



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

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA MEMÓRIA E COMPORTAMENTO  
ANSIOSO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À SEPARAÇÃO MATERNA**

**Luis Eduardo Wearick-Silva**

Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança

**Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira**

Orientador

Porto Alegre

JAN/2015

---



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

**Luis Eduardo Wearick-Silva**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA MEMÓRIA E COMPORTAMENTO  
ANSIOSO DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À SEPARAÇÃO MATERNA**

Dissertação apresentada à  
comissão avaliadora como  
requisito para a obtenção do  
título de Mestre em Pediatria e  
Saúde da Criança

Porto Alegre

JAN/2015

---

## FICHA CATALOGRÁFICA

**W362e** Wearick-Silva, Luis Eduardo  
Efeitos do exercício físico na memória e comportamento ansioso de camundongos expostos à separação materna. / Luis Eduardo Wearick-Silva. – Porto Alegre, 2015.  
60 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança - Faculdade de Medicina, PUCRS.  
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira

1. Pediatria. 2. Separação Materna. 3. Exercício Físico. 4. Memória. 5. Adolescência. 6. Ansiedade. I. Grassi-Oliveira, Rodrigo. II. Título.

**CDD 618.92**

---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a CAPES pelo incentivo e auxílio financeiro para que este projeto pudesse ser realizado. Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira por ser mais que apenas meu orientador, mas também um grande amigo e uma referência profissional para mim. Obrigado por acreditar e confiar no meu trabalho. Agradeço aos meus colegas do GNCD Breno, Bruno, Saulo e Mateus pela amizade e parceria.

Ao longo desta trajetória, tive a oportunidade de conviver muito tempo com o Thiago Viola, que se tornou um grande amigo e uma referência acadêmica, por tratar-se de uma pessoa extremamente dedicada e inteligente. Além disso, suas contribuições para este projeto e a parceria para entrar madrugada adentro realizando os experimentos foram essenciais para que este trabalho fosse viável, e por isso sou extremamente grato a ti. Felizmente, temos ainda muitos projetos e desafios pela frente, nos quais eu gostaria muito de contar com o teu auxílio.

Um agradecimento especial ao Anderson Centeno e a Patrícia Cruz, pelo apoio incansável durante a realização dos experimentos.

Muito obrigado a Marta Speck e a Dr. Luísa Braga, juntamente com a Andressa Vargas e Juliana Etges, pelo treinamento e auxílio técnico prestado ao longo de todo o projeto.

A minha família, que sempre muito unida superou todos os desafios, mas especialmente aos meus pais, por todo o suporte e esforço. Sou grato e sortudo por ter os melhores irmãos que a vida poderia me dar.

Finalmente, à minha esposa que eu amo muito, Marinna Schmal, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência, assim como o incentivo nos momentos de fraqueza.

---

---

## RESUMO

**Introdução:** A exposição ao estresse no início da vida está associada com diferentes psicopatologias na fase adulta como transtornos de humor e ansiedade. Em pesquisas com modelos animais, o paradigma de separação materna é amplamente utilizado para investigar os efeitos de longo prazo do estresse no início da vida. Considerando os efeitos negativos do estresse no desenvolvimento, começam a surgir evidências que o exercício poderia atenuar ou até mesmo reverter os efeitos deletérios do estresse. Este trabalho se propôs a investigar o impacto do exercício físico no comportamento ansioso e memória espacial de camundongos fêmeas expostas a separação materna.

**Método:** Os filhotes foram expostos a um protocolo de separação materna no qual eram separados da mãe diariamente por 180 minutos, do segundo dia pós natal (P2) ao P15. O protocolo de exercício físico foi realizado no P24, e consiste em uma semana de habituação a esteira elétrica e três semanas de exercício, com 5 sessões por semana de 60 minutos cada, a uma velocidade de 10m/min. O comportamento no teste de campo aberto foi avaliado para investigar a atividade locomotora e o comportamento ansioso. O teste de reconhecimento de objetos foi realizado para investigar o efeito do exercício e da separação materna na memória espacial.

**Resultados:** A separação materna e o exercício aumentaram a atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto. O comportamento ansioso não foi afetado pela separação materna ou exercício. No reconhecimento de objetos, todos os grupos apresentaram o mesmo comportamento exploratório. Entretanto, a separação materna prejudicou a capacidade de reconhecimento do objeto novo, sugerindo um prejuízo na memória espacial. Ainda, os animais separados da mãe que realizaram o protocolo de exercício foram capazes de reverter os efeitos negativos da separação materna, onde mostraram um resultado semelhante ao grupo controle.

**Conclusões:** Nossos resultados sugerem que a interrupção do curso normal do desenvolvimento, aqui realizados através da separação materna é prejudicial para um bom desenvolvimento e pode levar a dificuldades cognitivas e comportamentais na vida adulta. Além disso, a participação precoce em um programa de exercícios físicos pode ser efetivo para reverter os prejuízos causados pelo estresse no início da vida.

---

---

## ABSTRACT

**Introduction:** The exposure to early life stress (ELS) has been associated with different psychopathologies in adulthood such as mood- and anxiety-related behaviors. In animal research, the maternal separation paradigm has been widely used to investigate the long-term effects of ELS. Considering the negative effects of ELS on development, evidences suggesting that exercise could attenuate or even reverse such effects are beginning to emerge. This article aimed to investigate the impact of physical exercise on anxiety-like behavior and spatial memory in mice exposed to maternal separation.

**Method:** Litters were assigned to one of 4 groups: The MS animals were subjected to a procedure where pups were separated from their dams daily for 180 minutes, from postnatal days (P) 2 to 15. The exercise protocol was performed at P24 and consisted of one week of habituation to treadmill and 3 weeks of exercise, with 60 min of duration at 10 m/min for 5 days a week. The performance in an open field test was evaluated to assess locomotor activity and anxiety-like behavior. Object recognition was also performed to investigate the effects of MS and exercise on spatial memory.

**Results:** Both maternal separation and exercise increased locomotor activity in the open field. However, anxiety-like behavior was not affected by MS or exercise. In object recognition, all groups presented the same exploratory behavior. However, MS impaired the capability to recognize the new object, suggesting impairment in spatial memory. In time, MS mice that exercised were able to reverse the negative effects of MS, showing a performance similar to the control group (AFR). Taken together, our results suggest that the disruption of the normal development course—here via maternal separation paradigms—is harmful to a good development and may result in cognitive and behavioral difficulties in adulthood. Furthermore, the early engagement in a program of exercise can be effective in reversing the impairments of ELS.

---

---

**LISTA DE FIGURAS**

## Capítulo II

Figura 1.....39

## Capítulo III

Figura 1.....51

Figura 2.....52

Figura 3 .....53

---

---

**LISTA DE TABELAS**

Capítulo II

Tabela 1.....36

Tabela 2.....37-38



---

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADHD – Attention Deficit/Hyperactivity Disorder

AFR – Animal Facility Reared

BDNF – Brain Derived Neurotrophic Factor

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ELS – Early Life Stress

GC - Glucocorticoid

GDNF – Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor

GR – Glucocorticoid Receptor

HPA - Hypothalamic-Pituitary-Adrenal

IGF – Insulin-like Growth Factor

IHC - Immunohistochemistry

MS – Maternal Separation

MWM - Morris Water Maze

NGF – Nerve Growth Factor

NT3 – Neurotrophin-3

NT4/5 Neurotrophin-4/5

ORT – Object Recognition Task

PAT – Passive Avoidance Task

PCR/RT-PCR - Polymerase Chain Reaction / Real Time Polymerase Chain Reaction

RAWM – Radial Arm Water Maze

TRkB - Tropomyosin-Related kinase B

WB – Western Blot

---

---

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	11
INTRODUÇÃO .....	12
JUSTIFICATIVA.....	14
OBJETIVOS .....	15
REFERÊNCIAS .....	16
CAPÍTULO II .....	19
ABSTRACT.....	21
INTRODUCTION.....	22
METHODS .....	23
RESULTS .....	24
DISCUSSION .....	28
REFERENCES.....	32
CAPÍTULO III.....	40
REFERENCES.....	54
CAPÍTULO IV .....	59
CONCLUSÕES.....	60

---

## **CAPÍTULO I**

---

---

## INTRODUÇÃO

Uma série de consequências decorrentes da exposição a eventos estressores no início da vida tem sido relatadas como fator de risco para o desenvolvimento de diferentes patologias na vida adulta, como por exemplo, asma (1, 2), obesidade (3) e diferentes transtornos psiquiátricos relacionados a humor e ansiedade (4).

A exposição a eventos estressores promove alterações em parâmetros biológicos (sistema nervoso central, endócrino e imunitário) e comportamentais (5). Teicher et. al. (2003) demonstrou que o estresse excessivo desempenha um papel tóxico que interfere na progressão normal do desenvolvimento cerebral (6).

Durante os primeiros anos de vida, o indivíduo está mais suscetível às mudanças ambientais e a exposição ao estresse crônico pode promover mudanças a níveis estruturais e funcionais no cérebro. Diversas alterações neurobiológicas foram observadas em roedores expostos à estresse precoce, como um desenvolvimento atípico do córtex pré frontal (PFC) (7) e alterações hipocampais (8), além de alterações volumétricas cerebelares encontradas em estudos com primatas expostos a estresse na infância (9). Concomitante a isso, alterações na resposta ao estresse, como uma desregulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), aumentada reatividade ao estresse e aumento nos níveis de cortisol podem ser observados em indivíduos expostos a estresse precoce na infância (5).

Neste sentido, diferentes modelos animais de estresse precoce vêm sendo utilizados para investigar os mecanismos envolvidos na exposição ao estresse precoce. Durante o neurodesenvolvimento, diferentes neurotrofinas, principalmente o BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) e o GDNF (Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor) desempenham um papel importante, auxiliando na neurogênese, diferenciação neuronal e plasticidade. Estudos anteriores demonstraram alterações na expressão de

---

---

BDNF em roedores expostos a um protocolo de estresse nos períodos iniciais da vida(10), levando a consequentes prejuízos cognitivos (11) e comportamentais (12).

Baseado nesta breve introdução, esta dissertação foi organizado em quatro capítulos. O Capítulo I apresenta a organização dos capítulos subsequentes, com uma justificativa e apresentação dos objetivos. O capítulo II apresenta a revisão sistemática, conduzida em importantes bases de dados com o objetivo de responder a seguinte pergunta de pesquisa: Existe uma relação entre exercício físico, a expressão de fatores neurotróficos e o desempenho em tarefas de memória?

No Capítulo III, é apresentado o artigo empírico, desenvolvido a partir do seguinte problema de pesquisa: O exercício físico na infância e adolescência é capaz de reverter os efeitos deletérios do estresse precoce? Para responder essa pergunta, camundongos foram expostos a um protocolo de estresse precoce, através da separação materna e depois exercitados em esteira elétrica durante a infância e adolescência. Para investigar os efeitos da separação materna e do exercício, os animais foram então avaliados em dois testes: o teste de reconhecimento de objetos, para avaliar a memória espacial de curta duração e o teste de campo aberto, para investigar o comportamento ansioso.

Finalmente, no capítulo IV, são apresentadas as conclusões desta dissertação, bem como o direcionamento para estudos futuros.

---

## JUSTIFICATIVA

Conforme exposto anteriormente, sabe-se que a exposição a eventos estressores no início da vida pode apresentar-se como um fator de risco para o desenvolvimento de diferentes psicopatologias. Muitos esforços têm sido empregados com o intuito de entender as manifestações clínicas e comportamentais de indivíduos expostos ao estresse durante a gestação e no início da vida. Estudos recentes sugerem que os efeitos do estresse podem ser transmitidos da mãe para os filhos através de diferentes vias, biológicas e/ou comportamentais. O entendimento desses processos pode auxiliar a sociedade em geral e dar base conceitual para a elaboração de políticas públicas voltadas à prevenção de manifestações cognitivo-comportamentais em crianças expostas a situações de maus-tratos.

Além disso, há um robusto corpo de evidências na literatura relatando os benefícios do exercício físico na promoção de saúde e tratamento de doenças (13-16). Estudos anteriores em modelos animais de exercício físico mostraram melhoras na resposta ao estresse (17), diminuindo assim os prejuízos causados por essa exposição, além de também estimular a expressão de BDNF no cérebro e levar a consequentes melhoras no funcionamento cognitivo (18) e comportamental (19).

Desta forma, busca-se entender de que forma o exercício físico está interagindo com as alterações decorrentes do estresse na infância e através de quais mecanismos o exercício pode auxiliar na redução dos efeitos deletérios do estresse precoce ao longo do desenvolvimento. O entendimento destes processos pode auxiliar e dar base para a elaboração de futuras políticas públicas preventivas voltadas às crianças expostas a situações de maus-tratos.

## **OBJETIVOS**

### **Artigo de Revisão**

- Investigar a relação entre exercício físico, neurotrofinas e o desempenho em tarefas de memória;
- Investigar aspectos metodológicos que poderiam influenciar estas variáveis;

### **Artigo Original**

- Investigar o efeito da separação materna no comportamento ansioso de camundongos;
  - Investigar o efeito da exercício físico no comportamento ansioso de camundongos;
  - Investigar o efeito da separação materna na memória espacial de camundongos;
  - Investigar o efeito da exercício físico na memória espacial de camundongos;
-

---

## REFERÊNCIAS

1. Scott KM, Smith DA, Ellis PM. A population study of childhood maltreatment and asthma diagnosis: differential associations between child protection database versus retrospective self-reported data. *Psychosomatic medicine*. 2012;74(8):817-23.
  2. Danese A, Tan M. Childhood maltreatment and obesity: systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2014;19(5):544-54. Epub 2013/05/22.
  3. Danese A, Tan M. Childhood maltreatment and obesity: systematic review and meta-analysis. *Molecular psychiatry*. 2013.
  4. Scott KM, McLaughlin KA, Smith DA, Ellis PM. Childhood maltreatment and DSM-IV adult mental disorders: comparison of prospective and retrospective findings. *Br J Psychiatry*. 2012;200(6):469-75. Epub 2012/06/05.
  5. Grassi-Oliveira R, Ashy M, Stein LM. Psychobiology of childhood maltreatment: effects of allostatic load? *Revista brasileira de psiquiatria*. 2008;30(1):60-8.
  6. Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2003;27(1-2):33-44.
  7. Chocyk A, Bobula B, Dudys D, Przyborowska A, Majcher-Maslanka I, Hess G, et al. Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur J Neurosci*. 2013;38(1):2089-107. Epub 2013/04/16.
  8. Suri D, Bhattacharya A, Vaidya VA. Early stress evokes temporally distinct consequences on the hippocampal transcriptome, anxiety and cognitive behaviour. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*. 2013:1-13.
-



- 
9. Spinelli S, Chefer S, Suomi SJ, Higley JD, Barr CS, Stein E. Early-life stress induces long-term morphologic changes in primate brain. *Archives of general psychiatry*. 2009;66(6):658-65.
  10. Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *The European journal of neuroscience*. 2007;25(10):3091-8.
  11. Wang L, Jiao J, Dulawa SC. Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011;216(2):207-18. Epub 2011/02/19.
  12. Anier K, Malinovskaja K, Pruus K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A. Maternal separation is associated with DNA methylation and behavioural changes in adult rats. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2013.
  13. Blumenthal JA, Babyak MA, Doraiswamy PM, Watkins L, Hoffman BM, Barbour KA, et al. Exercise and pharmacotherapy in the treatment of major depressive disorder. *Psychosomatic medicine*. 2007;69(7):587-96.
  14. Silveira H, Moraes H, Oliveira N, Coutinho ES, Laks J, Deslandes A. Physical exercise and clinically depressed patients: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychobiology*. 2013;67(2):61-8.
  15. Heyn P, Abreu BC, Ottenbacher KJ. The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2004;85(10):1694-704.
  16. Hirsch MA, Toole T, Maitland CG, Rider RA. The effects of balance training and high-intensity resistance training on persons with idiopathic Parkinson's disease. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2003;84(8):1109-17.
-

17. Fediuc S, Campbell JE, Riddell MC. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol* (1985). 2006;100(6):1867-75.
  18. Bechara RG, Kelly AM. Exercise improves object recognition memory and induces BDNF expression and cell proliferation in cognitively enriched rats. *Behavioural brain research*. 2013;245:96-100.
  19. Yin MM, Wang W, Sun J, Liu S, Liu XL, Niu YM, et al. Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring. *Behav Brain Res*. 2013;253:297-304. Epub 2013/08/07.
-