



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA**

DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Efeitos da natação durante o período gestacional sobre
a prole de ratos com hipóxia-isquemia cerebral
neonatal em parâmetros comportamentais e
histológicos**

Suelen Willborn Pereira

Porto Alegre, novembro de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA

DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Efeitos da natação durante o período gestacional sobre
a prole de ratos com hipóxia-isquemia cerebral
neonatal em parâmetros comportamentais e
histológicos**

Suelen Willborn Pereira

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Co- Orientador: Dr. Eduardo Farias Sanches

Porto Alegre, novembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concedido saúde, persistência e força para vencer essa caminhada.

Agradeço em especial aos meus pais e a minha irmã, que sempre se preocuparam, ajudaram e me apoiaram nas realizações de meus estudos.

Um agradecimento especial também ao meu namorado e companheiro, que muito me incentivou nesta jornada acadêmica, e sempre compreendeu minha ausência.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto por todos os ensinamentos e contribuições para este trabalho e para a minha vida acadêmica. Ao Dr. Eduardo Farias Sanches, o qual me ensinou tudo o que sei na Pesquisa, sem ele este trabalho não teria sido possível, muito obrigada por todos os momentos de aprendizado e amizade.

A todos do Laboratório 35, que muito me ajudaram nas horas de experimento e discussão/ elaboração deste trabalho.

Por fim, agradeço aos grandes amigos que fiz no decorrer da graduação e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo conhecimento proporcionado nestes anos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Animais.....	20
3.2 Modelo Experimental.....	20
3.2.1 Protocolo de Natação.....	20
3.2.2 Modelo de Hipóxia-Isquemia.....	20
3.2.3 Desenho Experimental.....	21
3.3 Análise Comportamental.....	21
3.3.1 Labirinto Aquático de Morris.....	22
3.3.1.1 Protocolo de Memória de Referência.....	22
3.3.1.2 Protocolo de Memória de Trabalho.....	22
3.3.2 Esquiva Inibitória.....	23
3.4 Análise Histológica.....	24
3.5 Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Peso Corporal.....	25
4.2 Testes Cognitivos.....	26
4.2.1 Labirinto Aquático de Morris: Memória de Referência.....	26
4.2.2 Labirinto Aquático de Morris: Memória de Trabalho.....	29
4.2.3 Esquiva Inibitória.....	30
4.3 Análise Histológica.....	32
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Eventos Moleculares após o dano HI.....	9
Figura 2- Desenho esquemático do modelo de Levine.....	11
Figura 3 - Comparativo das curvas de crescimento e maturação cerebral de ratos e humanos.....	12
Figura 4 - Representação dos malefícios decorrentes da inatividade física.....	13
Figura 5 - Desenho experimental.....	21
Figura 6 - Peso Corpóreo dos Animais.....	25
Figura 7 - Peso médio dos encéfalos.....	26
Figura 8 - Labirinto Aquático de Morris: Memória de Referência - latência para encontrar a plataforma nas sessões de treino.....	27
Figura 9 - Labirinto Aquático de Morris: Memória de Trabalho - latência para encontrar a plataforma no dia do Probe.....	28
Figura 10 - Labirinto Aquático de Morris: Tempo na zona da plataforma.....	29
Figura 11 - Labirinto Aquático de Morris: Memória de Trabalho.....	30
Figura 12 - Esquiva Inibitória.....	31
Figura 13 - Análise histológica dos volumes hemisféricos.....	32
Figura 14 - Análise Histológica dos volumes hipocampais.....	33
Figura 15 - Imagens representativas dos cortes histológicos.....	34

RESUMO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal (HI) é uma importante causa de dano encefálico durante o período gestacional. A HI decorre da diminuição da oferta de sangue (isquemia) e de oxigênio (hipóxia) para o tecido encefálico devido a disfunções circulatórias e/ou complicações obstétricas e contribui para a etiologia de patologias como a paralisia cerebral e epilepsia. Seus mecanismos envolvem as consequências diretas do déficit energético sobre o metabolismo celular destacando-se a excitotoxicidade glutamatérgica e o estresse oxidativo. O modelo animal de HI utilizando ratos no 7º dia de vida pós-natal (HIP7) mimetiza a lesão ocorrida em humanos nascidos entre 38-40 semanas de gestação (nascimento a termo). Estudos têm demonstrado que intervenções realizadas para o tratamento da HI sofrem forte influência do dimorfismo sexual, sendo eficazes ora em um sexo, ora em outro, dependendo dos mecanismos em que atuam. O exercício físico é associado como forma de prevenção a muitas doenças, em particular as que envolvem o sistema nervoso central (SNC). A natação pode ser considerada uma excelente forma de exercício para gestantes, uma vez que o ambiente aquático reduz a dificuldade em realizar atividades física em função do peso extra adquirido na gravidez e por agir de forma benéfica sobre o desenvolvimento embrionário. Além disso, mudanças estruturais e funcionais tais como maior proliferação celular em diversas regiões do encéfalo e melhor desempenho em tarefas espaciais, são induzidas pelo exercício. O objetivo deste estudo é demonstrar o potencial efeito da natação durante a gestação como estratégia de proteção ao evento hipóxico-isquêmico neonatal na prole de ratos Wistar. Nossa hipótese de trabalho é de que o exercício físico possua caráter preventivo e seja um agente para a recuperação da função cognitiva após a lesão HI. Ainda, esperamos observar influência do dimorfismo sexual sobre os parâmetros analisados. Ratas prenhas foram submetidas a um protocolo de natação no período gestacional, enquanto um grupo que somente foi submetido ao tanque onde era realizado o nado, serviu de controle. No sétimo dia de vida, os filhotes de ambos os sexos foram anestesiados com halotano, submetidos à oclusão da artéria carótida direita e após um período de recuperação de 2 horas, submetidos à hipóxia (8% de O₂) durante 90 minutos. Os animais foram divididos nos grupos controle (SHAM nado e sedentário) e HI (nado e sedentário). A análise comportamental realizada (através do labirinto aquático de Morris e da esQUIVA inibitória) evidenciaram uma melhora dos grupos HI em que a mãe tinha realizado o nado (principalmente nos machos). A análise histológica demonstrou maior preservação tecidual nas fêmeas, aparentemente sem correlação com a melhora cognitiva, indicando que talvez o volume das estruturas analisadas (hemisfério e hipocampo) pode não ter sido suficiente para explicar a recuperação dos déficits cognitivos. Estruturas como amígdala e córtex pré-frontal também possuem fundamental papel nas tarefas realizadas e devem ser analisadas em estudos futuros. Embora a lesão tecidual não tenha sido revertida, o nado gestacional pode ter causado alterações na plasticidade do tecido remanescente que podem ter sido a causa da melhora cognitiva.

Palavras-chave: Hipóxia-Isquemia (HI), nado gestacional, neuroproteção, memória, dimorfismo sexual.

1. INTRODUÇÃO

Estimativas da Organização Mundial de Saúde indicam que dos 37% de casos de mortalidade infantil antes dos 5 anos de idade, 23% estão relacionados à asfixia perinatal (DURAN ET AL., 2007). Complicações decorrentes da asfixia neonatal frequentemente incluem alterações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e renais, porém, o Sistema Nervoso Central (SNC) é a estrutura mais afetada (VANNUCCI ET AL., 2004).

A hipóxia-isquemia cerebral neonatal (HI), principal causa de enfermidades do sistema nervoso no período neonatal, pode ocorrer devido a complicações durante a gravidez ou parto, tais como a asfixia intra-uterina severa e a prematuridade (VOLPE, 2008). A HI é associada a altas taxas de morbidade neurológica em recém-nascidos, acarretando déficits sensoriais, motores e cognitivos nos sobreviventes, como paralisia cerebral, convulsões, epilepsia e déficits na aprendizagem (WEITZDOERFER ET AL., 2004, VANNUCCI ET AL., 2004, HAGBERG ET AL., 2002). De acordo com Volpe e colaboradores (2009) a cada mil nascidos vivos, 2 a 4 recém-nascidos são acometidos por hipóxia-isquemia cerebral. No Brasil, estima-se que a prevalência de asfixia neonatal seja de aproximadamente 2% dos nascidos vivos (SOUZA, 2003).

A hipóxia-isquemia decorre de uma diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos e pode se desenvolver de duas maneiras: por uma situação de hipóxia, que é a diminuição da quantidade de oxigênio circulante nos tecidos, e de uma isquemia, ou seja, interrupção do aporte sanguíneo aos tecidos (BERGER e GARNIER, 1999; ENGIDAWORK ET AL., 1997). A HI se dá de forma evolutiva, iniciando durante a lesão e estendendo-se no período de recuperação, sendo suas repercussões

variáveis, e dependentes do período em que ocorreu a lesão, da duração do insulto e dos mecanismos fetais de adaptação.

As alterações celulares do dano HI têm sido muito estudadas e envolvem principalmente a excitotoxicidade, a perda do controle sobre o potencial de membrana, a sobrecarga intracelular de Ca^{++} , a geração de radicais livres e a indução de apoptose (ARTENI ET AL., 2010). Os mecanismos de despolarização e repolarização são a base para o funcionamento encefálico, sendo seu funcionamento dependente da oferta apropriada de oxigênio e glicose. O déficit energético decorrente da HI leva a uma alteração no metabolismo celular, com excessiva liberação de neurotransmissores excitatórios (ocasionando excitotoxicidade glutamatérgica) e aumento da produção de espécies reativas levando ao estresse oxidativo. O dano celular pode ser agravado pela ativação de citocinas e conseqüente infiltração e ativação de células inflamatórias em resposta ao dano inicial (MCLEAN ET AL., 2004; MISHRA ET AL., 1999).

Na fase de isquemia ocorre diminuição do suprimento sanguíneo com resultante queda do aporte de oxigênio para o tecido lesado (Figura 1), provocando inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e queda da produção de trifosfato de adenosina (ATP). No entanto o consumo de ATP continua, reduzindo os estoques à adenosina difosfato (ADP) e à adenosina monofosfato (AMP) e logo à adenosina, inosina e hipoxantina. Com a exaustão das reservas energéticas durante a hipóxia, ocorre falência nos mecanismos de manutenção dos potenciais de membrana (ERECINSKA ET AL., 1994).

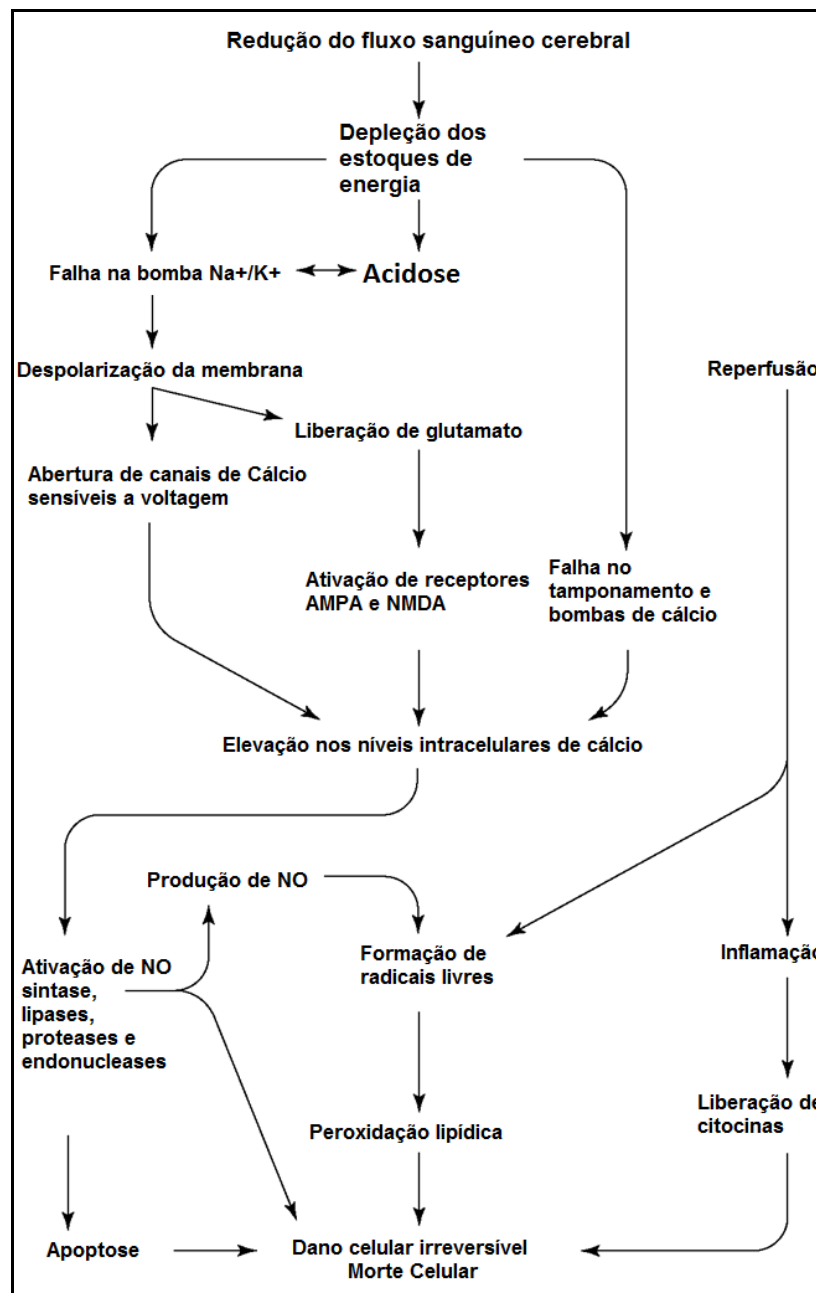


Figura 1 - Eventos moleculares após o dano HI.

Como a glicólise anaeróbica é insuficiente para manter a produção de ATP, não há energia para manter as funções cerebrais, ocorrendo desativação das bombas iônicas, despolarização das membranas e abertura dos canais iônicos dependentes de voltagem (DUGAN ET AL., 1999). Ocorre uma diminuição na

atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase resultando em inchaço celular e edema citotóxico. Há uma hiperpolarização generalizada nos neurônios e com a perda dos potenciais de membrana, o Ca^{++} flui para o meio intracelular levando a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato.

Logo, o glutamato ativa os receptores NMDA, AMPA e cainato, resultando no influxo de Na^+ e Ca^{++} para dentro dos neurônios pós-sinápticos, o que impede a recaptação de glutamato da fenda sináptica. Como o mecanismo de sua recaptação, regulado principalmente pelos astrócitos, é dependente de ATP, sofre grande prejuízo com a falência energética decorrente da lesão hipóxico-isquêmica (MAGISTRETTI ET AL., 1999). O acúmulo de Ca^{++} intracelular provoca efeitos que podem levar a morte celular, como por exemplo, a ativação de proteases, endonucleases e fosfolipases as quais, atuando sobre lipídeos da membrana plasmática, levam à formação excessiva de ácidos graxos livres e ácido araquidônico. Os mecanismos celulares responsáveis pela lesão hipóxico-isquêmica também envolvem a ativação de caspases (em particular a caspase-3), uma família de enzimas ativadas durante o episódio hipóxico e que atua dando início e executando a apoptose neuronal (ROSSITER ET AL., 2002; TELEP ET AL., 2002; LOW ET AL., 2002).

O modelo mais utilizado para o estudo da HI neonatal em roedores é o de Levine (1960) modificado por Rice e colaboradores em 1981. Neste modelo, ratos neonatos no sétimo dia de vida pós-natal (PND7) têm uma de suas carótidas permanentemente ocluída e são posteriormente expostos a uma atmosfera hipóxica (8% de O_2)(Figura 2).

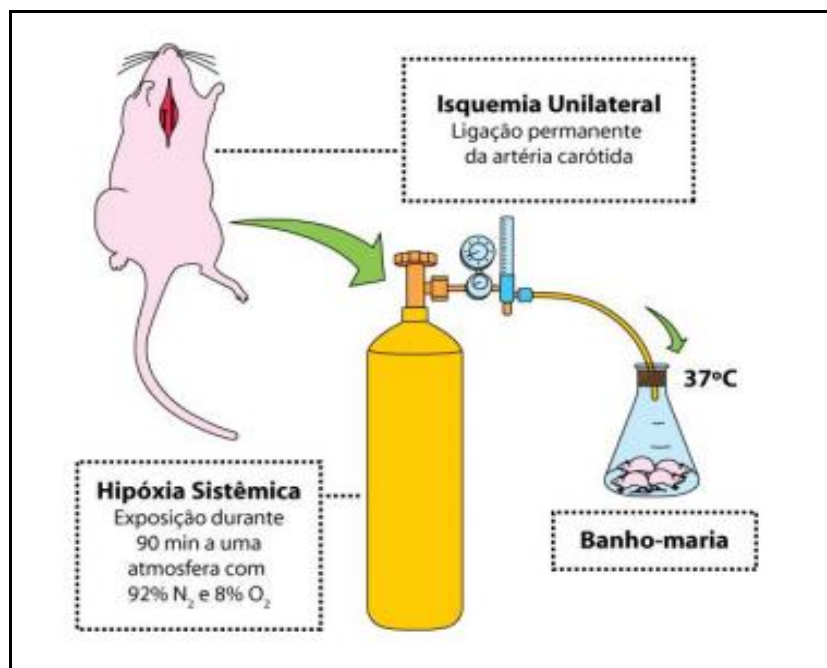


Figura 2 - Desenho esquemático do modelo de Levine (Ilustração: Bruna Lora)

O modelo de Levine-Rice é caracterizado por atingir preferencialmente um dos hemisférios cerebrais (o da oclusão carotídea) e estruturas tais como hipocampo e núcleos da base, o que vem a ser a causa dos déficits cognitivo motores apresentados pelos animais. O modelo permite uma melhor compreensão da patologia, assim como os mecanismos de lesão, seus desfechos e o estudo de estratégias de tratamento.

A utilização deste modelo vem ampliando os conhecimentos acerca da fisiopatologia da hipóxia-isquemia cerebral neonatal, e por isso, esse modelo vem se tornando uma ferramenta útil para o teste de estratégias com potencial neuroprotetor (CARLETTI ET AL., 2012; TSUJI ET AL., 2010; PEREIRA ET AL., 2009; WALTON ET AL., 1999). O modelo se utiliza de animais com sete dias de vida, pois este é o período do desenvolvimento em que o cérebro do rato está em um estágio de maturação correspondente ao de um humano nascido a termo (38-40 semanas), conforme ilustrado na Figura 3 (MOSKAL ET AL., 2006).

Trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o enriquecimento ambiental pós-natal (PEREIRA ET AL., 2009) assim como o tratamento com ácido fólico durante a lactação reduzem os déficits cognitivos e as alterações de parâmetros metabólicos induzidos pela HI.

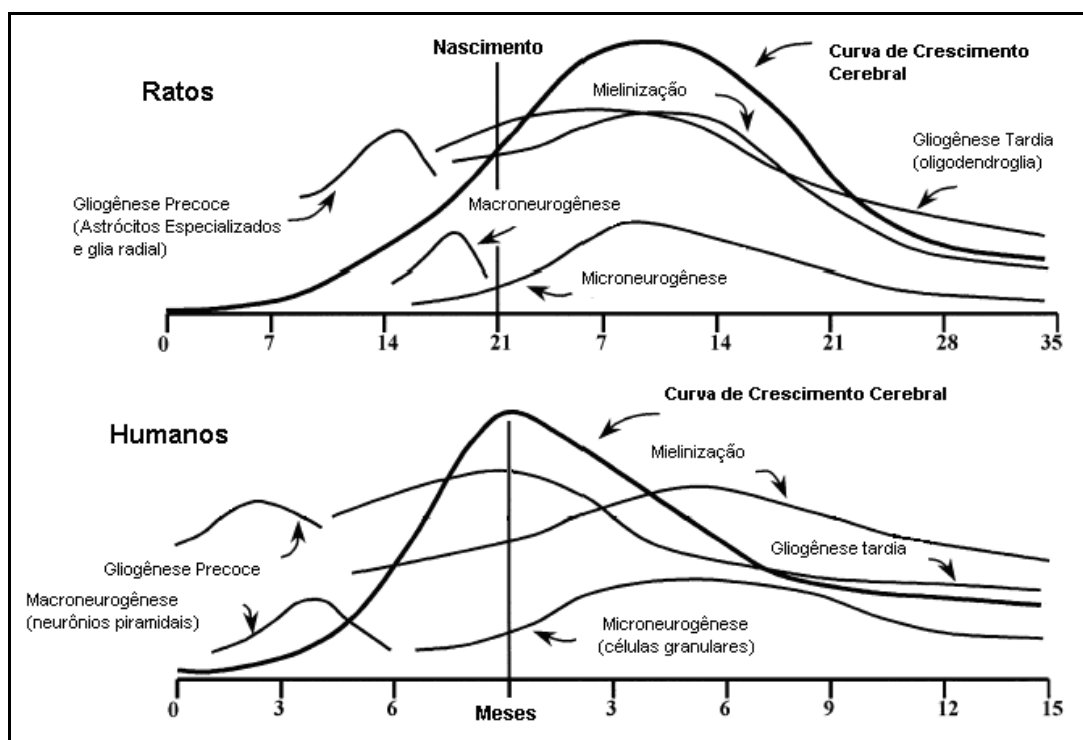


Figura 3 - Comparativo entre as curvas de crescimento e maturação cerebral de ratos e humanos. Adaptado de MORGANE ET AL., 2002.

Atualmente, associa-se o exercício físico como forma de prevenção de muitas doenças (Figura 4). Além de favorecer a habilidade motora, a integração e a convivência com as pessoas de diferentes culturas, já é comprovado que o exercício melhora a capacidade de memória e aprendizagem. Além disso, durante a gravidez o exercício físico se mostra inofensivo para a mãe e não traz prejuízo ao feto em desenvolvimento (LOKEY ET AL., 1991).

A atividade física regular promove grandes benefícios ao funcionamento do organismo e atua na prevenção de patologias como obesidade, hipertensão,

diabetes tipo II, além de ser uma excelente estratégia para diversos grupos de risco através da diminuição dos níveis de colesterol e triglicerídeos. (COTMAN ET AL., 2012; VANHEEST e RODGERS, 1997). O exercício é capaz de melhorar o estado imunológico, atenuando os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (COTMAN ET AL., 2012) e representa uma técnica de intervenção no estilo de vida que pode contribuir para a plasticidade, função cerebral e para a resistência a patologias envolvendo o SNC.



Figura 4 - Representação esquemática dos malefícios decorrentes da inatividade física (Fonte: adaptado de <http://www.vladman.net/exerciciofisico.php>).

Estudos realizados em animais e humanos demonstram vários efeitos do exercício físico sobre a saúde do cérebro em geral, o que confere a ele elevada expectativa envolvendo neuroproteção frente a lesões (MARCELINO ET AL., 2013; DRUMOND ET AL., 2012; COTMAN ET AL., 2002;) Em roedores adultos, já está bem documentado que o exercício físico aumenta o número de novas células no

hipocampo (VAN PRAAG ET AL., 1999; TREJO ET AL., 2001; KIM ET AL., 2003;). A evidência de que o exercício pode afetar essas funções fornece uma base para elucidar mais precisamente os mecanismos através do qual o exercício modula a função cerebral.

A natação é uma excelente forma de exercício que oferece mínima carga sobre as articulações e permite grande facilidade de movimento. Esta modalidade apresenta menor estresse mecânico devido à flutuação, redução dos efeitos da gravidade, bem como uma melhor distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos e pode ser a melhor escolha de atividade física para mulheres grávidas, devido ao ambiente que envolve água com regulação da temperatura e flutuação (CAMPION, 2000).

A atividade na água facilita o exercício reduzindo a dificuldade do peso extra adquirido na gravidez. Para as gestantes, a natação melhora a circulação sanguínea, força e resistência muscular, reduz dores nas costas, ansiedade e depressão, promove um sono de melhor qualidade e aumenta o gasto calórico, evitando o ganho excessivo de peso e outros desconfortos associados à gravidez, bem como atua na prevenção de Diabetes tipo II e pré-eclampsia (BUNGUM ET AL., 2000; EZMERLI ET AL., 2000; POLLEY ET AL., 2002; YEO ET AL., 2000; DEMPSEY ET AL., 2004; WEISSGERBER ET AL., 2004).

No feto, o nado age no crescimento placentário, aumenta o crescimento fetal e o peso ao nascimento (CLAPP ET AL., 2006), colaborando para uma melhor aptidão materna neste período e para maior bem estar-fetal (KATZ ET AL., 2003). Assim, vários possíveis mecanismos que podem ser responsáveis por estes efeitos benéficos à saúde materna e fetal têm sido propostos, incluindo o reforço do crescimento placentário, vascularização, redução de estresse oxidativo e melhora da

disfunção endotelial (WEISSGERBER ET AL.; 2004; SANKARALINGAM ET AL.; 2011).

Em ratos, a natação é considerada uma habilidade inata e estudos revelam a ocorrência de adaptações ao treinamento físico semelhante às observadas em humanos (GOBATTO ET AL., 2001). As mudanças estruturais e funcionais induzidas pelo exercício são documentadas em diversas regiões do encéfalo, mas são principalmente relacionadas ao hipocampo. Estudos demonstram que o exercício durante a gestação melhora o aprendizado espacial de ratos recém-nascidos quando comparados aos controles (PARNPIANSIL ET AL., 2003). Também se observou que o exercício físico provocaria alterações em regiões específicas do hipocampo, o que aumentou a proliferação celular e a neurogênese no giro denteado da prole de ratas grávidas submetidas à natação durante a gestação (VAN PRAAG ET AL., 1999; TREJO ET AL., 2001; LEE ET AL., 2006).

Marcelino e colaboradores (2013) relataram aumento das defesas antioxidantes no cerebelo, córtex parietal e hipocampo de ratos, dado possivelmente pela menor produção de espécies reativas, como óxido nítrico (NO). Além disso, encontraram indícios de biogênese mitocondrial no cerebelo e no córtex parietal, evidenciada por um aumento na massa e no potencial de membrana mitocondrial. Logo, pode-se sugerir que o exercício maternal promova uma programação neurometabólica na prole, o que pode ser um benefício para os ratos contra futuros insultos cerebrais. Entretanto, estudos mostram que o exercício aeróbico aumenta os níveis de proteínas sinápticas como sinapsina e sinaptofisina, de receptores de glutamato NR2B e GLUR5 e, a disponibilidade de várias classes de fatores de crescimento. Realizado na gravidez, o exercício aumenta a expressão de BDNF no hipocampo e promove benefícios sobre a memória de curta duração nos filhotes

(LEE, ET AL., 2006; KIM ET AL.; 2007) uma vez que esse fator modula a neurotransmissão, a gênese de neuritos, a sobrevivência neuronal (NONOMURA e HATANAKA, 1992; GHOSH ET AL., 1994, PEREIRA ET AL., 2009) induz potenciação de longa duração (LTP) (FIGUROV ET AL., 1996) e aumenta a plasticidade neuronal no SNC (MIZUNO ET AL., 2000).

Os resultados destes estudos mostraram que a natação materna em ratos durante a gravidez melhora a memória da prole por induzir um aumento da neurogênese hipocampal. Contudo, diferenças comportamentais, morfológicas e neuroquímicas são conhecidas entre os gêneros em diversas espécies. Homens são mais propensos a serem diagnosticados com perturbações do desenvolvimento neurológico (GUALTIERI ET AL, 1985; LAUTERBACH ET AL, 2001; DONDERS E HOFFMAN, 2002; RUTTER ET AL., 2003), a apresentarem maiores mortalidade e suscetibilidade a insultos graves após a HI, tendo seus déficits cognitivos e comportamentais exacerbados (HINDMARSH ET AL, 2000; KENT ET AL, 2012; KESLER ET AL., 2008; PEACOCK ET AL., 2012).

Contudo, a influência do sexo sobre lesões ao SNC não é observada somente na idade adulta, onde o efeito hormonal seria esperado. A paralisia cerebral e o retardo mental, por exemplo, são mais comuns em homens (JOHNSTON E HAGBERG, 2007) e estes mostram uma maior incidência de prematuridade, anóxia, hemorragia intraventricular e mortalidade por prematuridade (LAUTERBACH ET AL., 2001; MAYORAL ET AL., 2009; PEACOCK ET AL., 2012; RAZ ET AL., 2004, 2010). Um ensaio clínico randomizado de profilaxia com indometacina em prematuros sem estratificação demonstra a importância de considerar esta variável nos estudos (SCHMIDT ET AL., 2001). Sem estratificação, o estudo não revela diferenças entre os sexos, porém, quando o estudo é estratificado, os meninos apresentam escores

verbais mais elevados e menor taxa de comprometimento sensorial (MENT ET AL., 2004).

No entanto, os mecanismos subjacentes às diferenças sexo-específicas encontradas nesses estudos ainda não são totalmente conhecidos. Evidências demonstram que em seres humanos, o hipocampo é maior em mulheres do que em homens, porém os homens têm maior volume de CA1 e maior densidade de neurônios no giro denteado em comparação às mulheres o que favoreceria tarefas espaciais (MADEIRA E LIEBERMAN, 1995). Além disso, machos e fêmeas apresentam níveis diferenciados de neurotransmissores, como a serotonina (NISHIZAWA ET AL., 1997), sensibilidade diferenciada de regiões cerebrais aos opióides (ZUBIETA ET AL., 1999) e fortes evidências experimentais sugerem diferenças entre os sexos em vias de morte celular, o que pode alterar as consequências comportamentais causadas por uma lesão (LANG E MCCULLOUGH, 2008; LIU ET AL, 2009; MANWANI E MCCULLOUGH, 2011; MCCULLOUGH ET AL, 2005).

Estudos recentes de nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa demonstram que há diferenças entre os sexos tanto na extensão da lesão causada pela HI neonatal como na resposta a diferentes tratamentos e que este parâmetro intrínseco não pode ser desconsiderado (BONA ET AL., 1998; HAGBERG ET AL., 2004; ZHU ET AL., 2006; TSUJI ET AL., 2010; PEREIRA ET AL., 2008; ARTENI ET AL., 2010; HILL ET AL., 2014).

Considerando os potenciais efeitos da natação sobre um melhor transcurso da gestação e, ainda tendo em vista seu potencial efeito sobre o encéfalo da prole, procuramos com este trabalho demonstrar a importância do nado gestacional como prevenção aos danos causados pela hipóxia-isquemia neonatal. Ainda, procuramos

identificar se tais efeitos protetores possuem características sexualmente dimórficas quando analisados déficits comportamentais e histológicos na idade adulta dos animais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores do nado materno gestacional sobre a prole de ratos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia cerebral neonatal sobre parâmetros histológicos e comportamentais.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Verificar a eficácia de um protocolo de natação durante o período gestacional sobre a lesão hipóxico-isquêmica em filhotes de ratos Wistar.
- 2- Avaliar a memória espacial através do Labirinto Aquático de Morris e a memória aversiva através do teste de Esquiva Inibitória a partir dos 30 dias de vida dos animais.
- 3- Verificar se houve neuroproteção histológica induzida pelo nado gestacional após a HI através da quantificação do volume dos hemisférios e dos hipocampos dos animais.
- 4- Analisar se a neuroproteção induzida nos parâmetros comportamentais e histológicas foi influenciada pelo sexo dos animais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

As fêmeas e machos utilizados no trabalho foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Após a confirmação da gestação por presença de espermatozoides no esfregaço vaginal observado em microscópio, um grupo de 4 ratas foi submetido ao protocolo de natação (descrito abaixo) e 4 serviram de controle. Os animais permaneceram em caixas-moradia em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração padronizada e água "*ad libitum*". Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) sob protocolo nº 25532.

3.2 Modelo Experimental

3.2.1 Protocolo de natação: Inicialmente, os animais foram expostos ao tanque para reduzir o estresse ao novo ambiente. De acordo com seus grupos, os animais foram individualmente colocados no tanque de fibra (mesmo a ser usado no labirinto aquático de Morris) (50cm de profundidade e 110cm de diâmetro). A água possuía temperatura entre 30-32°C e, durante um período de 10 minutos por dia durante todos os dias da gestação (do dia 0 até os dia 20-22) os animais do grupo nado foram colocados para nadar (entre 18:00 e 20:00h).

3.2.2 Modelo de hipóxia-isquemia: O procedimento consistiu na associação, no dia pós-natal 7, de uma isquemia unilateral pela obstrução permanente da artéria carótida comum direita e, após intervalo de 2 horas, uma hipóxia sistêmica produzida pela inalação de uma mistura gasosa contendo 8% de oxigênio e 92% de nitrogênio por 90 minutos (SANCHES ET AL., 2011). No total, foram utilizados 60 animais,

distribuídos nos grupos SHAM sedentário (N= 12), SHAM natação (N= 12), HI sedentário (N= 15) e HI natação (N= 21).

3.2.3 Desenho experimental

A partir do PND 30 foram realizados os testes do labirinto aquático de Morris, seguido do teste da Esquiva Inibitória. Após os testes, os animais foram perfundidos transcárdiacamente e as amostras coletadas para análise histológica. Desta forma, o desenho experimental foi delineado conforme a figura abaixo.

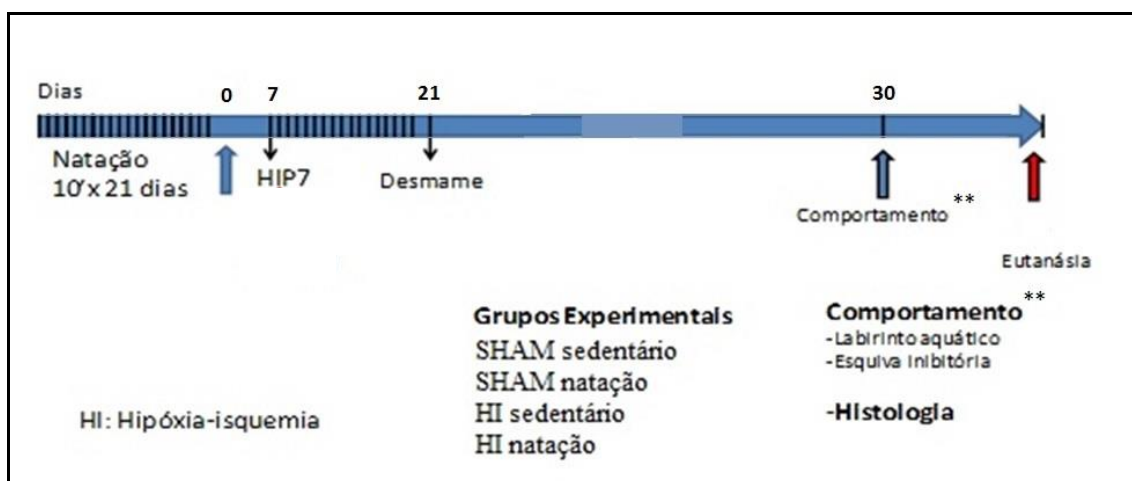


Figura 5 - Desenho experimental

3.3 Análise comportamental

A fim de verificar alterações na capacidade cognitiva dos animais, foram realizados os seguintes testes:

3.3.1 Labirinto Aquático de Morris

A partir dos 30 dias de vida foi avaliada a memória espacial dos animais utilizando-se o Labirinto Aquático de Morris. O labirinto consiste de um tanque circular de 110 cm de diâmetro, sendo 50 cm de profundidade cobertos por água

(temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$), situada em uma sala contendo pistas visuais nas paredes que o cercam. Uma plataforma com 10 cm de diâmetro encontra-se submersa 2 cm abaixo da superfície da água. Este tanque é dividido, virtualmente, em 4 quadrantes e possui 4 pontos de largada para o teste, designados como N (norte), S (sul), L (leste) e O (oeste). Para a avaliação da memória, foram utilizados 2 protocolos distintos, descritos abaixo:

3.3.1.1 Protocolo de Memória de Referência

Neste protocolo a posição da plataforma permanece no mesmo local durante todo o período de treino. Os animais realizaram 4 “trials” por dia, durante 5 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a fase de treino, uma sessão de 60 segundos, sem a plataforma foi realizada para avaliar a memória de longo prazo para a posição da plataforma. Todos os animais foram colocados no labirinto em um mesmo ponto, o mais longe possível da posição da plataforma e foram analisados: a latência para alcançar a região em que estaria plataforma (alvo) e o tempo gasto na zona da plataforma (SANCHES ET AL., 2013).

3.3.1.2 Protocolo de Memória de Trabalho

Neste protocolo, foram realizados 4 trials por dia, com 5 minutos de intervalo entre eles, com uma diferente posição da plataforma a cada dia. A memória de trabalho foi avaliada pela média da latência de cada animal para encontrar a plataforma nos dois primeiros trials (trial 1 - de aquisição) e (trial 2 - de retenção) (ARTENI ET AL., 2010; SANCHES ET AL., 2013).

3.3.2 Esquiva inibitória

Após o labirinto aquático, os animais foram submetidos à esquiva inibitória. Ela consiste de uma caixa onde há uma plataforma acrílica elevada e outra região onde há barras de bronze que permitem a aplicação de um leve choque elétrico (50x25x25cm). A latência de descida da plataforma é anotada no treino. Ao descer da plataforma e encostar as 4 patas na grade, o animal recebeu um choque de 0,5 mA/2s. Após 90 minutos e 24 horas do treino, a retenção é avaliada e a latência de descida da plataforma é tomada como índice de memória. O tempo limite das sessões-teste foi de 180 segundos (SANCHES ET AL., 2013b).

3.4 Análise histológica

Ao final dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina (10mg/kg) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%) seguido de uma solução de paraformaldeído (4%). Os encéfalos foram removidos e mantidos na mesma solução contendo paraformaldeído para pós-fixação. Para a análise histológica, os encéfalos foram crioprottegidos com uma solução de sacarose 30% durante dois dias. Foram feitos cortes histológicos em criostato (CM1850, Leica, São Paulo-SP, Brazil) de 20 μ m com um intervalo de 200 μ m e corados com hematoxilina e eosina. As imagens das áreas foram escaneadas e a análise foi realizada usando o software Image-J. A análise volumétrica foi realizada pelo método de Cavalieri, que consiste de delinear as áreas de interesse em todos os cortes (PAXINOS e WATSON; 1986) e calcular o volume das estruturas de interesse através da soma das áreas multiplicado pelo intervalo da secção dos cortes (ARTENI ET AL., 2010).

3.5 Análise estatística

Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando tratamento (nado gestacional), hipóxia-isquemia (lesão) e sexo dos animais como fatores. A ANOVA foi seguida do teste Duncan para múltiplas comparações. Os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Wilcoxon e U de Mann-Whitney quando necessário. Quando necessário (medidas histológicas) foi realizado Teste-t pareado. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa SPSS 19.0.

4. RESULTADOS

4.1 Peso Corporal

Ao final dos experimentos, a ANOVA revelou um efeito do sexo sobre o ganho de peso dos ratos ($F(58,1)=194,48$, $p<0,05$). Os machos apresentaram peso corporal superior ao das fêmeas, independente do tratamento (nado gestacional) e da lesão (Figura6).

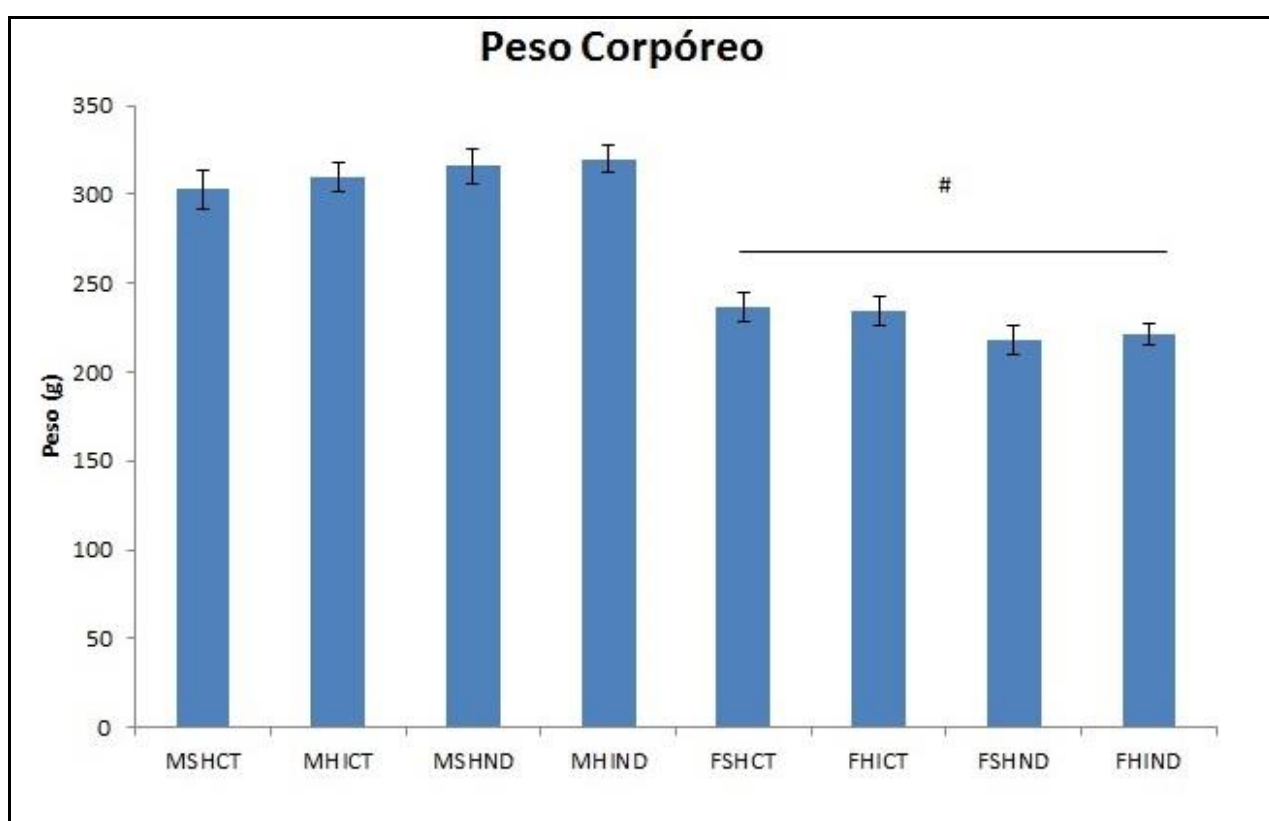


Figura 6 - Peso Corpóreo dos animais ao final dos experimentos. Os dados estão expressos como média do peso (g) \pm EP. #Efeito do sexo.

MSHCT – Grupo Macho SHAM Controle

FSHCT – Grupo Fêmea SHAM Controle

MHICT – Grupo Macho HI Controle

FHICT – Grupo Fêmea HI Controle

MSHND – Grupo Macho SHAM Nado

FSHND – Grupo Fêmea SHAM Nado

MHIND – Grupo Macho HI Nado

FHIND – Grupo Fêmea HI Nado

Ao final dos experimentos, verificamos o efeito da HI ($F(58,1)=22,21$, $p<0,05$) sobre as médias de peso dos encéfalos dos animais: os animais submetidos à lesão

hipóxico-isquêmica apresentaram menor peso encefálico quando comparados com os seus respectivos controles (Figura 7). Houve efeito do sexo sobre esta medida: as fêmeas apresentaram peso encefálico menor quando comparadas aos machos ($F(58,1)=5,09, p<0,05$).

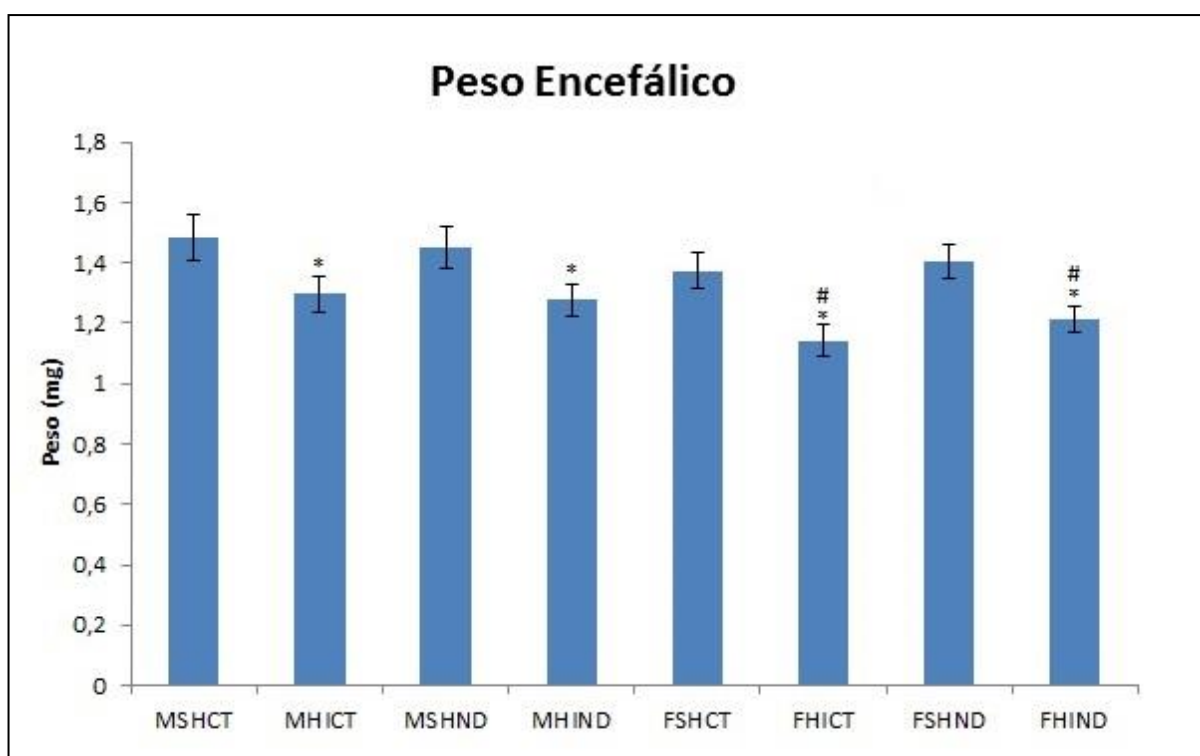


Figura 7 - Peso médio dos encéfalos. Os dados estão expressos como média \pm EP do peso (g). *Efeito da HI. # Efeito do sexo.

4.2 Testes Cognitivos

4.2.1 Labirinto Aquático de Morris: Memória de Referência

A ANOVA de medidas repetidas evidenciou uma interação entre o tempo e lesão nos diferentes grupos experimentais: os animais dos grupos HI apresentaram prejuízo cognitivo quando comparados com os controles ($F(4,48)=3,44, p<0,01$). ANOVAs individuais realizadas em cada dia de treino mostraram que, a partir do

segundo dia de treino, os animais do grupo MHIND tiveram desempenho igual ao do seu respectivo controle (MSHND), ou seja, aprenderam a tarefa; o que não aconteceu no grupo FHIND (dia 2 ($F(7,55)=2,24$, $p<0,05$); dia 3 ($F(7,55)=2,78$, $p<0,05$); dia 4 ($F(7,55)=3,40$, $p<0,05$) e dia 5 ($F(7,55)=9,24$, $p<0,05$), demonstrando um efeito sexo-dependente do nado gestacional sobre o déficit de memória espacial induzido pela HI (Figura 8).

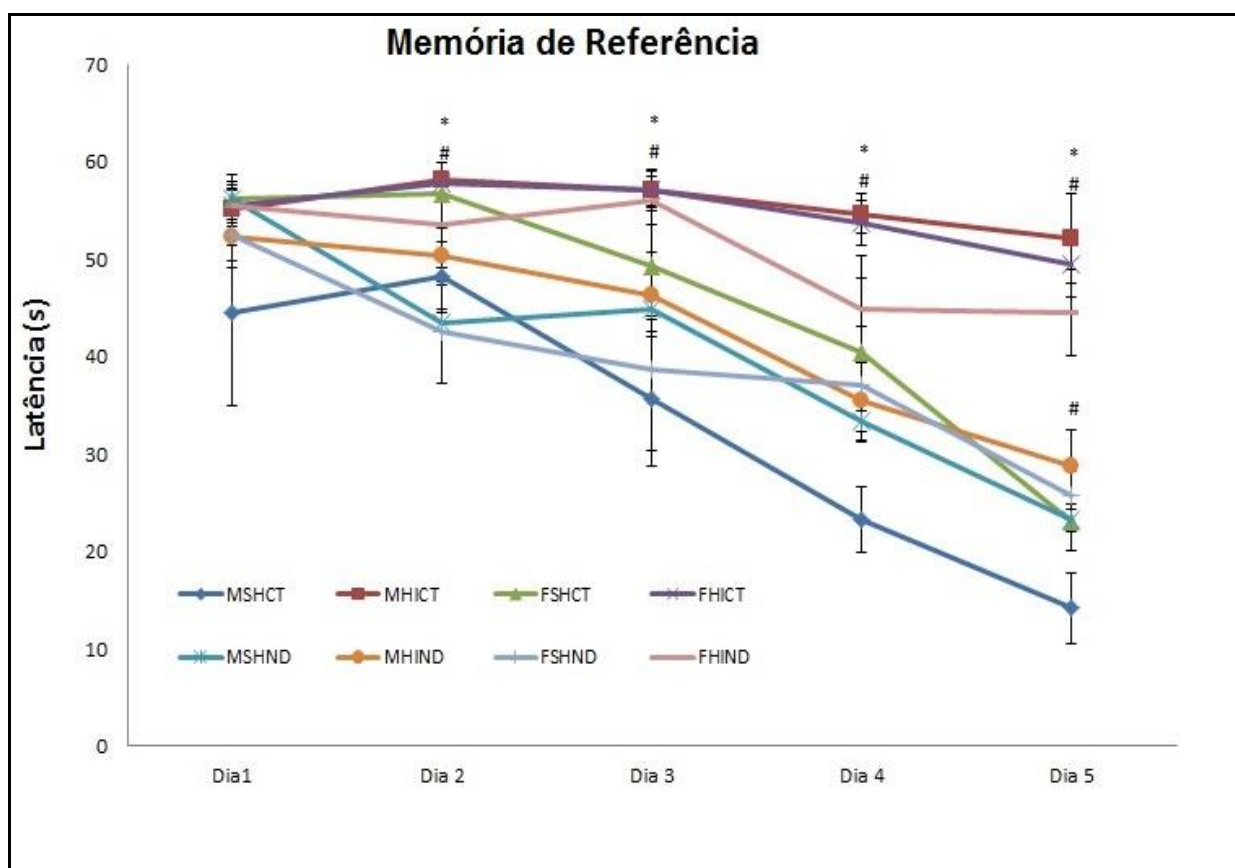


Figura 8 - Labirinto Aquático de Morris - Memória de Referência. Latência para encontrar a plataforma nas sessões de treino. Os dados são expressos como média \pm EP. *Diferença do HI para o respectivo controle. # Efeito do sexo.

No *Probe Trial* (teste dos animais) houve efeito da HI ($F(1,55)=4,27$, $p<0,05$) e ainda, interação entre sexo e tratamento ($F(1,55)=4,54$, $p<0,05$): as fêmeas HI demoraram mais para alcançar o local onde estaria a plataforma em comparação a

seus respectivos grupos controle. Já nos machos, como nos dias de treino, verificamos o efeito do tratamento, onde o tempo dos animais do grupo MHIND para encontrar a plataforma é similar quando comparado ao controle (MSHND), o que não ocorreu nas fêmeas (Figura 9).

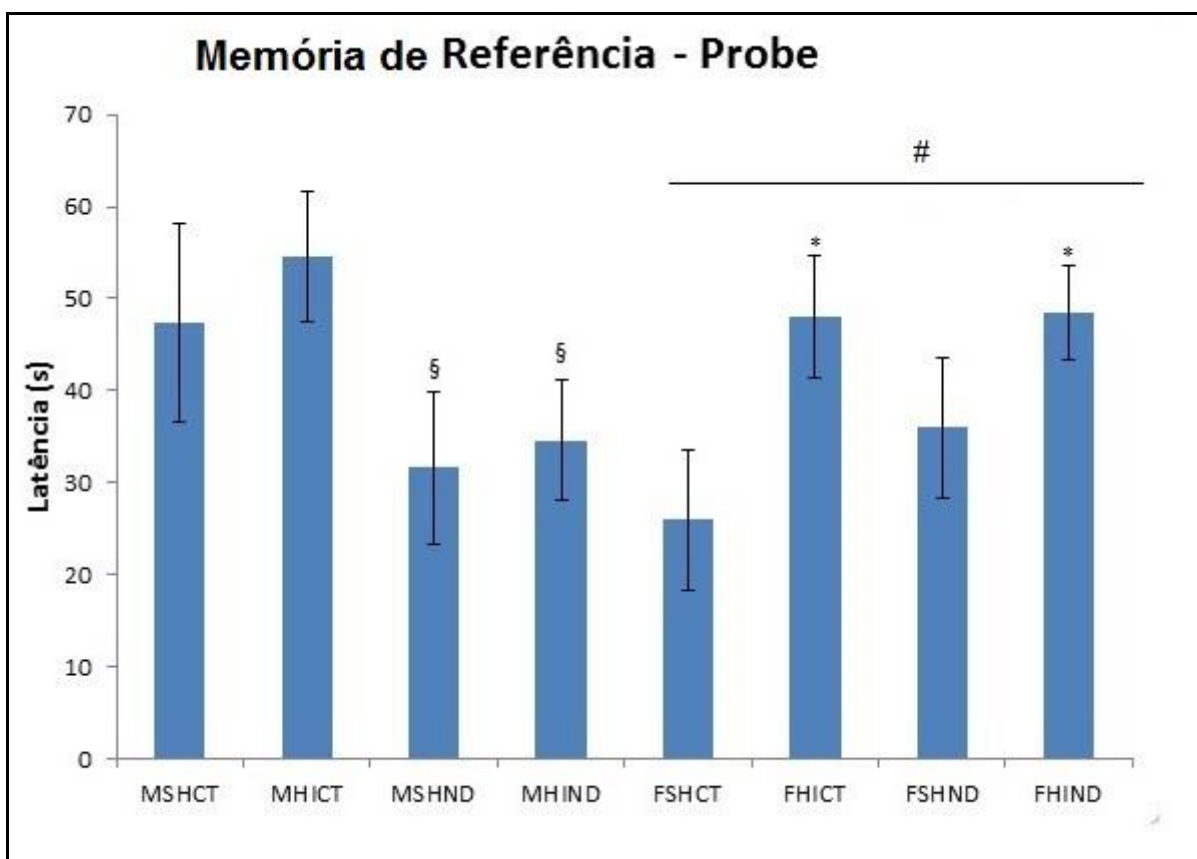


Figura 9 - Labirinto Aquático de Morris – Memória de Referência. Latência para encontrar a plataforma no dia do Probe. Os dados são expressos como média \pm EP. *Diferença do HI para o SHAM. § Efeito da natação. # Efeito do sexo.

No tempo gasto pelos animais na zona da plataforma durante o *Probe Trial* ($F(1,55)=4,63$, $p<0,05$), verificamos um efeito da HI quando comparados com os grupos SHAM: os animais HI permaneceram menos tempo sobre o local da plataforma. Porém, o nado gestacional não foi capaz de aumentar o tempo gasto nesta região nos animais tratados (Figura 10).

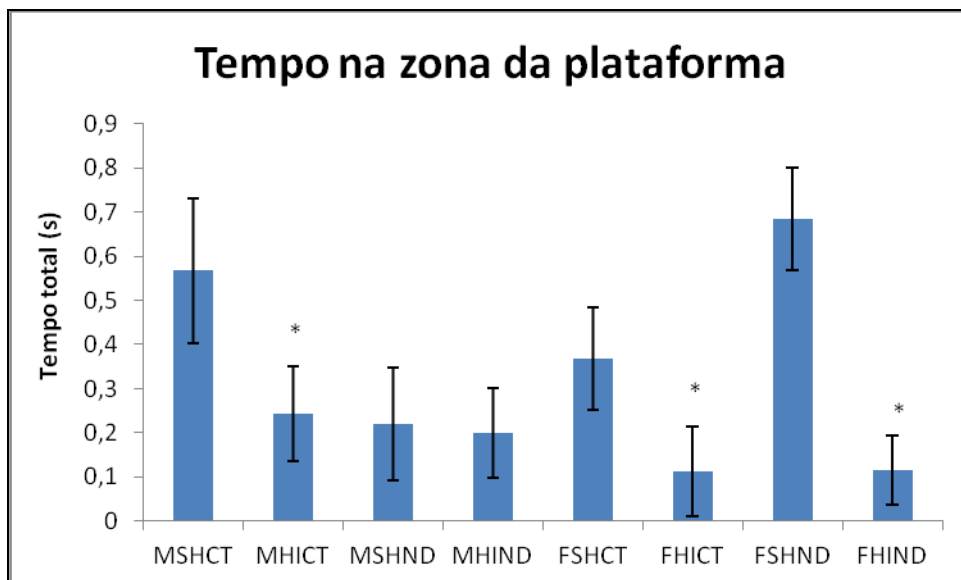


Figura 10 - Labirinto Aquático de Morris - Tempo na Zona da Plataforma. Os dados são expressos como média ± EP. * Diferença do HI para o SHAM.

4.2.2 Labirinto Aquático de Morris: Memória de Trabalho

No protocolo da memória de trabalho a ANOVA evidenciou efeito da HI no trial 1 (trial de aquisição) ($F(1,55)=12,52$, $p<0,05$). No trial 2, que mede o índice de retenção da memória da localização da plataforma (que é nova a cada dia), todos os grupos demonstraram ter aprendido a tarefa, reduzindo o tempo para encontrar a plataforma, exceto o grupo FHICT. Contudo, os grupos HI apresentaram latências superiores aos grupos controle. Não houve efeito do tratamento sobre a memória de trabalho e, analisando o efeito do sexo, há diferença entre os grupos FHICT e MHICT, com as fêmeas tendo desempenho pior na tarefa (Figura 11).

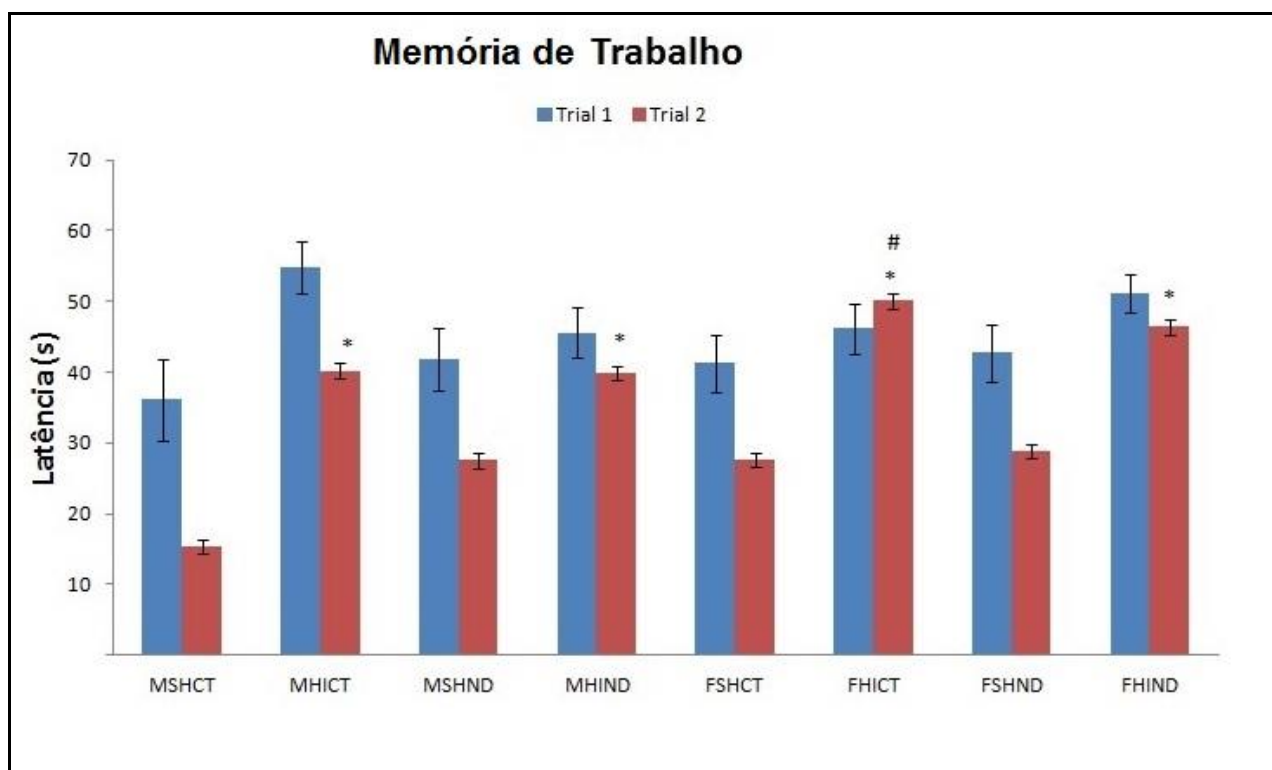


Figura 11 - Labirinto Aquático de Morris - Memória de Trabalho. Latência para encontrar a plataforma na primeira tentativa (trial 1 - coluna à esquerda) e segunda tentativa (trial 2 - coluna à direita). Os dados estão expressos como média \pm EP. * Diferença do HI para o SHAM. # Efeito do sexo. ($p < 0,05$).

4.2.3 Esquiva Inibitória

O teste de Kruskal Wallis evidenciou diferenças aumento das latências para descer da plataforma entre o treino e os testes de curta (90min) ($Z=30,17$ $p < 0,05$) e longa duração (24h) ($Z=36,5$ $p < 0,05$) em todos os grupos experimentais (Figura 12). O teste de Willcoxon mostrou que todos os grupos apresentaram retenção da tarefa, aumentando suas latências entre as sessões treino e testes (seja 90 minutos ou 24 horas). Os grupos MHICT, MHIND e FHIND quando comparados aos seus respectivos controles apresentaram pior desempenho nos testes 90 minutos e 24 horas. Contudo, os animais do grupo MHIND apresentaram melhor desempenho comparados aos animais MHICT. O teste de Mann Whitney revelou que os animais do grupo MSHCT foram diferentes dos MHICT nos tempos 90 e 24 horas ($U=1,50$,

$p < 0,05$ e $U = 2,00$, $p < 0,05$ respectivamente.) assim como os grupos MSHND e MHIND ($U = 6,0$, $p < 0,05$ e $U = 7,50$ respectivamente). De forma inesperada, os grupos FSHCT e FHICT não apresentaram diferenças nas sessões teste ($U = 12,50$, $p < 0,05$ e $U = 12,00$ $p < 0,05$). Já o grupo FHIND apresentou performance pior ao grupo FSHND nos testes ($U = 8,00$ e $U = 11,00$ $p < 0,5$, respectivamente). Os grupos MHICT e MHIND foram diferentes quando testados 24 horas ($U = 9,50$ $p < 0,05$). As FHICT e FHIND não apresentaram diferenças nos testes 90 minutos e 24 horas, demonstrando que houve proteção nos machos, porém, não nas fêmeas.

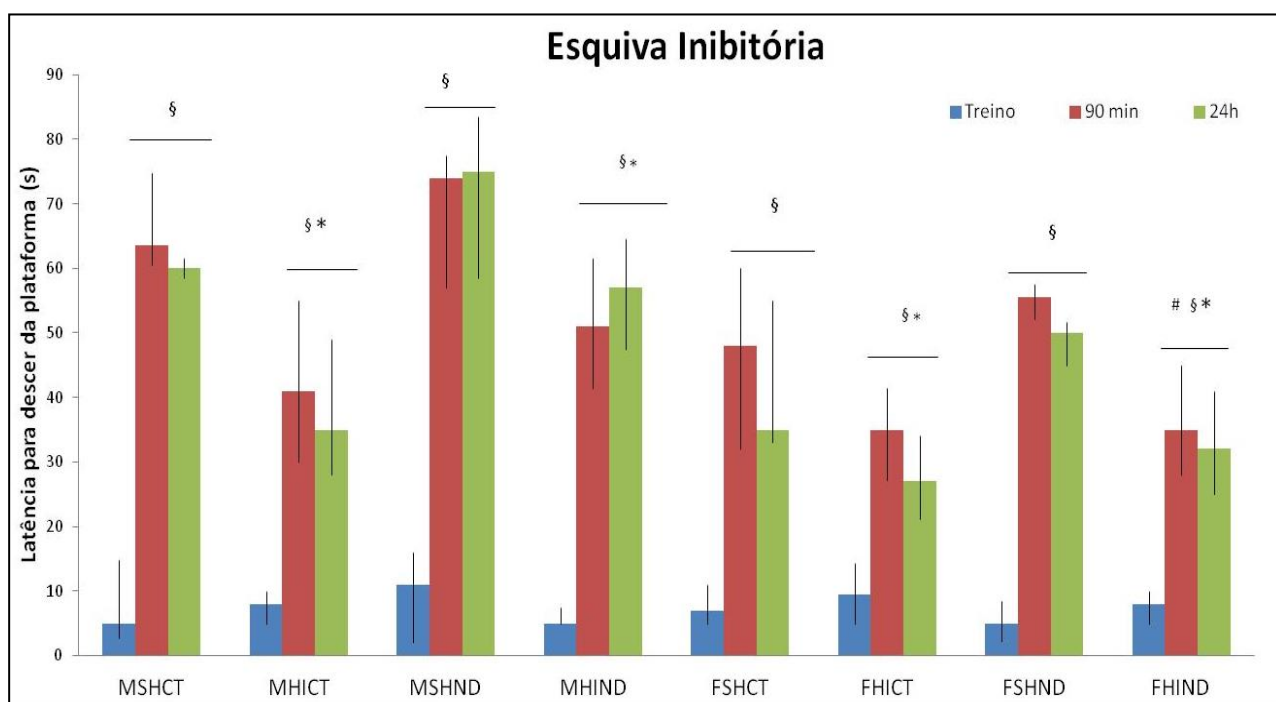


Figura 12 - Esquiva inibitória. Latência para descer da plataforma no treino (barra à esquerda), teste de memória de curta duração (barra central) e da memória de longa duração (barra à direita). Os dados representam a mediana e percentis 25 e 75%. *Diferença do HI para o respectivo SHAM. # MHIND vs. FHIND §Diferença entre treino e sessões de teste (90min ou 24h).

4.3 Análise Histológica

Como esperado, a análise estatística do hemisfério contralateral à lesão não se mostrou alterada entre os grupos. Já o hemisfério ipsilateral à lesão, nos grupos HI, possuiu volume inferior aos grupos controle ($F(1,26)= 10,50, p<0,05$), evidenciando o efeito da HI. O grupo FHIND apresentou maior volume hemisférico ipsilateral à lesão quando comparado com o grupo FHICT, inferindo uma neuroproteção proporcionada pelo tratamento. Ao comparar os hemisférios contra e ipsi laterais à lesão, observa-se diferença no volume hemisférico nos grupos MHICT, MHIND, FHICT, exceto nas FHIND, demonstrando interação entre sexo e tratamento (Figura 13).

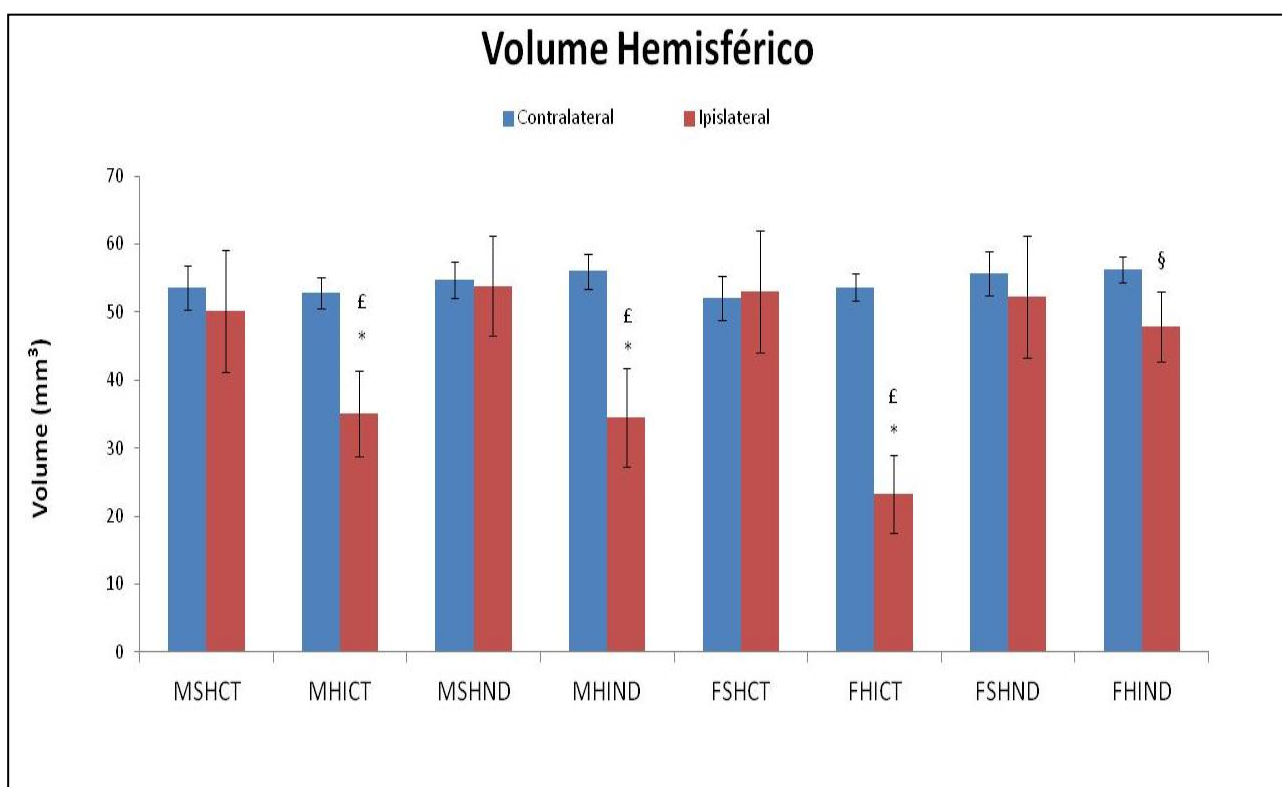


Figura 13 - Análise histológica do volume dos hemisférios ipsilaterais e contralaterais à oclusão da carótida avaliadas na região de Bregma -3,30mm. Os dados expressam o volume (mm³)±EP. *Diferença do HI para o SHAM. £ Teste-t : diferença entre ipsi e contralateral.§ Diferença entre Machos e Fêmeas.

Assim como o volume hemisférico, o analisar o volume hipocampal contralateral à lesão, não houve diferença entre os grupos. A hipóxia-isquemia reduziu o volume do hipocampo ipsilateral à lesão ($F(1,26)=24,76$, $p<0,01$). Além disso o nado foi capaz de proteger o dano estrutural nas fêmeas, pois o grupo FHICT quando comparado ao MHICT demonstrou menor perda tecidual quando comparados a seus respectivos controles (Figura 14).

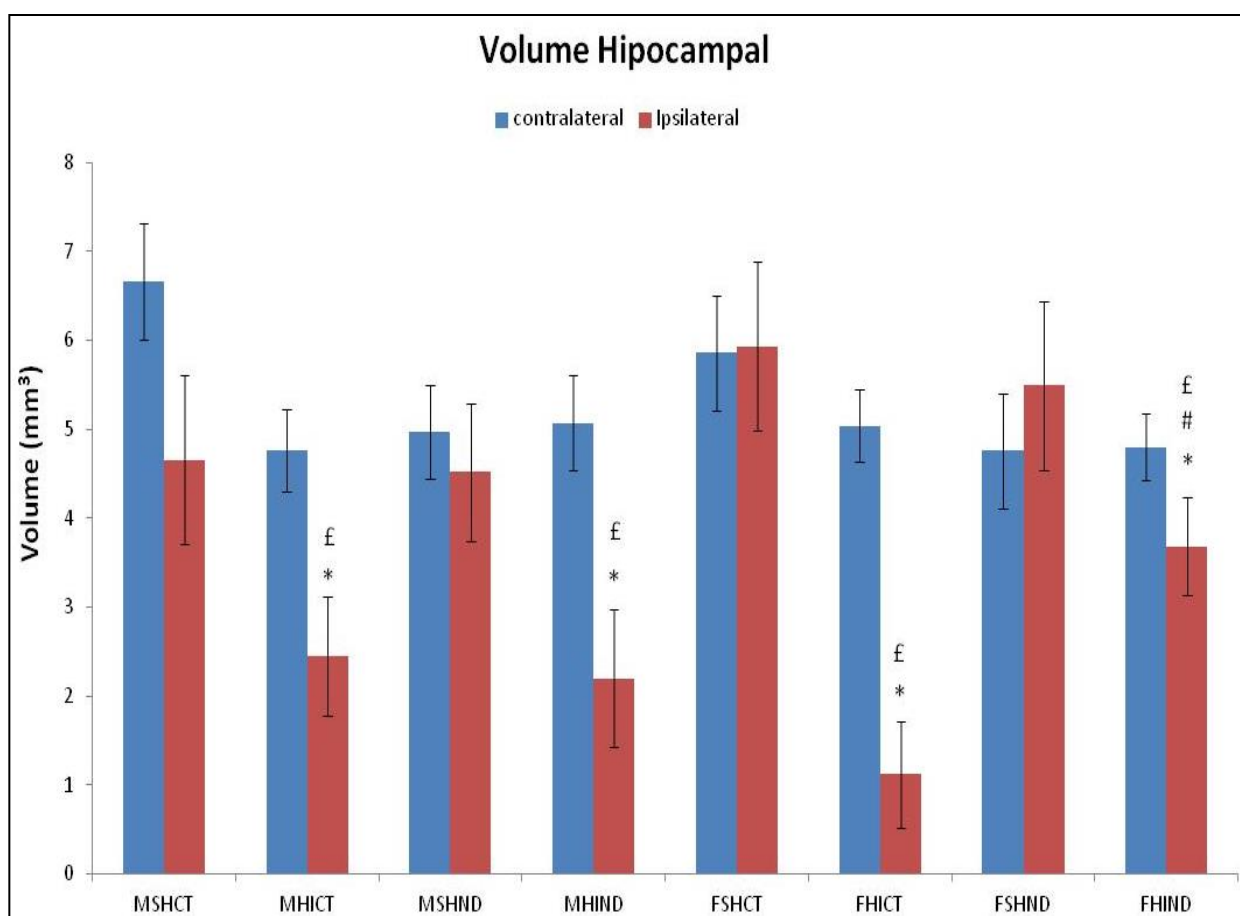


Figura 14 - Análise histológica do volume dos hipocampos ipsilaterais (coluna à direita) e contralaterais (coluna à esquerda) à oclusão da carótida avaliadas na região do Bregma 3,80mm. Os dados expressam o volume (mm³) ± EP. *Diferença do HI para o SHAM. £ Test t: diferença entre ipsi e contralateral. # Diferença entre FHIND e MHIND.

É possível observar as diferenças teciduais ao analisando a Figura 15.

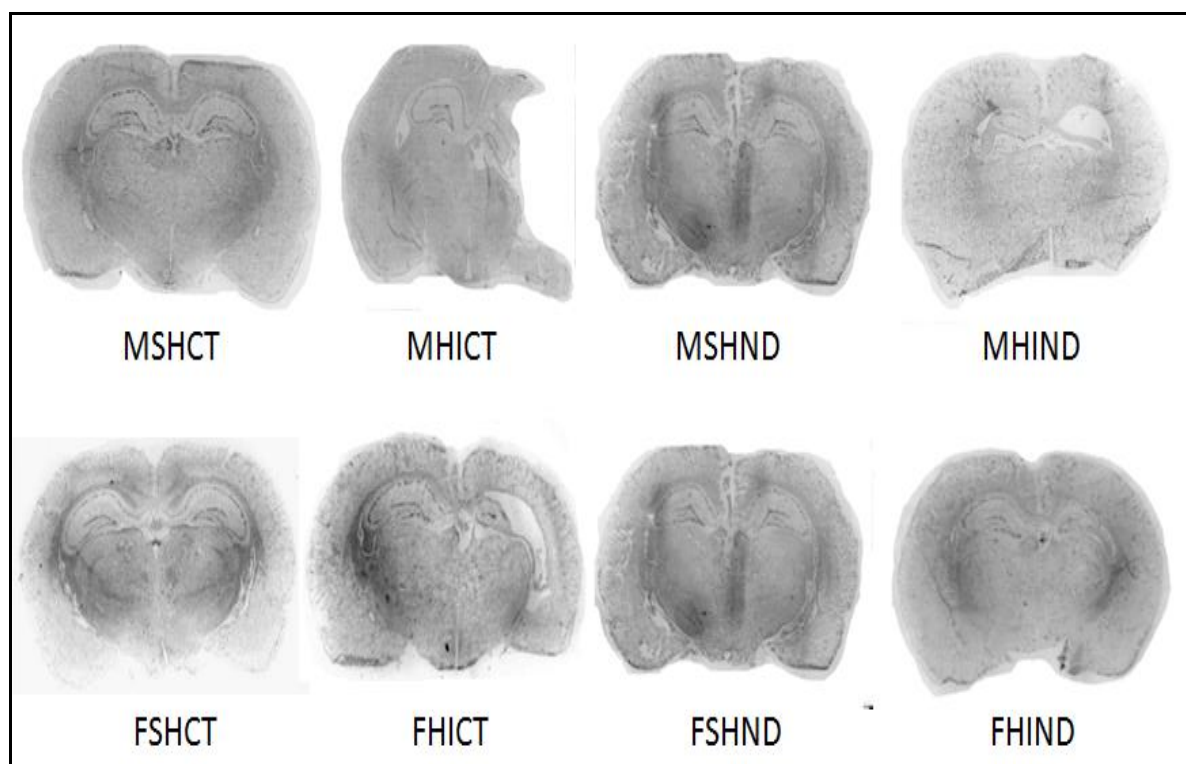


Figura 15- Imagens representativas de cortes histológicos corados com hematoxilina- eosina dos diferentes grupos experimentais.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho de conclusão de curso estudamos o efeito de um protocolo de nado gestacional sobre os déficits comportamentais e danos histológicos causados pela lesão hipóxica-isquêmica (HI). Verificamos que o exercício materno durante a gestação influenciou de forma sexo-dependente o desempenho das tarefas de memória espacial e aversiva na idade adulta. O efeito neuroprotetor da natação gestacional possivelmente deve-se a um aumento da plasticidade induzida pelo exercício sobre as estruturas responsáveis pela formação da memória, uma vez que o nado não foi capaz de reverter o dano histológico causado pela HI nos machos (que apresentaram melhor desempenho cognitivo) e reverteu nas fêmeas (com pior desempenho nas tarefas realizadas).

Uma forma de avaliarmos o desenvolvimento dos animais é a partir da análise do ganho de peso corpóreo, uma vez que a HI neonatal causa uma diminuição visível nesta medida (FATHALI ET AL., 2013; LI ET AL., 2011; TAI ET AL., 2009). Contudo, a literatura não é unânime sobre o efeito do exercício sobre esta medida. MATSUNO e colaboradores (1999) apontam que o exercício durante a gravidez poderia criar uma competição entre a glicose para os músculos da mãe e os músculos placentários, o que influenciaria no desenvolvimento do feto (MATSUNO ET AL., 1999). Outros estudos sugerem que o exercício regular durante a gravidez pode melhorar o crescimento placentário, aumentar o crescimento fetal e aumentar o peso ao nascer (LEE ET AL., 2006) e que o nado gestacional pode aumentar ainda mais esse ganho de peso (AKHAVAN ET AL., 2008). Em nosso estudo, não observamos efeito do exercício materno sobre essa medida. Demonstramos, como esperado, que os machos apresentam maior peso que as fêmeas, porém a medida não foi influenciada nem pelo tratamento nem pela HI. Uma possível explicação para

este fato pode ser de que o exercício realizado pelas mães (dez minutos, diariamente durante toda a gestação) seja considerado de intensidade de leve a moderada (LEE ET AL., 2006) e que não tenha tido a capacidade de alterar a interação metabólica entre os filhotes e a rata-mãe a ponto de alterar o peso corporal dos animais.

Há vários relatos de efeitos benéficos da atividade física sobre a função cerebral, tais como a melhora na aprendizagem e memória (FORDYCE E WEHNER, 1993; KRAMER ET AL., 1999), sobre a função cognitiva (LAURIN ET AL., 2001) e auxiliando na recuperação de lesões cerebrais traumáticas em humanos (GREALY ET AL., 1999). Experimentalmente, o exercício físico aeróbico tem demonstrado ser capaz de melhorar o desempenho dos animais em testes de aprendizagem como o labirinto aquático de Morris (VAYNMAN ET AL., 2004; VAN PRAAG ET AL., 1999). Esses estudos atribuem a melhora cognitiva induzida pelo exercício físico ao fato de provocar alterações em vias de sinalização e em regiões específicas do hipocampo, aumentando a proliferação celular e a neurogênese no giro denteado da prole de ratas grávidas submetidas à natação durante a gestação.

Já é bem descrito por nosso grupo (ARTENI ET AL., 2010, PEREIRA ET AL., 2007) que a lesão hipóxico-isquêmica provoca déficits cognitivos em diferentes tipos de memória: espacial, de trabalho e aversiva. Para analisar se a exposição ao exercício durante a gravidez possui efeitos protetores sobre a memória de animais que sofreram HI, testamos dois diferentes tipos de memória (espacial e aversiva) uma vez que o exercício feito na mãe parece induzir melhora no desempenho dos filhotes ao menos em tarefas espaciais (LEE ET AL. 2006, KIM ET AL., 2008). No water maze, a partir do segundo dia de treino observou-se menor latência do grupo MHIND para encontrar a plataforma (indicando maior capacidade de aprender a

tarifa) que o grupo MHICT, o que se manteve ao longo dos dias de treino (Figura 8). De maneira interessante, quando analisamos as fêmeas, esse efeito não se mantém, o que demonstra um efeito neuroprotetor sexo-dependente induzido pelo nado gestacional.

Ao avaliarmos a Memória de Trabalho (Figura 9), todos os grupos demonstraram ter aprendido a tarefa, exceto as FHICT que não diminuíram suas latências para encontrar a plataforma no segundo trial. O grupo MHIND foi capaz de encontrar a plataforma no segundo trial em um tempo menor comparado ao grupo MHICT, o que não se observou nas fêmeas. Sabe-se que o teste da memória de trabalho é dependente do córtex pré-frontal, estrutura que é relativamente preservada após a HIP7 devido à vascularização (ARTENI ET AL., 2010).

Estudos experimentais envolvendo a HI neonatal já vêm demonstrando que as estratégias terapêuticas (sejam farmacológicas ou não) possuem efeito diferenciado em machos e fêmeas. PEREIRA e colaboradores (2008) utilizando um protocolo de tratamento com enriquecimento ambiental demonstrou um efeito neuroprotetor sobre as fêmeas e não nos machos, mesmo sem prevenção do dano tecidual nestes animais. TSUJI e colegas (2010) evidenciaram melhor desempenho comportamental e preservação tecidual nas fêmeas (e não nos machos) após utilizar um protocolo de treinamento cognitivo para o tratamento da HI neonatal. Contudo, os mecanismos que medeiam essa recuperação não foram estudados em ambos os estudos e merecem cada vez mais atenção dos pesquisadores.

São vários os prováveis mecanismos que podem levar ao aumento da capacidade cognitiva induzida pelo exercício físico. Alterações no funcionamento dos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (GARCIA ET AL., 2003; IVY ET AL., 2003), aumento do número e expressão de receptores de fatores neurotróficos

como o BDNF (VAYNMAN ET AL., 2003), o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) e ativação do receptor para o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (FABEL ET AL., 2003), assim como aumento do número de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), no número de mitocôndrias e segundo Marcelino e colaboradores (2013), melhora do sistema antioxidante enzimático no córtex parietal, hipocampo, estriado e cerebelo têm sido ditos como responsáveis pela melhora cognitiva induzida pelo exercício físico aeróbico.

Outro teste cognitivo realizado foi o da esQUIVA INIBITÓRIA, a fim de analisar a memória aversiva de curta e longa duração dos animais. Observamos um pior desempenho nos animais HI confirmando dados prévios do grupo (SANCHES ET AL., 2013, ARTENI ET AL., 2010). De maneira geral, os animais (HI ou não) apresentaram latências aumentadas quando testados 90 minutos e 24 horas após o treino, mostrando terem retido a informação da tarefa. Assim como no teste da memória de referência, a esQUIVA evidenciou um maior prejuízo à memória das fêmeas (tratadas ou não). Além disso, no grupo MHIND as latências para descer da plataforma foram aumentadas comparando-se ao grupo MSHCT (Figura 12), o que demonstra um caráter neuroprotetor sexo-dependente do nado sobre o déficit cognitivo causado pela HI.

Poucos estudos utilizam a tarefa de esQUIVA na avaliação dos efeitos benéficos do exercício físico gestacional. Nossos resultados corroboram com os de MOKHTARI-ZAER e colaboradores (2013), em que após induzir déficit cognitivo com morfina e tratar os animais com natação (mas não no período gestacional), observou por meio do teste a reversão dos déficits cognitivos ocasionados pela morfina. Isso demonstra que o exercício (pelo menos nos machos, em nosso estudo) pode ter

agido sobre estruturas (tais como a amígdala) que são responsáveis pela formação e manutenção de memórias aversivas.

A lesão HI afeta diversas estruturas encefálicas, dentre as quais se destaca o hipocampo (ARTENI ET AL., 2010). Contudo, dados prévios do nosso grupo de estudo relatam que o efeito da lesão hipóxico-isquêmica é diferente sobre esta estrutura em machos e fêmeas (SANCHES ET AL., 2013; ARTENI ET AL., 2010). Observamos proteção tecidual do nado no grupo FHIND (que teve menor diminuição do volume hemisférico). Quando analisado o volume hipocampal - estrutura responsável pela preservação da memória espacial - os machos mantiveram o mesmo padrão encontrado no volume do hemisfério, em que houve uma redução do volume do hipocampo ipsilateral à lesão tanto no grupo controle como no grupo nado. Isso mostra que a melhora cognitiva apresentada pelo grupo MHIND nas tarefas espaciais se deveu a outros fatores, que não a preservação tecidual. Na análise dessa estrutura nas fêmeas, o grupo FHIND teve maior volume do hipocampo quando comparado com o grupo FHICT, evidenciando o efeito protetor do tratamento somente nas fêmeas. Porém, esta proteção tecidual observada nas fêmeas, não se refletiu nas avaliações comportamentais.

Uma possível explicação para estes resultados é que o tecido preservado nas fêmeas pode não ter função cognitiva, sendo formado por uma cicatriz astrocítica ou tecido conjuntivo (JONES e BOUVIER, 2014), enquanto nos machos o pouco tecido preservado pode ainda ser funcional, sendo composto de neurônios que contribuem para o melhor desempenho deles nos testes cognitivos. Tais resultados ressaltam a importância de considerarmos o sexo dos animais no estudo da HI, uma vez que têm-se fortes evidências experimentais de que há diferenças entre os sexos quanto as vias de morte celular (LANG e MCCULLOUGH, 2008; LIU ET AL., 2009;

RENOLLEAU, 2007) o que ajudaria a explicar os resultados encontrados neste trabalho.

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, concluímos que o protocolo de natação foi eficaz em reduzir alguns dos déficits cognitivos causados pela HI e que essa neuroproteção possui caráter sexo-dependente.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos permitem concluir que a natação durante a gestação:

- 1- Conferiu neuroproteção após a HI realizada nos filhotes de ratos Wistar;
- 2- Reverteu, de maneira sexo-dependente, os déficits de memória espacial e aversiva induzidos pela HI neonatal;
- 3- Promoveu preservação histológica, principalmente nas fêmeas, mas que não se traduziu em melhor desempenho nas tarefas cognitivas.

7. REFERÊNCIAS

- ARTENI, N.S., PEREIRA, L.O., RODRIGUES, A.L., LAVINSKY, D., ACHAVAL, M.E. & NETTO, C.A., 2010. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav. Brain Res*, 210,92-8.
- AKHAVAN, M.M., EMAMI-ABARGHOIE, M., SAFARI, M., SADIGHI-MOGHADDAM, B., VAFAEI, A.A., BANDEGI, A.R., RASHIDY-POUR, A. 2008. Serotonergic and noradrenergic lesions suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups. *J.Neuroscience*. 2007.10.051.
- BONA, E., HAGBERG, H., LØBERG, E.M., BÅGENHOLM, R., THORESEN, M., 1998. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatr. Res*. 43,738-45.
- BUNGUM, T.J., PEASLEE, D.L., JACKSON, A.W. & PEREZ, M.A., 2000. Exercise during pregnancy and type of delivery in nulliparae. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurse*, 29, 258-64.
- CARLETTI, J.V., DENIZ, B.F., MIGUEL, P.M., ROJAS, J.J., KOLLING, J., SCHERER, E.B., DE SOUZA WYSE, A.T., NETTO, C.A. & PEREIRA, L.O., 2012. Folic acid prevents behavioral impairment and Na(+), K(+) -ATPase inhibition caused by neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem. Res.*, 37, 1624-30.
- CLAPP, J.F., 2006. Effects of Diet and Exercise on Insulin Resistance during Pregnancy. *Metab. Syndr. Relat Disord.*, 4,84-90.
- COTMAN, C.W. & BERCHTOLD, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.*, 25, 295-301.
- COLBOURNE, F., CORBETT, D., 1995. Delayed post ischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J.Neurosci.* 15(11),7250–7260.
- DONDERS, J., HOFFMAN, N.M., 2002. Gender differences in learning and memory after pediatric traumatic brain injury. *Neuropsychology*. 16, 491-9.
- DRUMOND, L.E., MOURÃO, F.A., LEITE, H.R., ABREU, R.V., REIS, H.J., MORAES, M.F., PEREIRA, G.S. & MASSENSINI, A.R., 2012. Differential effects of swimming training on neuronal calcium sensor-1 expression in rat hippocampus/cortex and in object recognition memory tasks. *Brain Res Bull*, 88, 385-91
- DUGAN, L.L., KIM, J.S., ZHANG, Y., BART, R.D., SUN, Y., HOLTZMAN, D.M. & GUTMANN, D.H., 1999. Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J. Biol. Chem.*, 274,25842-8.

- ENGIDAWORK, E., CHEN, Y., DELL'ANNA, E., GOINY, M., LUBEC, G., UNGERSTEDT, U., ANDERSSON, K. & HERRERA-MARSCHITZ, M., 1997. Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral pH and glycolysis metabolism in the rat. *Exp. Neurol.*, 145, 390-6.
- ERECIŃSKA, M., NELSON, D., YUDKOFF, M. & SILVER, I.A., 1994. Energetics of the nerve terminal in relation to central nervous system function. *Biochem. Soc. Trans.*, 22, 959-65.
- EZMERLI, N.M., 2000. Exercise in pregnancy. *Prim Care Update Ob Gyns*, 7, 260-265. FABEL, K., TAM, B., KAUFER, D., BAIKER, A., SIMMONS, N., KUO, C.J., PALMER, T.D., 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 18:2803–2812.
- FIGUROV, A., POZZO-MILLER, L.D., OLAFSSON, P., WANG, T. & LU, B., 1996. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*, 381, 706-9.
- FORDYCE, D.E., WEHNER, J.M., 1993. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Res.* 619:111–119.
- GOBATTO, C.A., DE MELLO, M.A., SIBUYA, C.Y., DE AZEVEDO, J.R., DOS SANTOS, L.A. & KOKUBUN, E., 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 130, 21-7.
- GREALY, M.A., JOHNSON, D.A., RUSHTON S.K., 1999. Improving cognitive function after brain injury: the use of exercise and virtual reality. *Arch Phys Med Rehabil.* Jun;80(6):661-7.
- GUALTIERI, C.T., ONDRUSEK, M.G., FINLEY, C., 1985. Attention deficit disorders in adults. *Clin Neuropharmacol.* 8, 343-56.
- HAGBERG, H., 2004. Mitochondrial impairment in the developing brain after hypoxia-ischemia. *J. Bioenerg Biomembr.* 36, 369-73.
- HAGBERG, H., ICHORD, R., PALMER, C., YAGER, J.Y. & VANNUCCI, S.J., 2002. Animal models of developmental brain injury: relevance to human disease. A summary of the panel discussion from the Third Hershey Conference on Developmental Cerebral Blood Flow and Metabolism. *Dev. Neurosci.* 24, 364-6.
- HINDMARSH, G.J., O'CALLAGHAN, M.J., MOHAY, H.A., ROGERS, Y.M., 2000. Gender differences in cognitive abilities at 2 years in ELBW infants. Extremely low birth weight. *Early Hum Dev.* 60, 115-22.
- HILL, C.A., THRELKELD, S.W., FITCH, R.H., 2011. Early testosterone modulated sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia in rats. *Dev. Neurosci.* 29, 381-8.

JONES, E.V., BOUVIER, D.S., 2014. Astrocyte-secreted matricellular proteins in CNS remodeling during development and disease. *Neural Plast.*, 2014:321209.

JOHNSTON, M.V., HAGBERG, H., 2007. Sex and the pathogenesis of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 49, 74-8.

KATZ, V.L., 2003. Exercise in water during pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*, 46, 432-41.

KRAMER, A.F., HAHN, S., COHEN, N.J., BANICH, M.T., MCAULEY, E., HARRISON, C.R., CHASON, J., VAKIL, E., BARDELL, L., BOILEAU, R.A., COLOMBE A., 1999 Aging, fitness, and neurocognitive function. *Nature* 400:418 – 419.

KENT, A.L., WRIGHT, I.M., ABDEL-LATIF, M.E., GROUP, N.S.W.a.A.C.T.N.I.C.U.A., 2012. Mortality and adverse neurologic outcomes are greater in preterm male infants. *Pediatrics.* 129,124-31.

KESLER, S.R., REISS, A.L., VOHR, B., WATSON, C., SCHNEIDER, K.C., KATZ, K.H., MALLER-KESSELMAN, J., SILBEREIS, J., CONSTABLE, R.T., MAKUCH, R.W., MENT, L.R., 2008. Brain volume reductions within multiple cognitive systems in male preterm children at age twelve. *J Pediatr.* 152, 513-20, 520.e1.

KIM, Y.P., KIM, H.B., JANG, M.H., LIM, B.V., KIM, Y.J., KIM, H., KIM, S.S., KIM, E.H. & KIM, C.J., 2003. Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int J Sports Med*, 24, 114-7.

LANG, J.T., MCCULLOUGH, L.D., 2008. Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant. *J. Transl Med.* 6, 33.

LAURIN, D., VERREAULT, R., LINDSAY, J., MACPHERSON, K., ROCKWOOD, K., 2001. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol* 58:498 –504.

LAUTERBACH, M.D., RAZ, S., SANDER, C.J., 2001a. Neonatal hypoxic risk in preterm birth infants: the influence of sex and severity of respiratory distress on cognitive recovery. *Neuropsychology.* 15,411-20.

LAUTERBACH, M.D., RAZ, S., SANDER, C.J., 2001b. Neonatal hypoxic risk in preterm birth infants: the influence of sex and severity of respiratory distress on cognitive recovery. *Neuropsychology.* 15,411-20.

LEE, H.H., KIM, H., LEE, J.W., KIM, Y.S., YANG, H.Y., CHANG, H.K., LEE, T.H., SHIN, M.C., LEE, M.H., SHIN, M.S., PARK, S., BAEK, S. & KIM, C.J., 2006. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev*, 28, 147-54.

- LIU, M., DZIENNIS, S., HURN, P.D., ALKAYED, N.J., 2009. Mechanisms of genderlinked ischemic brain injury. *Restor Neurol Neurosci.* 27,163-79.
- 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, 1234-9.
- MADEIRA, M.D., LIEBERMAN, A.R., 1995. Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol.* 45, 275-333.
- MAGISTRETTI, P.J. & PELLERIN, L., 1999. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci*,14, 177-182.
- MANWANI, B., MCCULLOUGH, L.D., 2011. Sexual dimorphism in ischemic stroke: lessons from the laboratory. *Womens Health (Lond Engl)*. 7, 319-39.
- MARCELINO, T.B., LONGONI, A., KUDO, K.Y., STONE, V., RECH, A., DE ASSIS, A.M., SCHERER, E.B., DA CUNHA, M.J., WYSE, A.T., PETTENUZZO, L.F., LEIPNITZ, G. & MATTÉ, C., 2013. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience*, 246C, 28-39.
- MATSUNO, A.Y., ESREY, K.L., PERRAULT, H., KOSKI, K.G., 1999. Low intensity exercise and varying proportions of dietary glucose and fat modify milk and mammary gland compositions and pup growth. *J Nutr.* 129:1167–1175
- MAYORAL, S.R., OMAR, G., PENN, A.A., 2009. Sex differences in a hypoxia model of preterm brain damage. *Pediatr Res.* 66, 248-53.
- MCCULLOUGH, L.D., ZENG, Z., BLIZZARD, K.K., DEBCHOUDHURY, I., HURN, P.D., 2005. Ischemic nitric oxide and poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: male toxicity, female protection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25, 502-12.
- MCLEAN, C. & FERRIERO, D., 2004. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin Perinatol*, 28, 425-32.
- MENT, L.R., VOHR, B.R., MAKUCH, R.W., WESTERVELD, M., KATZ, K.H., SCHNEIDER, K.C., DUNCAN, C.C., EHRENKRANZ, R., OH, W., PHILIP, A.G., SCOTT, D.T., ALLAN, W.C., 2004. Prevention of intraventricular hemorrhage by indomethacin in male preterm infants. *J Pediatr.* 145, 832-4.
- MISHRA, O.P. & DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M., 1999. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res Bull*, 48, 233-8.
- MOSKAL, J.R., KROES, R.A., OTTO, N.J., RAHIMI, O. & CLAIBORNE, B.J., 2006. Distinct patterns of gene expression in the left and right hippocampal formation of developing rats. *Hippocampus*, 16, 629-34.

MOKHTARI – ZAER, A., GHODRATI – JALDBAKHAN, S., MILADI – GORJI, H., AKHAVAN, M.M., BANDEGI, A. R., RASHIDY – POUR, A., 2014. Effects of voluntary and treadmill exercise on spontaneous withdrawal signs, cognitive deficits and alterations in apoptosis-associated proteins in morphine-dependent rats. *Behav Brain Research*, 271:160-70.

NISHIZAWA, S., BENKELFAT, C., YOUNG, S.N., LEYTON, M., MZENGEZA, S., DE MONTIGNY, C., BLIER, P., DIKSIC, M., 1997. Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 5308-13.

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, 45-8.

PEACOCK, J.L., MARSTON, L., MARLOW, N., CALVERT, S.A., GREENOUGH, A., 2012. Neonatal and infant outcome in boys and girls born very prematurely. *Pediatr Res*. 71, 305-10.

PEREIRA, L.O., NABINGER, P.M., STRAPASSON, A.C., NARDIN, P., GONÇALVES, C.A., SIQUEIRA, I.R. & NETTO, C.A., 2009. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. *Brain Res*, 1247, 188-95.

POLLEY, B.A., WING, R.R. & SIMS, C.J., 2002. Randomized controlled trial to prevent excessive weight gain in pregnant women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26, 1494-502.

RAZ, N., GUNNING-DIXON, F., HEAD, D., RODRIGUE, K.M., WILLIAMSON, A., ACKER, J.D., 2004. Aging, sexual dimorphism, and hemispheric asymmetry of the cerebral cortex: replicability of regional differences in volume. *Neurobiol Aging*. 25, 377-96.

RENOLLEAU, S., FAU, S., CHARRIAUT-MARLANGUE, C., 2008. Gender-related differences in apoptotic pathways after neonatal cerebral ischemia. *Neuroscientist*. 14, 46-52.

ROSSITER, J.P., ANDERSON, L.L., YANG, F. & COLE, G.M., 2002. Caspase-3 activation and caspase-like proteolytic activity in human perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Acta Neuropathol*, 103, 66-73.

RUTTER, M., CASPI, A., MOFFITT, T.E., 2003. Using sex differences in psychopathology to study causal mechanisms: unifying issues and research strategies. *Journal Child Psychol Psychiatry*. 44, 1092-115.

SANCHES, E.F., ARTENI, N.S., NICOLA, F., BOISSERAND, L., WILLBORN, S. & NETTO, C.A., 2013a. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-

dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience*, 237, 208-15.

SANCHES, E.F., ARTENI, N.S., SCHERER, E.B., KOLLING, J., NICOLA, F., WILLBORN, S., WYSE, A.T. & NETTO, C.A., 2013b. Are the consequences of neonatal hypoxia-ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization? *Brain Res*, 1507, 105-14.

SCHINDER, A.F. & POO, M., 2000. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 23, 639-45.

SCHMIDT, B., DAVIS, P., MODDEMANN, D., OHLSSON, A., ROBERTS, R.S., SAIGAL, S., SOLIMANO, A., VINCER, M., WRIGHT, L.L., INVESTIGATORS, T.O.I.P.I.P., 2001. Long-term effects of indomethacin prophylaxis in extremely-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 344, 1966-72.
SOUZA, F. 2003. Fatores de risco associados à asfixia perinatal no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Osvaldo Cruz;

TAI, W.C., BURKE, K.A., DOMINGUEZ, J.F., GUNDAMRAJ, L., TURMAN, J.E., 2009. Growth deficits in a postnatal day 3 rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Behav Brain Res*. 202, 40-9.

TOWFIGHI, J., ZEC, N., YAGER, J., HOUSMAN, C., VANNUCCI, R.C., 1995. Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. *Acta Neuropathol*. 90, 375-86.

TREJO, J.L., CARRO, E. & TORRES-ALEMAN, I., 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 21, 1628-34.

TSUJI, S., 2010. [Future directions of neurology - breakthrough to the next stage. *Rinsho Shinkeigaku*, 50, 771-7.

VAN PRAAG, H., CHRISTIE, B.R., SEJNOWSKI, T.J. & GAGE, F.H., 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 13427-31.

VANHEEST, J.L. & RODGERS, C.D., 1997. Effects of exercise in diabetic rats before and during gestation on maternal and neonatal outcomes. *Am J Physiol*, 273, E727-33.

VANNUCCI, S.J. & HAGBERG, H., 2004. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol*, 207, 3149-54.

VAYNMAN, S., YING, Z., GOMEZ-PINILLA, F., 2003. Interplay between brain derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 122:647– 657.

VOLPE, 2008. Neurobiology of the newborn. 5th ed. Saunders, Philadelphia .

VOLPE, J.J., 2009. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol*, 8, 110-24.

WALTON, M., CONNOR, B., LAWLOR, P., YOUNG, D., SIRIMANNE, E., GLUCKMAN, P., COLE, G. & DRAGUNOW, M., 1999. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Brain Res Rev*, 29, 137-68.

WEITZDOERFER, R., POLLAK, A. & LUBEC, B., 2004. Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. *Semin Perinatol*, 28, 249-56.

ZHU, C., XU, F., WANG, X., SHIBATA, M., UCHIYAMA, Y., BLOMGREN, K., HAGBERG, H., 2006. Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *J Neurochem*. 96, 1016-27.

ZUBIETA, J.K., DANNALS, R.F., FROST, J.J., 1999. Gender and age influences on human brain mu-opioid receptor binding measured by PET. *Am J Psychiatry*. 156, 842-8.