcuzzo S., 2014. Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and microglial activation in the hippocampus of type 1 diabetic rats. *Metabolic Brain Disease.* 29, 93-104.
- Poggi, S. H., Park, J., Toso, L., Abebe, D., Roberson, R., Woodard, J. E., Spong, C.Y., 2005. No phenotype associated with established lipopolysaccharide model for cerebral palsy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 192, 727-733.
- Revilla, S., Suñol, C., García-Mesa, Y., Giménez-Llort, L., Sanfeliu, C., Cristòfol, R., 2014. Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain. *Neuropharmacology.* 81, 55-63.
- Revsin., Y., Rekers, N., Louwe, M., Saravia, F., Nicola, A., Kloet, E., Oitzl, M., 2009. Glucocorticoid Receptor Blockade Normalizes Hippocampal Alterations and Cognitive Impairment in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mice. *Neuropsychopharmacology.* 34, 747–758.
- Robinson, A.M., Bucci, D.J., 2014. Physical exercise during pregnancy improves object recognition memory in adult offspring. *Neuroscience.* 256, 53–60.
- Rodriguez, J.S., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Reyes-Castro, L.A., Ibanez, C., Ramirez, A., Chavira, R., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2012. Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation. *Intl. J. Dev. Neurosci.* 30, 75–81.
- Rönn, T, Ling, C., 2013. Effect of exercise on DNA methylation and metabolism in human adipose tissue and skeletal muscle. *Epigenomics.* 5(6), 603–605.
- Rosa, B.V., Firth, E.C., Blair, H.T., Mark H. Vickers, M.H., Morel, P.C.H., 2011. Voluntary exercise in pregnant rats positively influences fetal growth without initiating a maternal physiological stress response. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, 1134 – 1141.



Rousset, C.I., Kassem, J., Aubert, A., Planchenault, D., Gressens, P., Chalon, S., Belzung, C., Saliba, E., 2013. Maternal Exposure to Lipopolysaccharide Leads to Transient Motor Dysfunction in Neonatal Rats. *Developmental Neuroscience*. 35, 172-181.

Said, N., Lakehayli, S., El Khachibi, M., El Ouahli, M., Nadifi, S., Hakkou, F., Tazi, A., 2015. Effect of prenatal stress on memory, nicotine withdrawal and 5HT1A expression in raphe nuclei of adult rats. *Int. J. Devl Neuroscience*. 43: 92 – 98.

Tarsa, L., Goda, Y, 2002. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 1012–101.

Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi, D., Benfenati, F., 2004. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*, 26: 445–453.

Xavier, L.L., Viola ,G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M.D., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Protoc*. 16, 58–64.

Yin, M.M., Wang, J.S., Sun, J., Liu, S., Liu, X.L., Niu, Y.M., Yuan, H.R., Yang, F.Y., Fu, L. 2013. Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring. *Behavioral Brain Research*. 253, 297-304.

## Legends and Tables

**Fig 1.** Experimental Design. G1: first gestational day. P0: day of birth. The male and female progenitors were divided into two groups each: exercised and sedentary in preconception period or during pregnancy, respectively. The experiment was designed to obtain offspring of four experimental groups according to the fulfillment or not of parental physical activity: (1) offspring from sedentary father and mother (SS); (2) offspring from sedentary father and exercised mother in pregnancy (SE); (3) offspring from exercised father and sedentary mother in the gestational period (ES); (4) offspring from exercised father and exercised mother in the pregnancy (EE).

**Fig 2.** A) Escape latency was similar between groups at any day of training period ( $p > 0.05$ , ANOVA with repeated measures). Except for the offspring from exercised fathers and sedentary mothers (ES), the other groups decreased the latency to find the platform during the training period. However, the SE group did not learn faster than the control (SS) and EE groups.\* The mean of escape latency on the third day of training was less than in the first day of training for SS ( $p = 0.03$ ) and EE ( $p = 0.002$ ).<sup>#</sup>The SE group had a lower escape latency mean on the fourth day of training compared to the first day ( $p = 0.03$ ). No difference was observed between the average latency of the four days of training in the ES group ( $p > 0.05$ ). In the probe trial, the animals spent the same time in the opposite (B) and target (C) quadrants ( $p > 0.05$ , two-way ANOVA). Data expressed as mean  $\pm$  SEM. Experimental groups: control offspring (SS,  $n = 4$ ), offspring of sedentary father and exercised mother (SE,  $n = 9$ ), offspring of exercised father and sedentary mother (ES,  $n = 9$ ) and offspring of exercised father and mother (EE,  $n = 6$ ).

**Fig 3.** SYP expression in the dentate gyrus (DG) of hippocampus. A) Photomicrograph of coronal section of dorsal hippocampus stained with hematoxylin and eosin, showing the three regions of DG: molecular layer, granular layer and hilus (target region of the study). 200x magnification. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . B) Representative photomicrographs of immunohistochemistry for SYP in coronal sections of DG from different groups. 200x magnification. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . C) Optical Density (OD) measurement of SYP staining intensity in the hilus of DG described as mean  $\pm$  SEM. 4-5 animals per group. Experimental groups: control offspring (SS), offspring of sedentary father and exercised mother (SE),

offspring of exercised father and sedentary mother (ES) and offspring of exercised father and mother (EE).

Table 1. Body weight (g) of control offspring (SS), offspring of sedentary father and exercised mother (SE), offspring of exercised father and sedentary mother (ES) and offspring of exercised father and mother (EE) in different postnatal days expressed as mean  $\pm$  SEM.

Group	P0	P7	P14	P53
SS (n=13)	6,591 $\pm$ 0,136	18,147 $\pm$ 0,280	32,147 $\pm$ 0,445	262,153 $\pm$ 6,207
SE (n=11)	7,645 $\pm$ 0,530	15,475 $\pm$ 1,552	33,55 $\pm$ 0,953	259,5 $\pm$ 4,697
ES (n=13)	7,219 $\pm$ 0,143	17,393 $\pm$ 1,054	31,122 $\pm$ 1,855	251,384 $\pm$ 11,182
EE (n=13)	6,096 $\pm$ 0,128	16,237 $\pm$ 0,382	30,663 $\pm$ 0,480	261,230 $\pm$ 3,332

Table 2. Latency to the acquisition of developmental milestones (postnatal days) in control offspring (SS), offspring of sedentary father and exercised mother (SE), offspring of exercised father and sedentary mother (ES) and offspring of exercised father and mother (EE). Data were expressed as mean  $\pm$  SEM.

ASSESSMENT	DAY OF RESPONSE PRESENTATION (IN AVERAGE)			
	SS (n=13)	SE (n=11)	ES (n=13)	EE (n=13)
<i>Surface righting</i>	1,076 $\pm$ 0,076	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	1,615 $\pm$ 0,330
<i>Cliff aversion</i>	3,461 $\pm$ 0,417	2,727 $\pm$ 0,194	4,384 $\pm$ 0,349	3,230 $\pm$ 0,360
<i>Negative Geotaxis</i>	7,615 $\pm$ 0,513	7,454 $\pm$ 0,908	8,153 $\pm$ 0,389	8,846 $\pm$ 0,389
<i>Hindlimb proprioceptive placing</i>	5,846 $\pm$ 0,677	5,909 $\pm$ 0,211	4,615 $\pm$ 0,930	6,00 $\pm$ 0,599
<i>Forelimb grasp</i>	7,846 $\pm$ 0,372	5,636 $\pm$ 0,591	6,923 $\pm$ 0,674	7,230 $\pm$ 0,817
<i>Open field activity assessment</i>	11,923 $\pm$ 0,445	12,545 $\pm$ 0,561	11,923 $\pm$ 0,366	12,00 $\pm$ 0,408
<i>Audio startle</i>	12,384 $\pm$ 0,180	12,272 $\pm$ 0,359	12,230 $\pm$ 0,230	12,461 $\pm$ 0,183
<i>Eye opening</i>	14,461 $\pm$ 0,183	14,272 $\pm$ 0,359	13,923 $\pm$ 0,329	14,538 $\pm$ 0,573

Figure 1

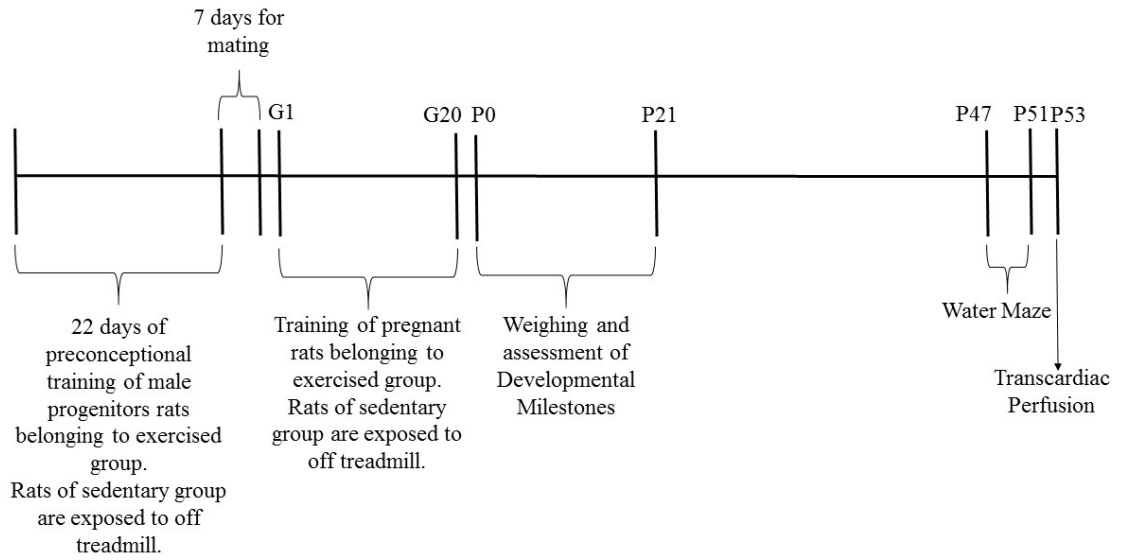
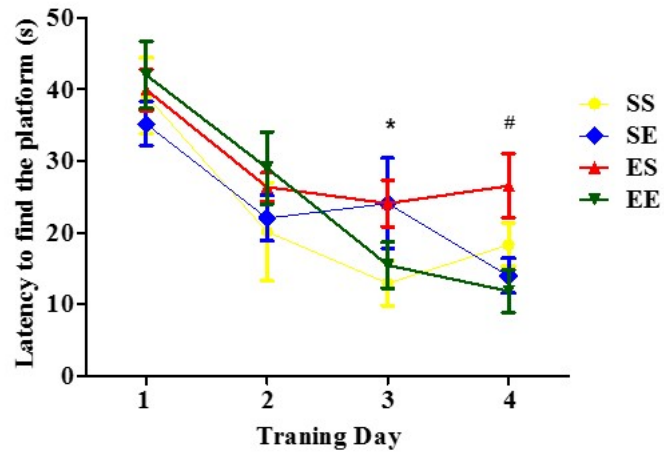
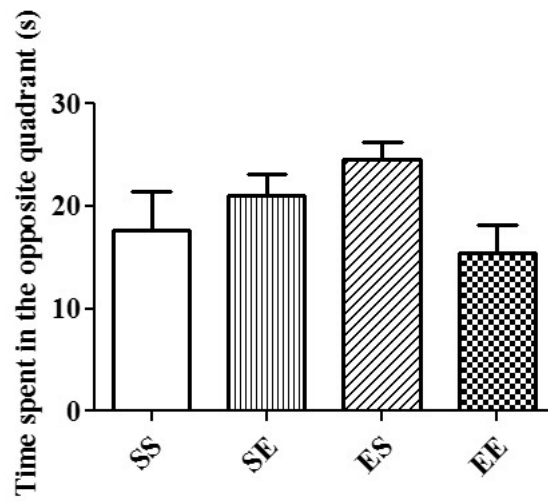


Figure 2

A



B



C

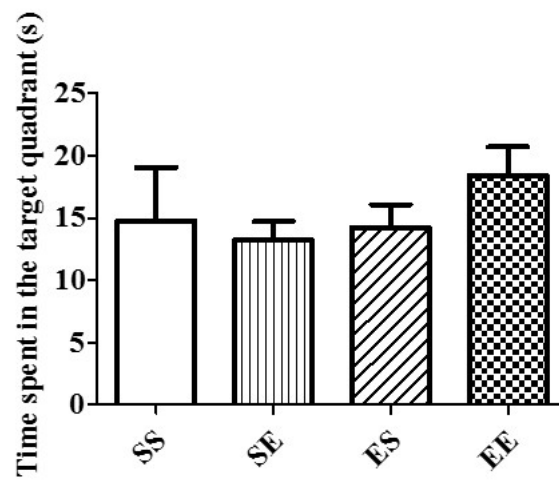
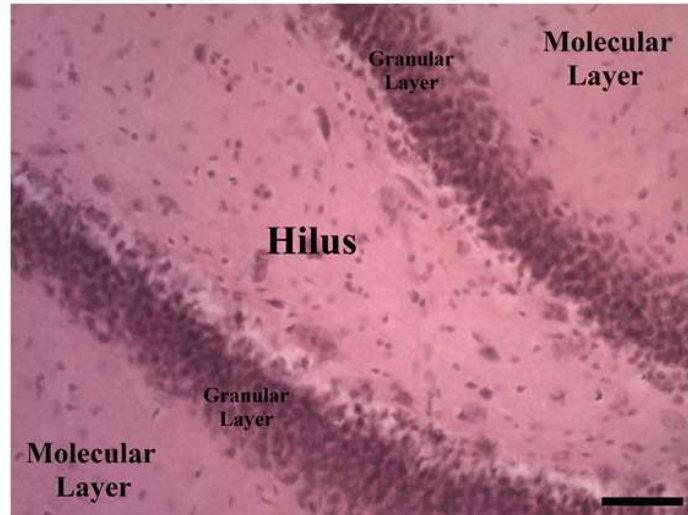
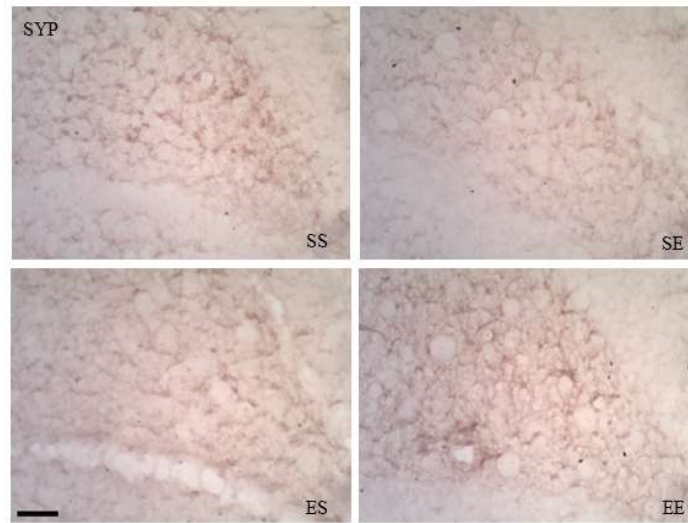


Figure 3

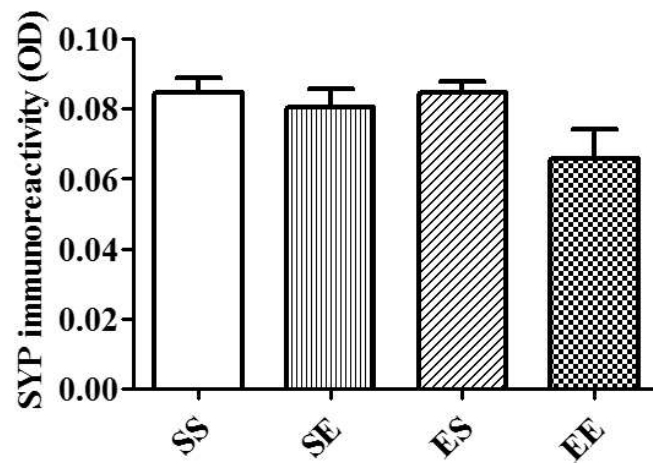
A



B



C



## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo mostrou que o protocolo exercício físico parental que utilizamos não tem efeito sobre o desenvolvimento físico e sensorio-motor da prole. Entretanto, até o presente momento, também não teve influência sobre a memória espacial e a plasticidade sináptica dos filhotes de ratos Wistar, ao contrário do que esperávamos em nossa hipótese. Levando em conta a pequena amostra do labirinto aquático de Morris e o fato de que foi analisado apenas um marcador de plasticidade sináptica, não é possível rejeitar totalmente hipótese formulada inicialmente. Os resultados preliminares que embasam essa conclusão, são:

- Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de progenitoras quanto ao peso absoluto ou relativo de suas glândulas adrenais, o que sugere que os filhotes não foram submetidos a altos níveis de estresse;
- Não foi detectado atraso no desenvolvimento sensorio-motor e físico dos filhotes durante a avaliação dos Marcos do Desenvolvimento e pesagem corporal;
- Os grupos: filhotes de mães exercitadas e pais sedentários (SE), controle (SS) e filhotes de ambos os pais exercitados (EE) aprenderam o local da plataforma uma vez que a latência para encontrar a plataforma ao longo do período de treinamento foi decrescente. No entanto, a aprendizagem dos filhotes de mães exercitadas e pais sedentários (SE) não foi mais rápida do que a dos grupos: controle (SS) e de ambos os pais exercitados (EE). Filhotes de pais exercitados e mães sedentárias (ES) não aprenderam a tarefa, pois a latência para encontrar a plataforma durante os quatro dias de treinamento não foi reduzida;
- Os níveis de sinaptofisina na região do hilo do giro denteado (GD) do hipocampo foi similar entre os diferentes grupos;

No intuito de finalizar o presente estudo ainda se pretende:

- Aumentar o n amostral do teste do labirinto Aquático de Morris;
- Analisar a latência para chegar ao local da plataforma original e o nº de cruzamentos sobre ele a partir da análise dos vídeos do dia do teste (5º dia) utilizando o software AnyMaze;
- Realizar a avaliação do comportamento materno no intuito de controlar um possível fator de confusão;

Em estudos futuros nós pretendemos:

- Analisar os efeitos do exercício parental sobre o desenvolvimento, a memória espacial e a plasticidade da prole, submetendo as mães ao exercício também no período pré-concepção além da gestação e exercício paterno prévio a concepção;
- Avaliar o desempenho dos filhotes machos durante a tarefa de VO<sub>2</sub>, a preferência ao exercício físico, a neurogênese hipocampal, os níveis de BDNF e relina no hipocampo e córtex frontal da prole;
- Realizar uma análise epigenética no hipocampo e córtex dos filhotes, em amostras de esperma de machos e ovários de fêmeas progenitores submetidos ao exercício físico, mensurando a atividade da enzima DNMT1, a qual é responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA durante a divisão celular;



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel E. 2004. Paternal contribution to fetal alcohol syndrome. *Addict Biol* 9(2):127-133; discussion 135-126.
- ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists). 1994. Exercise during pregnancy and the postpartum period. Washington (DC): O College.
- 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(4):1173-1183.
- Akhavan MM, Foroutan T, Safari M, Sadighi-Moghaddam B, Emami-Abarghoie M, Rashidy-Pour A. 2012. Prenatal exposure to maternal voluntary exercise during pregnancy provides protection against mild chronic postnatal hypoxia in rat offspring. *Pak J Pharm Sci* 25(1):233-238.
- Amaral DG. 1978. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182(4 Pt 2):851-914.
- Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31(3):571-591.
- Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. 1996. Motor-skill learning: changes in synaptic organization of the rat cerebellar cortex. *Neurobiol Learn Mem* 66(2):221-229.
- Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS, Alvord WG. 2006. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition* 22(3):327-331.
- Aune D, Norat T, Leitzmann M, Tonstad S, Vatten LJ. 2015. Physical activity and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 30(7):529-542.
- Bae-Gartz I, Janoschek R, Kloppe C-S, Vohlen C, Roels F, Oberthür A, AlejandroAlcazar MA, Lippach G, Muether PS, Dinger K, Ferrari N, Graf C, Jörg Dötsch J, Eva Hucklenbruch-Rother E. 2016. Running Exercise in Obese Pregnancies Prevents IL-6 Trans-signaling in Male Offspring. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 48(5):829-38
- Bale, T.L., 2005. Is mom too sensitive? Impact of maternal stress during gestation *Frontiers in Neuroendocrinology*. 26, 41–49.
- Bale TL, Baram TZ, Brown A S, Goldstein JM, Insell TR, McCarthy MM, Nemeroff CB, Reyes TM, Simerly RB, Susser ES, Nestler ES. 2010. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol. Psychiatry*. 68: 314–319.
- Bale TL. 2015. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci* 16(6):332-344.

- Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, McHugh SB, J. Rawlins NP, Monyer H, Seeburg PH. 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci.* (3):181-92.
- Bennett MR. 2000. The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol* 60(2):109-137.
- Berchicci M, Lucci G, Perri RL, Spinelli D, Di Russo F. 2014. Benefits of physical exercise on basic visuo-motor functions across age. *Front Aging Neurosci* 6:48.
- Bick-Sander A, Steiner B, Wolf SA, Babu H, Kempermann G. 2006. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10):3852-3857.
- Black JE, Greenough WT, Anderson BJ, Isaacs KR. 1987. Environment and the aging brain. *Canadian Journal Psychology* 41: 111-130.
- Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. 1990. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(14):5568-5572.
- Blackstad TW, Brink K, Hem J, Jeune B. 1970. Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* 138(4):433-449.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-39.
- Brasil, Ministério do Esporte. 2015. Caderno I. Desporto. Diagnóstico Nacional do Esporte. Brasília-DF.
- Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. 2012. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 104(20):1548-1561.
- Brooks SP, Dunnett SB. 2009. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 519-529.
- Brown WJ, McLaughlin D, Leung J, McCaul KA, Flicker L, Almeida OP, Hankey GJ, Lopez D, Dobson AJ. 2012. Physical activity and all-cause mortality in older women and men. *Br J Sports Med* 46(9):664-668.
- Cai L, Chan JS, Yan JH, Peng K. 2014. Brain plasticity and motor practice in cognitive aging. *Front Aging Neurosci* 6:31.
- Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. 1996. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol* 25(12):821-828.
- Camiletti-Moirón D, Aparicio VA, Aranda P, Radak Z. 2013. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scand J Med Sci Sports* 23(4):e202-212.

- Carlin A., Alfirevic Z. 2008. Physiological changes of pregnancy and monitoring. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 22: 801–823.
- Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. 1985. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 100(2):126-131.
- Cassilhas RC, Viana VA, Grassmann V, Santos RT, Santos RF, Tufik S, Mello MT. 2007. The impact of resistance exercise on the cognitive function of the elderly. *Med Sci Sports Exerc* 39(8):1401-1407.
- Cassilhas RC, Lee KS, Fernandes J, Oliveira MG, Tufik S, Meeusen R, de Mello MT. 2012. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience* 202:309-317.
- Cassilhas RC, Tufik S, de Mello MT. 2016. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. *Cell Mol Life Sci* 73(5):975-983.
- Cauley JA, Harrison SL, Cawthon PM, Ensrud KE, Danielson ME, Orwoll E, Mackey DC. 2013. Objective measures of physical activity, fractures and falls: the osteoporotic fractures in men study. *J Am Geriatr Soc* 61(7):1080-1088.
- Chaddock L, Erickson KI, Prakash RS, Kim JS, Voss MW, Vanpatter M, Pontifex MB, Raine LB, Konkel A, Hillman CH and others. 2010. A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children. *Brain Res* 1358:172-183.
- Chalk TE, Brown WM. 2014. Exercise epigenetics and the fetal origins of disease. *Epigenomics* 6(5):469-472.
- Chodzko-Zajko WJ, Moore KA. 1994. Physical fitness and cognitive functioning in aging. *Exerc Sport Sci Rev* 22:195-220.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA. 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120(3):421-433.
- Ciolac EG. 2013. Exercise training as a preventive tool for age-related disorders: a brief review. *Clinics (Sao Paulo)* 68(5):710-717.
- Clapp JF. 1996. Morphometric and neurodevelopmental outcome at age five years of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *J Pediatr* 129(6):856-863.
- Clapp JF, Lopez B, Harcar-Sevcik R. 1999. Neonatal behavioral profile of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180(1 Pt 1):91-94.
- Clarke PE, Gross H. 2004. Women's behaviour, beliefs and information sources about physical exercise in pregnancy. *Midwifery* 20(2):133-141.

- Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA. 2011. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm Behav* 59(3):306-314.
- de Andrade LP, Gobbi LT, Coelho FG, Christofolletti G, Costa JL, Stella F. 2013. Benefits of multimodal exercise intervention for postural control and frontal cognitive functions in individuals with Alzheimer's disease: a controlled trial. *J Am Geriatr Soc* 61(11):1919-1926.
- Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandevia SC, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH and others. 2006. Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring)* 14(3):345-356.
- Domingues MR, Barros AJ. 2007. Leisure-time physical activity during pregnancy in the 2004 Pelotas Birth Cohort Study. *Rev Saude Publica* 41(2):173-180.
- Domingues MR, Bassani DG, da Silva SG, Coll CeV, da Silva BG, Hallal PC. 2015. Physical activity during pregnancy and maternal-child health (PAMELA): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 16:227.
- Donnelly JE, Blair SN, Jakicic JM, Manore MM, Rankin JW, Smith BK, Medicine ACoS. 2009. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc* 41(2):459-471.
- Drummond MJ, Vehrs PR, Schaalje GB, Parcell AC. 2005. Aerobic and resistance exercise sequence affects excess postexercise oxygen consumption. *J Strength Cond Res* 19(2):332-337.
- Durakoglulugil MS, Chen Y, White CL, Kavalali ET, Herz J. 2009. Reelin signaling antagonizes beta-amyloid at the synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15938-43.
- Dustman RE, Ruhling RO, Russell EM, Shearer DE, Bonekat HW, Shigeoka JW, Wood JS, Bradford DC. 1984. Aerobic exercise training and improved neuropsychological function of older individuals. *Neurobiol Aging* 5(1):35-42.
- Eadie BD, Redila VA, Christie BR. 2005. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *J Comp Neurol* 486(1):39-47.
- El Falougy H, Kubikova E, Benuska J. 2008. The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratisl Lek Listy* 109(3):106-110.
- Elsayed M, Ismail AH, Young RJ. 1980. Intellectual differences of adult men related to age and physical fitness before and after an exercise program. *J Gerontol* 35(3):383-387.
- Elsner VR, Basso C, Bertoldi C, de Meireles LCF, Cechinel LR, Siqueira IR. 2016. Differential effect of treadmill exercise on histone deacetylase activity in rat striatum at different stages of development. *J Physiol Sci*. In Press.

Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM and others. 2011. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(7):3017-3022.

Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. 2003. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res* 36(12):1751-1759.

Fan C, Huang T, Cui F, Gao M, Song L, Wang S. 2015. Paternal factors to the offspring birth weight: the 829 birth cohort study. *Int J Clin Exp Med* 8(7):11370-11378.

Fang ZH, Lee CH, Seo MK, Cho H, Lee JG, Lee BJ, Park SW, Kim YH. 2013. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. *Neurosci Res* 76(4):187-194.

Fernandes J, Baliego LG, Peixinho-Pena LF, de Almeida AA, Venancio DP, Scorza FA, de Mello MT, Arida RM. 2013. Aerobic exercise attenuates inhibitory avoidance memory deficit induced by paradoxical sleep deprivation in rats. *Brain Res* 1529:66-73.

Fieril KP, Olsén MF, Glantz A, Larsson M. 2014. Experiences of exercise during pregnancy among women who perform regular resistance training: a qualitative study. *Phys Ther* 94(8):1135-1143.

Fletcher GF, Balady G, Blair SN, Blumenthal J, Caspersen C, Chaitman B, Epstein S, Sivarajan Froelicher ES, Froelicher VF, Pina IL and others. 1996. Statement on exercise: benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans. A statement for health professionals by the Committee on Exercise and Cardiac Rehabilitation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation* 94(4):857-862.

Franco FS, Costa NM, Ferreira SA, Carneiro-Junior MA, Natali AJ. 2011. The effects of a high dosage of creatine and caffeine supplementation on the lean body mass composition of rats submitted to vertical jumping training. *J Int Soc Sports Nutr* 8:3.

Fullston T, E., Teague MCO, Palmer NO, DeBlasio MJ, Mitchell M, Corbett M, Print CG, Owens JÁ, Lane M. 2013. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *The FASEB Journal* 27: 4226-4243.

Fundação Vale, UNESCO. 2013. Cadernos de referência de esporte; 2, 74f. Fisiologia do exercício. Brasília.

Garcia PC, Real CC, Ferreira AF, Alouche SR, Britto LR, Pires RS. 2012. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. *Brain Res* 1456:36-48.

Gomes da Silva S, de Almeida AA, Fernandes J, Lopim GM, Cabral FR, Scerni DA, de Oliveira-Pinto AV, Lent R, Arida RM. 2016. Maternal Exercise during Pregnancy Increases BDNF Levels and Cell Numbers in the Hippocampal Formation but Not in the Cerebral Cortex of Adult Rat Offspring. *PLoS One* 11(1):e0147200.

- Gómez-Pinilla F, So V, Kesslak JP. 1998. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience* 85(1):53-61.
- Guendelman S, Pearl M, Kosa JL, Graham S, Abrams B, Kharrazi M. 2013. Association between preterm delivery and pre-pregnancy body mass (BMI), exercise and sleep during pregnancy among working women in Southern California. *Matern Child Health J* 17(4):723-731.
- Guimarães GV, Ciolac EG. 2014. Physical activity: practice this idea. *Am J Cardiovasc Dis* 4(1):31-33.
- He F, Lidow IA, Lidow MS. 2006. Consequences of paternal cocaine exposure in mice. *Neurotoxicology and Teratology* 28: 198–209.
- Heffernan AE. 2000. Exercise and pregnancy in primary care. *Nurse Pract.*, 25 (3): 42, 49, 53–56, *passim*.
- 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(1):117-128.
- Herting MM, Nagel BJ. 2012. Aerobic fitness relates to learning on a virtual Morris Water Task and hippocampal volume in adolescents. *Behav Brain Res* 233(2):517-525.
- Herz J, Chen Y. 2006. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 7:850–9.
- Hescham S, Grace L, Kellaway LA, Bugarith K, Russell VA. 2009. Effect of exercise on synaptophysin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase levels in prefrontal cortex and hippocampus of a rat model of developmental stress. *Metab Brain Dis* 24(4):701-709.
- Hopkins ME, Nitecki R, Bucci DJ. 2011. Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* 194:84-94.
- Hughes V. 2014. Epigenetics: The sins of the father. *Nature* 507(7490):22-24.
- Hunsberger JG, Newton SS, Bennett AH, Duman CH, Russell DS, Salton SR, Duman RS. 2007. Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF. *Nat Med* 13(12):1476-1482.
- Ilha J, Araujo RT, Malysz T, Hermel EE, Rigon P, Xavier LL, Achaval M. 2008. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 22(4):355-366.
- Juhl M, Andersen PK, Olsen J, Madsen M, Jørgensen T, Nøhr EA, Andersen AM. 2008. Physical exercise during pregnancy and the risk of preterm birth: a study within the Danish National Birth Cohort. *Am J Epidemiol* 167(7):859-866.

- Jukic AM, Lawlor DA, Juhl M, Owe KM, Lewis B, Liu J, Wilcox AJ, Longnecker MP. 2013. Physical activity during pregnancy and language development in the offspring. *Paediatr Perinat Epidemiol* 27(3):283-293.
- Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng XX, Tong KY. 2011. The Effects of Voluntary, Involuntary, and Forced Exercises on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Motor Function Recovery: A Rat Brain Ischemia Model. *PLoS ONE*. 6.
- Kim E, Sheng M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5(10):771-781.
- Kim H, Lee MH, Chang HK, Lee TH, Lee HH, Shin MC, Shin MS, Won R, Shin HS, Kim CJ. 2006. Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev* 28(2):109-114.
- Kim H, Lee SH, Kim SS, Yoo JH, Kim CJ. 2007. The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. *Int J Dev Neurosci* 25(4):243-249.
- Kim K, Sung YH, Seo JH, Lee SW, Lim BV, Lee CY, Chung YR. 2015. Effects of treadmill exercise-intensity on short-term memory in the rats born of the lipopolysaccharide-exposed maternal rats. *J Exerc Rehabil* 11(6):296-302.
- Kohman RA, Bhattacharya TK, Wojcik E, Rhodes JS. 2013. Exercise reduces activation of microglia isolated from hippocampus and brain of aged mice. *J Neuroinflammation* 10:114.
- Kovács E, Hunsberger M, Reisch L, Gwozdz W, Eiben G, De Bourdeaudhuij I, Russo P, Veidebaum T, Hadjigeorgiou C, Sieri S and others. 2015. Adherence to combined lifestyle factors and their contribution to obesity in the IDEFICS study. *Obes Rev* 16 Suppl 2:138-150.
- Kuwahara K, Honda T, Nakagawa T, Yamamoto S, Akter S, Hayashi T, Mizoue T. 2015. Associations of leisure-time, occupational, and commuting physical activity with risk of depressive symptoms among Japanese workers: a cohort study. *Int J Behav Nutr Phys Act* 12:119.
- Laker RC, Lillard TS, Okutsu M, Zhang M, Hoehn KL, Connelly JJ, Zhen Yan Z. 2014. Exercise Prevents Maternal High-Fat Diet-Induced Hypermethylation of the Pgc-1 $\alpha$  Gene and Age-Dependent Metabolic Dysfunction in the Offspring. *Diabetes*. 64: 1605 – 1611.
- Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. 2005. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem* 83(3):206-216.
- Langston RF, Stevenson CH, Wilson CL, Saunders I, Wood ER. 2010. The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. *Behav Brain Res* 215(2):275-291.
- Lee IM, Paffenbarger RS. 1998. Physical activity and stroke incidence: the Harvard Alumni Health Study. *Stroke* 29(10):2049-2054.

- Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP. 2004. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol* (1985) 96(3):1097-1104.
- Lee HH, Kim H, Lee JW, Kim YS, Yang HY, Chang HK, Lee TH, Shin MC, Lee MH, Shin MS. 2006. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev* 28(3):147-154.
- Lees C, Hopkins J. 2013. Effect of aerobic exercise on cognition, academic achievement, and psychosocial function in children: a systematic review of randomized control trials. *Prev Chronic Dis* 10:E174.
- Leuner B, Gould E. 2010. Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol* 61:111-140, C111-113.
- Li J, Ding YH, Rafols JA, Lai Q, McAllister JP, Ding Y. 2005. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neurosci Lett* 386(3):160-164.
- Little RE. 1987. Mother's and father's birthweight as predictors of infant birthweight. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1:19-31.
- Loprinzi PD, Edwards M. 2015. Association Between Objectively Measured Physical Activity and Erectile Dysfunction among a Nationally Representative Sample of American Men. *J Sex Med* 12(9):1862-1864.
- Losonczy A, Makara JK, Magee JC. 2008. Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature* 452(7186):436-441.
- Malinow R, Malenka RC. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- McPherson NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. 2013. Improving metabolic health in obese male mice via diet and exercise restores embryo development and fetal growth. *PLoS One* 8(8):e71459.
- McPherson NO, Owens JA, Fullston T, Lane M. 2015. Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308(9):E805-821.
- Meek, L.R., Myren, K., Sturm, J., Burau, D., 2007. Acute paternal alcohol use affects offspring development and adult behavior. *PhysiolBehav*. 91, 154–60.
- Meeusen R, De Meirleir K. 1995. Exercise and brain neurotransmission. *Sports Med* 20(3):160-188.
- Meeusen R. 2005. Exercise and the brain: insight in new therapeutic modalities. *Ann Transplant* 10(4):49-51.
- Menet V, Prieto M, Privat A, Giménez y Ribotta M. 2003. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15):8999-9004.



- Merom D, Ding D, Stamatakis E. 2016. Dancing Participation and Cardiovascular Disease Mortality: A Pooled Analysis of 11 Population-Based British Cohorts. *Am J Prev Med*.
- Mondon CE, Dolkas CB, Sims C, Reaven GM. 1985. Spontaneous running activity in male rats: effect of age. *J Appl Physiol* (1985) 58(5):1553-1557.
- Morgan JA, Corrigan F, Baune BT. 2015. Effects of physical exercise on central nervous system functions: a review of brain region specific adaptations. *J Mol Psychiatry* 3(1):3.
- Murashov AK, Pak ES, Koury M, Ajmera A, Jeyakumar M, Parker M, Williams O, Ding J, Walters D, Neuffer PD. 2016. Paternal long-term exercise programs offspring for low energy expenditure and increased risk for obesity in mice. *FASEB J* 30(2):775-784.
- Narath E, Skalicky M, Viidik A. 2001. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp Gerontol* 36(10):1699-1711.
- Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82(4):163-201.
- Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. 2004. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* 81(3):200-210.
- O'Keefe J. 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51(1):78-109.
- Ouzounian JG, Elkayam U. 2012. Physiologic Changes During Normal Pregnancy and Delivery *CardiolClin*. 30: 317-329.
- 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(1):45-48.
- Paul CM, Magda G, Abel S. 2009. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 203(2):151-164.
- Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J, Team AS. 2006. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 14(2):159-166.
- Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA. 2007. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87(1):101-108.
- Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, De Lecea L, Martínez A, Delgado-García JM, Soriano E. 2010. Reelin reg-ulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci* 30:4636–49.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, White LE. 2010. *Neurociências*. 4ª edição, Artmed, POA.
- Qiu S, Weeber EJ. 2007. Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *J Neurophysiol* 97:2312–21.

- Qiu S, Zhao LF, Korwek KM, Weeber EJ. 2006. Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J Neurosci* 26:12943–55.
- Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsock J, Sasvári M, Nyakas C, Goto S. 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 38(1):17-23.
- Raglin JS. 1990. Exercise and mental health. Beneficial and detrimental effects. *Sports Med* 9(6):323-329.
- Raipuria M, Bahari H, Morris MJ. 2015. Effects of Maternal Diet and Exercise during Pregnancy on Glucose Metabolism in Skeletal Muscle and Fat of Weanling Rats. *PLoS ONE* 10(4): e0120980.
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295(7):349-353.
- Revilla S, Suñol C, García-Mesa Y, Giménez-Llort L, Sanfeliu C, Cristòfol R. 2014. Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain. *Neuropharmacology* 81:55-63.
- Revsin Y, Rekers NV, Louwe MC, Saravia FE, De Nicola AF, de Kloet ER, Oitzl MS. 2009. Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology* 34(3):747-758.
- Reynolds GO, Otto MW, Ellis TD, Cronin-Golomb A. 2016. The Therapeutic Potential of Exercise to Improve Mood, Cognition, and Sleep in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 31(1):23-38.
- Robinson AM, Bucci DJ. 2014. Physical exercise during pregnancy improves object recognition memory in adult offspring. *Neuroscience* 256:53-60.
- Roig M, Nordbrandt S, Geertsen SS, Nielsen JB. 2013. The effects of cardiovascular exercise on human memory: a review with meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 37(8):1645-1666.
- Russell JC, Epling WF, Pierce D, Amy RM, Boer DP. 1987. Induction of voluntary prolonged running by rats. *J Appl Physiol* (1985) 63(6):2549-2553.
- Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS. 2003. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol.* 463(1-3):217-23.
- Stanford KI, Lee M-K, Getchell KM, So K, Hirshman MF, Goodyear LJ. 2015. Exercise Before and During Pregnancy Prevents the Deleterious Effects of Maternal High-Fat Feeding on Metabolic Health of Male Offspring. *Diabetes* 64:427–433.
- Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE. 2009. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162(2):234-243.
- Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA, Siqueira IR. 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull* 71(1-3):155-159.
- Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. 2010. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* 87(17-18):521-536.

- Shih PC, Yang YR, Wang RY. 2013. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One* 8(10):e78163.
- Shimada H, Hamakawa M, Ishida A, Tamakoshi K, Nakashima H, Ishida K. 2013. Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Behav Brain Res* 243:21-27.
- Spindler CF. 2012. 38 f. Efeito do exercício físico moderado em esteira sobre parâmetros epigenéticos em estruturas cerebrais de ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- Spinnewijn WE, Lotgering FK, Struijk PC, et al. 1996. Fetal heart rate and uterine contractility during maternal exercise at term. *Am J ObstetGynecol*; 174:43–8.
- Squire LR, Stark CE, Clark RE. 2004. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27:279-306.
- Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K, Saito T. 2007. Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res* 58(4):341-348.
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. 2006. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 9(4):526-533.
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. 2007. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus* 17(11):1017-1022.
- Tak E, Staats P, Van Hespen A, Hopman-Rock M. 2005. The effects of an exercise program for older adults with osteoarthritis of the hip. *J Rheumatol* 32(6):1106-1113.
- Tamaki T, Uchiyama S, Nakano S. 1992. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Med Sci Sports Exerc* 24(8):881-886.
- Tan EK, Tan EL. 2013. Alterations in physiology and anatomy during pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 27: 791–802.
- Thompson PD, Crouse SF, Goodpaster B, Kelley D, Moyna, N, Pescatello, L. 2001. The acute versus the chronic response to exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 33: 438-435.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D. 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402(6760):421-425.
- US Department of Health and Human Services. (2008). 2008 Physical activity guidelines for Americans (pp. 1–61) Washington, DC. <http://www.health.gov/paguidelines/guidelines/default.aspx>.
- Uzendoski AM, Latin RW, Berg KE, Moshier S. 1990. Physiological responses to aerobic exercise during pregnancy and post-partum. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 30: 77–82.

- van Os J, Selten JP. 1998. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *Br J Psychiatry* 172:324-326.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999a. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2(3):266-270.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. 1999b. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13427-13431.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25(38):8680-8685.
- Vega CC, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. 2015. Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism.
- Vissing J, Andersen M, Diemer NH. 1996. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(4):729-736.
- Voss MW, Vivar C, Kramer AF, van Praag H. 2013. Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. *Trends Cogn Sci* 17(10):525-544.
- Washbourne P, Dityatev A, Scheiffele P, Biederer T, Weiner JA, Christopherson KS, El-Husseini A. 2004. Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci* 24(42):9244-9249.
- Wasinski F, Bacurau RFP, Estrela GR, Klempin F, Arakaki AM, Batista RO, Mafra FFP, do Nascimento LFR, Hiyane MI, Velloso LA, Câmara NOS and Ronaldo, Araujo C. 2015. Exercise during pregnancy protects adult mouse offspring from diet-induced obesity. *Nutrition & Metabolism* 12:56.
- White E, Pivarnik J, Pfeiffer K. 2014. Resistance training during pregnancy and perinatal outcomes. *J Phys Act Health* 11(6):1141-1148.
- Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. 1986. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10):3500-3504.
- Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A and others. 2007. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem* 87(4):597-609.
- World Health Organization. 2011. Global Recommendations on Physical Activity for Health. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Wu Y, Zhang D, Kang S. 2013. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat* 137:869-882.
- Yang YR, Chang HC, Wang PS, Wang RY. 2012. Motor performance improved by exercises in cerebral ischemic rats. *J Mot Behav* 44(2):97-103.
- Yin MM, Wang W, Sun J, Liu S, Liu XL, Niu YM, Yuan HR, Yang FY, Fu L. 2013. Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring. *Behav Brain Res* 253:297-304.
- Yun HS, Park Ji, Kim TW, Ko IG, Kim HB, Kim H. 2014. Treadmill exercise ameliorates symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder through reducing Purkinje cell loss and

astrocytic reaction in spontaneous hypertensive rats. *Journal of Exercise Rehabilitation* 10(1):22-30.

Zanesco A, Antunes E. 2007. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. *Pharmacol Ther* 114(3):307-317.