

VITOR YONAMINE LEE

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO MATERNO ESPONTÂNEO E DA ANÓXIA
NEONATAL NO DESENVOLVIMENTO, NA MEMÓRIA ESPACIAL E NO
HIPOCAMPO DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

Lee VY. Influência do exercício materno espontâneo e da anóxia neonatal no desenvolvimento, na memória espacial e no hipocampo de ratos. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A anóxia neonatal ocorre quando há falta de oxigênio nos tecidos do feto ou do recém-nascido. Ela atinge cerca de 0,1 a 0,3% das crianças nascidas a termo e aproximadamente 60% das crianças prematuras com baixo peso ao nascer. Dentre os indivíduos que apresentam encefalopatia hipóxico-isquêmica, 20 a 50% morrem no período neonatal e 25% dos sobreviventes exibem algum problema neurológico permanente, como epilepsia, déficit cognitivo e dificuldade de aprendizagem. Pesquisas com exercício físico, crioproteção e drogas buscam tratar indivíduos afligidos pela anóxia, mas há poucos trabalhos voltados para a prevenção. Neste projeto foi avaliado se o exercício físico em ratas gestantes é capaz de prevenir os efeitos da anóxia neonatal nos seus filhotes. Para isso, as ratas prenhas foram alocadas em gaiolas de atividade com roda giratória para realizarem exercício espontâneo, a fim de minimizar estresse experimental. Os filhotes sofreram anóxia neonatal em P2 e o seu desenvolvimento somático e sensorimotor foram avaliados. Na idade adulta, P60, o seu comportamento e a sua memória espacial foram avaliados no teste do Labirinto aquático de Morris. Também analisamos a densidade de neurônios maduros por imunohistoquímica e a expressão relativa de sinapsina I por Western Blot de animais jovens e adultos. O exercício materno espontâneo foi capaz de reverter o atraso provocado pela anóxia neonatal no aparecimento de várias características do desenvolvimento somático e sensorimotor. Ele também atenuou a diminuição da densidade neuronal no giro dentado e a diminuição da expressão relativa de sinapsina I no hipocampo, promovidas pela anóxia neonatal, em animais com 21 dias de vida. Entretanto, as alterações provocadas pela anóxia neonatal e pelo exercício materno na imunorreatividade do hipocampo aparentemente sumiram nos animais adultos, talvez por efeito da recuperação dos sujeitos. Além disso, não houve efeito do exercício materno nem da anóxia neonatal na latência e no percurso no teste de memória. A anóxia aumentou a velocidade de nado dos animais, provavelmente por hiperatividade. Este estudo indica que o exercício materno espontâneo tem potencial ação preventiva contra os efeitos da anóxia neonatal.

Palavras-chave: Anoxia neonatal. Exercício materno. Desenvolvimento somático. Desenvolvimento sensorimotor. Labirinto aquático de Morris. Sinapsina I.

ABSTRACT

Lee VY. Influence of spontaneous maternal exercise and neonatal anoxia in the development, spatial memory and hippocampus of rats. [Masters thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Neonatal anoxia occurs when oxygen lacks in tissues of fetus or newborn. It reaches about 0,1 to 0,3% of children born in term and approximately 60% of premature children with low birth weight. Among individuals with hipoxic-ischemic encephalopathy, 20 to 50% die at the neonatal period and 25% of survivors exhibit some neurological permanent problem as epilepsy, cognitive deficits and difficulty of learning. Researches with physical exercise, cryoprotection and drugs seek to treat individuals afflicted by anoxia, but there are few researches that deal with prevention. This project evaluates if the physical exercise in pregnant rats is capable of prevent the effects of neonatal anoxia in pups. Pregnant rats was alocated inside activity cages with running wheel to perform spontaneous exercise, therefore minimizing the experimental stress. Pups suffered neonatal anoxia in P2 and their somatic and sensorymotor development were evaluated. At adult age, P60, their behaviour and their spatial memory were evaluated in Morris water maze task. We analysed also the mature neuronal density by immunochemistry and the relative expression of synapsin I by Western Blot of youngers and adults animals. The spontaneous maternal exercise was able to reverse the delay induced by neonatal anoxia related to the appearance of various characteristics of the somatic and sensorymotor development. It also attenuated the decrease of neuronal density on the dentate gyrus and on the decrease in relative expression of synapsin I in the hippocampus, promoted by neonatal anoxia, in 21 days old animals. However, the changes caused by neonatal anoxia and maternal exercise in the hippocampus immunoreactivity apparently disappear in adult animals, maybe by effect of recuperation of the subjects. Furthermore, groups didn't exhibited differences between themselves at latency and traject. Anoxia increased the swim velocity, probability because hyperactivity stimuli. This project shows that the spontaneous maternal exercise has potential preventive action against the effects of neonatal anoxia.

Keywords: Neonatal anoxia. Maternal exercise. Somatic development. Sensorymotor development. Morris water maze. Synapsin I.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Redução do suprimento de oxigênio no período perinatal

Anóxia neonatal ou perinatal é um termo utilizado clinicamente para casos de redução do nível de oxigênio no período perinatal (FUNAYAMA, 2005). Ela é diagnosticada, principalmente, pela classificação do conceito no índice ou escore de Apgar (APGAR, 1953; FUNAYAMA, 2005), que atribui menor pontuação aos recém-nascidos que apresentam maior grau de depressão do estado geral. A baixa pontuação neste escore, entretanto, não indica necessariamente ocorrência de anóxia neonatal, pois as alterações fisiológicas avaliadas pelo método podem decorrer de outros tipos de injúrias (CRAWFORD; DAVIES; PEARSON, 1973; FINSTER; WOOD, 2005; FUNAYAMA, 2005; SYKES et al., 1982).

Devido a seu perfil epidemiológico heterogêneo o diagnóstico da anóxia neonatal pode se basear também em outros critérios (CLEIRICI; LUZZIETI; DI RENZO, 2001; FRANCISCO et al., 2000; NOMURA et al., 2003; SYKES et al., 1982), contribuindo para que o termo abranja casos clínicos com diferenças entre si, como a hipóxia-isquemia perinatal, em que há obstrução do fluxo sanguíneo para alguma região do corpo do feto ou do recém-nascido (VANNUCCI, 2000), e a asfixia perinatal (BOOG, 2010; HERRERA-MARSCHITZ et al., 2014; PIN; ELDRIDGE; GALEA, 2009; SHEVELL, 2004).

Estudos e pesquisas específicos sobre a hipóxia-isquemia e a asfixia perinatal são abundantes na literatura (BOOG, 2010; HERRERA-MARSCHITZ et al., 2014; PIN; ELDRIDGE; GALEA, 2009; PUYAL; GINET; CLARKE, 2013; SHEVELL, 2004; TAYLOR; EDWARDS; MEHMET, 1999; VANNUCCI, 2000), mas situações de anóxia neonatal não decorrentes de hipofluxo sanguíneo nem oriundas da interrupção de oxigênio materno também são clinicamente relevantes para a saúde pública, pois bebês prematuros, especialmente os de baixo peso, possuem alta susceptibilidade a complicações perinatais e neonatais, sendo que a imaturidade pulmonar aumenta o risco de anóxia ao nascimento (SUGUIHARA et al., 2005).

Apesar das diferenças entre os episódios de anóxia perinatal, eles apresentam em comum a **falta de oxigênio** e a frequente ocorrência de prejuízos posteriores em manifestações neurológicas, tais como paralisia cerebral (BACK;

ROSENBERG, 2014; BOOG, 2010; SHEVELL, 2004; VANNUCCI, 2000), epilepsia (MOROZOVA; BELOZOUVA, 2009; VANNUCCI, 2000), hiperatividade (MOROZOVA; BELOUSOVA, 2009), dificuldades de aprendizagem e prejuízos na memória (VANNUCCI, 2000; PIN; ELDRIDGE; ARMSTRONG-WELLS et al., 2010) e déficit de atenção (ARMSTRONG-WELLS et al., 2010). Assim a falta de oxigênio assume papel fundamental no desenvolvimento das patologias da anóxia e para entender melhor a sua atuação é necessário estudá-lo de forma isolada dos demais fatores.

Diversos estudos em modelos animais reproduzem as sequelas neurológicas induzidas pela anóxia perinatal observadas em seres humanos (DELL'ANNA et al., 1991; GALEANO et al., 2011; SIMOLA et al., 2008; TAKADA et al., 2015; WEITZDOERFER et al., 2004; WEITZDOERFER; POLLAK; LUBEC, 2004). A falta de oxigenação em neonatos leva morte celular por apoptose, autofagia, excitotoxicidade e necrose em neurônios, astrócitos e células progenitoras de oligodendrócitos (pre-OLs) na formação hipocampal e em outras estruturas corticais (BACK; ROSENBERG, 2014; DELL'ANNA et al., 1991; LOREK et al., 1994; NAKAJIMA et al., 2000; NORTHINGTON; CHAVEZ-VALDEZ; MARTIN, 2011; PUKA-SUNDEVALL et al., 2000; PUYAL; GENET; CLARKE, 2013; SCHMIDT-KASTNER; FREUND, 1991; TAKADA et al., 2015; TAYLOR; EDWARDS; MEHMET, 1999; VOLPE, 1998), bem como distúrbios na sinaptogênese da formação hipocampal (OTELLIN; KHOZHAI; SHISHKO, 2014), estrutura que está intimamente relacionada com a consolidação de diversos tipos de memória (MORRIS et al., 1982; SQUIRE, 1992).

A anóxia neonatal atinge de 0,1 a 0,3% das crianças nascidas a termo (KURINCZUK et al., 2010) e aproximadamente 60% das crianças prematuras com baixo peso ao nascer (VANNUCCI, 2000; VOLPE, 1998, 2009), sendo a prematuridade o principal fator de risco associado à anóxia neonatal (MACDONALD et al., 1980, VANNUCCI, 2000; VOLPE, 1998). Dentre os indivíduos que apresentam encefalopatia hipóxico-isquêmica, 20 a 50% morrem no período neonatal e 25% dos sobreviventes exibem algum problema neurológico permanente (WILSON-COSTELLO et al., 2005). No Estado de São Paulo, durante o triênio de 2001 a 2003, dos 14.597 óbitos precoces, 3.247 (22%) foram associados à anóxia neonatal, sendo que 2873 também foram considerados evitáveis (DARIPA et al., 2013).

Pesquisas epidemiológicas levantaram outros fatores de risco para o nascimento com anóxia neonatal (CUNHA et al., 2004; MAJEED et al., 2007) e para a prematuridade (RAMOS; CUMAN, 2009) que, como fora citado (MACDONALD et al., 1980; VANNUCCI, 2000; VOLPE, 1998), está fortemente correlacionada com a incidência de anóxia. Entre os fatores de risco podemos destacar: baixa condição socioeconômica da mãe e o seu baixo nível de escolaridade, a falta de cuidado antenatal, dieta insuficiente ou inadequada, fumo, alcoolismo, ocorrência de infecções e toxemia e sangramento vaginal durante a gestação, nascimentos múltiplos, apresentação não-cefálica do bebê, ruptura prolongada da membrana, intervalo gestacional baixo ou muito longo e com elevado número de partos prévios, principalmente se eles tiverem sido prematuros, cesarianos ou com antecedente natimorto, baixa estatura materna, antecedente de anemia materna, interrupção de gestação anterior, hemorragia anteparto e parto caseiro (CUNHA et al., 2004; MAJEED et al., 2007; RAMOS; CUMAN, 2009).

Na cidade de São Paulo, a Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (Seade), em 2001, registrou incidência de 7% de partos prematuros. Na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP), devido à grande prevalência de gestações de alto risco e também ao baixo nível socioeconômico dos pais, a incidência média de prematuridade entre os anos de 1993 e 2002 foi de 22% (RADES; BITTAR; ZUGAIB, 2004). Outros serviços públicos terciários da mesma região apresentaram taxas semelhantes de prematuridade (SOUZA et al., 1995).

Por conta da alta frequência de anóxia neonatal e da gravidade das suas consequências no sistema nervoso central, há diversas linhas de pesquisas que buscam minimizar ou solucionar estes problemas, como tratamento com drogas antiepilépticas, eritropoietina, melatonina e xênon, (LOBO; YANG; RIZVI, 2013) células-tronco (CASTILLO-MELENDEZ et al., 2013; TITOMANLIO et al., 2011), hipotermia (GULCZYŃSKA; GADZINOWSKI, 2012; JACOBS et al., 2013; LOBO; YANG; RIZVI, 2013) e exercício físico (CHEN; JIANG, 2010; CHOI et al., 2013; PARK, C., et al., 2013; TSUJI et al., 2010). Estas pesquisas propõem tratamentos aplicados em organismos que sofreram anóxia neonatal. Neste projeto avaliamos a possibilidade de um tratamento aplicado *antes* de os organismos sofrerem anóxia

perinatal. O tratamento escolhido foi o exercício materno espontâneo pelas razões apresentadas a seguir.

1.2 Exercício materno espontâneo

A atividade física pode ser benéfica para o sistema nervoso central de muitas formas (PLOUGHMAN, 2008). No comportamento, ela protege contra o declínio cognitivo, principalmente em relação ao planejamento executivo e à memória operacional (BARNES et al., 2003; KRAMER et al., 1999), e melhora a atenção e o desempenho de humanos e outros primatas em testes cognitivos (HILLMAN; SNOOK; JEROME, 2003; KAMIJO et al., 2007).

A nível tecidual e celular, a atividade física aumenta a saturação de oxigênio (KRAMER et al., 1999) e a angiogênese (KLEIM; COOPER; VANDENBERG, 2002) nas regiões encefálicas importantes para o bom desempenho das habilidades cognitivas, aumenta a síntese e a liberação de neurotransmissores como a serotonina e a norepinefrina, facilitando o processamento de informações (MCMORRIS et al., 2008; WINTER et al., 2007), e, ainda, regula neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que são importantes para a sobrevivência neuronal, para o desenvolvimento do sistema nervoso e para a neuroplasticidade (SCHINDER; POO, 2000). A administração de BDNF nas células da formação hipocampal de ratos melhora a sinalização e a responsividade sinápticas, aumenta o número de sinapses e amplia a ramificação axonal intracortical (JI et al., 2005; VICARIO-ABEJON et al., 1998). O exercício físico tem sido reportado, ainda, como estimulante de biogênese de mitocôndrias e como produtor de fatores antioxidantes (MARQUES-ALEIXO et al., 2012).

Por contrapor os efeitos deletérios da privação de oxigênio, o exercício físico é estudado como tratamento contra as sequelas da anóxia neonatal no sistema nervoso (CHEN; JIANG, 2010; CHOI et al., 2013; PARK, C., et al., 2013; TSUJI et al., 2010). O exercício físico realizado por gestantes e fêmeas prenhas também gera efeitos para o feto ou filhote dentro da mãe, além da própria. O impacto do exercício depende da intensidade, da duração e do grau de estresse, como mostrado a seguir.

De acordo com Ezmerli (2000), em mulheres grávidas saudáveis, sem complicações clínicas ou obstétricas, os benefícios do exercício materno moderado

(como o controle do excessivo ganho de peso, o aumento do senso de controle e da energia, a melhora do sono e da postura, a diminuição das dores nas costas e a promoção do tônus, da força e da resistência musculares) superam os seus riscos (como hipertensão induzida, ruptura das membranas fetais, sangramento persistente no segundo ou no terceiro trimestre, incompetência cervical e retardo do crescimento intrauterino), desde que durante a realização da atividade sejam seguidas as diretrizes da *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG). Estas diretrizes prescrevem prática regular de exercícios ao invés de atividades intermitentes, sem, contudo, chegar à exaustão, e dão preferência a atividades que diminuam o suporte do próprio peso, como natação e ciclismo, aliados à dieta adequada e hidratação constante.

O exercício físico aeróbico moderado também pode beneficiar a mãe por manter e aprimorar sua capacidade aeróbica (UZENDOSKI et al., 1990), o que reduz os desconfortos associados à gravidez (HEFFERNAN, 2000), diminui o risco de parto cesariano em mulheres nulíparas (BUNGUM et al., 2000) e aumenta a frequência e a amplitude dos movimentos respiratórios do feto (MARSÁL; LÖFGREN; GENNSER, 1979).

Quanto ao peso dos descendentes a literatura apresenta resultados que dependem da intensidade e frequência dos exercícios: pode haver redução (BELL; PALMA; LUMLEY, 1995; DWARKANATH et al., 2007; HOPKINS et al., 2010), não alteração (STERNFELD et al., 1995) ou aumento (CLAPP et al., 2000; HATCH et al., 1993) do peso.

Em relação à intensidade e ao estresse, atividades espontâneas ou voluntárias em ratas prenhas não prejudicam a prole (LOKEY et al., 1991) e ainda aumentam o número de neurônios e a angiogênese no encéfalo dos filhotes (AKHAVAN et al., 2012). Mesmo exercícios maternos forçados em esteira motorizada, quando moderados, melhoram a memória espacial, a memória de curta duração, a capacidade cognitiva, aumentam a sobrevivência neuronal na formação hipocampal de filhotes de ratas prenhas (DAYI et al., 2012; KIM et al., 2007; PARK, C., et al., 2013; PARPIANSIL et al., 2003; SHIN et al., 2013), a atividade enzimática e a biogênese mitocondriais na formação hipocampal (PARK, J., et al., 2013). O nado materno durante a gestação também aumenta a memória de curta duração nos

filhotes de ratos (LEE et al., 2006) e as defesas antioxidantes, além de induzir a produção de mitocôndrias em suas formações hipocampais (MARCELINO et al., 2013). O uso de variados tipos de exercício induzem efeitos diferentes nas adaptações neuronais e no desempenho da memória (LIN et al., 2011), além de aumentarem os níveis de RNAm do BDNF no hipocampo da prole de ratas exercitadas durante a gestação (PARPIANSIL et al., 2003), constatando-se, assim, os efeitos benéficos do exercício materno, que, ao contrário do exercício físico realizado no próprio indivíduo, atua em um período crucial do desenvolvimento.

1.3 Desenvolvimento neural da formação hipocampal

A fase de desenvolvimento é o período de maior sensibilidade do sistema nervoso a fatores externos (RICE; BARONE, 2000). Uma parte considerável dos processos de desenvolvimento neural (neurogênese, sinaptogênese, apoptose, gliogênese e mielinização) ocorre no período pós-natal nos roedores, enquanto que nos primatas acontece no período pré-natal (RICE; BARONE, 2000).

Na formação hipocampal é possível estabelecer um paralelo temporal entre a neurogênese do rato e do ser humano (Fig. 1). No rato a escala é dada em dias e, no humano, em semanas. Além disso, o nascimento do rato ocorre antes que o do humano nessa comparação. A proliferação celular nas regiões CA1, CA2 e CA3 da formação hipocampal começa a ocorrer entre a 6^a e a 7^a semana de gestação (SG) em humanos e a partir do 15^o dia de gestação (DG) em ratos, finalizando na 15^a SG no primeiro e no 19^o DG no segundo. No giro dentado, outra região da formação hipocampal, a proliferação tem início entre a 10^a e a 12^a SG em humanos e a partir do 19^o DG em ratos e continua até a vida adulta (RICE; BARONE, 2000).

A densidade de sinapses hipocampais em ratos é baixa do nascimento até o 4^o dia de vida pós-natal (P4), mas começa a aumentar firmemente entre P5 e P14 a uma taxa submáxima e alcança a maior taxa de crescimento entre P15 e P28, período em que atinge a estabilidade (LOHMANN; KESSELS, 2013).

Figura 1 – Períodos estimados de proliferação celular.

Humanos (semanas)	Ratos (dias)	Regiões CA1-CA3	Giro dentado
3,5-4,0	DG 11		
4,1-5,2	DG 12		
5,3-5,7	DG 13		
5,8-6,6	DG 14		
6,7-7,0	DG 15	■	
7,1-7,4	DG 16		
7,5-7,9	DG 17		
8,0-9,9	DG 18		
10,0-11,9	DG 19		■
12,0-14,9	DG 20		
15,0-18,9	DG 21-22		
19,0-23,9	P0-3		
24,0-27,9	P4-7		
28,0-31,9	P6-11		
32,0-35,9	P12-15		
36,0-40,0	P16-19		

DG = dia de gestação; P = dia de vida pós-natal. Fonte: adaptado de Rice e Barone (2000).

A ontogenia dos reflexos e o crescimento somático também são afetados durante o período perinatal e tanto a privação de oxigênio quanto o exercício materno promovem alterações em diversos tipos de respostas sensoriomotoras e características físicas ao longo do período de desenvolvimento pós-natal do animal (DOBBING, SMART; 1974; FOX; 1965; HORVATH et al., 2015).

Considerando que a anóxia perinatal afeta principalmente recém-nascidos pré-termos (MACDONALD et al., 1980, VANNUCCI, 2000; VOLPE, 1998), neste projeto foram estudados os impactos da anóxia neonatal na quantidade relativa de neurônios e sinapses hipocâmpais em animais com idade equivalente ao de um prematuro humano extremo nascido com 23 semanas de gestação, em termos de maturidade neural. Em ratos, isso corresponde aproximadamente ao 1º ou 2º dia de vida pós-natal (P1-2) (RICE; BARONE, 2000) (Fig. 1). Também avaliamos o desenvolvimento dos reflexos após a anóxia neonatal, bem como a memória na idade adulta.

Como foi demonstrado por Akhavan et al. (2012), o exercício materno voluntário realizado durante toda a gestação provê proteção contra hipóxia crônica na prole. Neste projeto, o exercício materno espontâneo foi realizado antes do início da proliferação celular hipocampal (do 5º ao 15º dia de gestação nos ratos) (Fig. 1) para avaliar se há efeito antecipado.

1.4 Justificativa

Na literatura existem muitas formas de simular a anóxia neonatal em animais. A injúria pode ocorrer em períodos antenatais ou pós-natais, com oclusão ou não da artéria carótida e ocorrer de forma aguda ou crônica (DELL'ANNA et al., 1991; SCHMIDT-KASTNER; FREUND, 1991; VANNUCCI, 2000). Todos os modelos assumem algum grau de correspondência com casos clínicos, apesar da heterogeneidade de suas causas e efeitos e da variabilidade nos parâmetros envolvidos. O modelo de anóxia neonatal desenvolvido no Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e validado por Takada et al. (2011).é apropriado para promover a privação aguda de oxigênio em um organismo *sem a interferência de outros fatores* geralmente presentes nos casos de anóxia perinatal, como a falta de glicose, íons e neurotrofinas nos tecidos com hipofluxo sanguíneo. O modelo promove alterações celulares, histológicas, morfológicas, fisiológicas e comportamentais importantes nos organismos lesados (ALLEMANDI, 2011; HAMASAKI, 2013; ITO, 2010; TAKADA et al., 2011, 2015; VASCONCELOS, 2013). Pesquisas que seguem esse modelo ainda são raras, mas os seus resultados podem servir para explicar a ação da falta de oxigênio em outros modelos.

O exercício materno espontâneo ou voluntário protege o sistema nervoso da prole dos efeitos da anóxia neonatal e não ativa o sistema de estresse nas mães (YANAGITA et al., 2007), característica importante para um estímulo considerado benéfico para o sistema nervoso central. Até o momento, apenas Akhavan et al. (2012) estudou os efeitos do exercício materno *voluntário* sobre as consequências de algum tipo de privação de oxigênio na prole, que no caso é a hipóxia crônica. Entretanto, há diferenças entre a hipóxia crônica e a anóxia aguda no modelo usado

neste estudo, demonstrado por Takada et al. (2011), as quais devem ser exploradas com diferentes metodologias.

Outra diferença metodológica deste estudo com a de Akhavan et al. (2012) é o período de gestação em que o exercício materno é realizado. Enquanto Akhavan et al. (2012) segue um protocolo de exercício durante todo o período de gestação (do 1º ao 21º DG), neste estudo optou-se por submeter as ratas prenhas em regime de atividade antes da proliferação celular na formação hipocampal dos fetos (do 5º ao 15º DG), para avaliar se o efeito do exercício materno continua influenciando na quantidade de neurônios mesmo após o término do seu regime.

Além disso, a anóxia perinatal e o exercício físico também atuam sobre a ontogênese dos reflexos e a maturação de características físicas (DOBBING, SMART, 1974; FOX, 1965; HORVATH et al., 2015) motivo pelos quais tais aspectos também foram abordados.

Com isso buscamos contribuir para a criação de tratamentos preventivos ou terapêuticos que atenuem os efeitos da privação neonatal de oxigênio. Como mostrado pelas referências epidemiológicas, muitas gestantes pertencem ao grupo de risco de anóxia neonatal e podem beneficiar os seus filhos e a si mesmas com algum tipo de prevenção.

1.5 Objetivo

O objetivo foi verificar se, em ratos, o exercício materno espontâneo é capaz de atenuar os efeitos prejudiciais da anóxia neonatal em relação aos seguintes parâmetros:

- a) crescimento somático**, entre P2 e P21. O crescimento somático foi avaliado por meio da medida do eixo látero-lateral da cabeça (ELLC), do eixo ântero-posterior da cabeça (EAPC), do eixo longitudinal do corpo (EL) e do peso corporal (PC) em cada dia;
- b) maturação de características físicas**, entre P2 e P21. A maturação foi avaliada observando-se o dia do desdobramento do pavilhão auricular (DPA),

da abertura do conduto auditivo (ACA), da irrupção dos incisivos superiores (IIS), da irrupção dos incisivos inferiores (IIL) e da abertura ocular (AO);

- c) ontogênese de reflexos**, entre P2 e P21. A ontogênese foi avaliada observando-se o dia do aparecimento da recuperação do decúbito (RC) da colocação pelas vibrissas (CV), da aversão ao precipício (AP), da geotaxia negativa (GN), da resposta ao susto (RS), da aceleração (A) e da preensão palmar (PP);
- d) memória espacial operacional, memória de curta duração, memória de longa duração e flexibilidade comportamental**, a partir de P60. Estes parâmetros foram avaliados por meio do desempenho no Labirinto Aquático de Morris em relação ao tempo (latência) levado para concluir as tentativas, ao comprimento do trajeto em cada tentativa e à velocidade média de nado;
- e) estimativa da densidade sináptica** em toda a formação hipocampal (exceto subículo) dos animais em P21 e P75 por meio de Western Blot com anticorpo contra sinapsina I;
- f) estimativa da densidade de neurônios maduros** nas camadas de células piramidais das regiões CA1 e CA2-3 e na camada granular do giro dentado do hipocampo em P21 e P75, por meio de imunohistoquímica com anticorpo contra NeuN e contagem por estereologia.

5 CONCLUSÕES

Neste projeto identificamos diferentes atuações do exercício materno espontâneo e da anóxia neonatal em diferentes aspectos do desenvolvimento somático, sensoriomotor e nervoso. Apesar disso, de uma forma geral, a anóxia neonatal foi prejudicial e o exercício materno foi benéfico para os indivíduos e conseguiu reverter muitos dos problemas decorrentes da anóxia:

- A anóxia neonatal atrasou o aparecimento da abertura do conduto auditivo (ACA), da abertura ocular (AO), da resposta ao decúbito (RD), da aversão ao precipício (AP), da geotaxia negativa (GN) e da preensão palmar (PP) e o exercício materno espontâneo foi capaz de reverter o atraso.
- A anóxia neonatal diminuiu a densidade neuronal e a expressão relativa de sinapsina I no GD de animais P21. O exercício materno espontâneo foi capaz de atenuar tais diminuições.
- Os efeitos da anóxia neonatal e do exercício materno espontâneo não perduraram na vida adulta em relação à densidade de neurônios e expressão relativa de sinapsina I no giro dentado. No Labirinto aquático de Morris não houve efeito do exercício materno espontâneo nem da anóxia neonatal na latência e no percurso, indicando possível recuperação dos animais.

Portanto, o exercício materno espontâneo tem o potencial de ser utilizado antecipadamente como fator atenuador da anóxia neonatal.

REFERÊNCIAS¹

Akhavan MM, Foroutan T, Safari M, Sadighi-Moghaddam B, Emami-Abarghoie M, Rashidy-Pour A. Prenatal exposure to maternal voluntary exercise during pregnancy provides protection against mild chronic postnatal hypoxia in rat offspring. *Pak J Pharm Sci.* 2012;25(1):233-8.

Allemandi W. Estudo da imunorreatividade da proteína S100 β no hipocampo e núcleo do trato solitário de ratos neonatos submetidos à anóxia. [tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav.* 1975;23(4):896-920.

Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg.* 1953;32(4):260-7.

Armstrong-Wells J, Bernard TJ, Boada R, Manco-Johnson M. Neurocognitive outcomes following neonatal encephalopathy. *Neuro Rehabilitation.* 2010;26(1):27-33.

Bâ A. Paradoxical effects of alcohol and thiamine deficiency on the eye opening in rat pups. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(11):2435-40.

Back SA, Rosenberg PA. Pathophysiology of glia in perinatal white matter injury. *Glia.* 2014;62(11):1790-815.

Barnes DE, Yaffe K, Satariano WA, Tager IB. A longitudinal study of cardiorespiratory fitness and cognitive function in healthy older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2003;51:459–65.

Bell RJ, Palma SM, Lumley JM. The effect of vigorous exercise during pregnancy on birth-weight. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1995;35(1):46-51.

Boog G. Cerebral palsy and perinatal asphyxia (I- Diagnosis). *Gynecol Obstet Fertil.* 2010;38(4):261-77.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bungum TJ, Peaslee DL, Jackson AW, Perez MA. Exercise during pregnancy and type of delivery in nulliparae. *J ObstetGynecol Neonatal Nurs*. 2000;29(3):258-64.

Caputa M, Rogalska J, Wentowska K, Nowakowska A. Perinatal asphyxia, hyperthermia and hyperferremia as factors inducing behavioural disturbances in adulthood: a rat model. *Behav Brain Res*. 2005;63(2):246-56.

Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, Miller SL. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Front Neurosci*. 2013;7:194.

Chen XL, Jiang L. [Physical training improves spatial learning and memory impairments following hypoxic ischemic brain damage in neonatal rats]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2010;12(5):363-7. Chinese.

Choi JH, Kim TS, Park JK, Sim YJ, Kim K, Lee SJ. Short-term treadmill exercise preserves sensory-motor function through inhibiting apoptosis in the hippocampus of hypoxic ischemia injury rat pups. *J Exerc Rehabil*. 2013;9(5):457-62.

Clapp JF 3rd. The effects of maternal exercise on fetal oxygenation and fetoplacental growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;110 Suppl 1:S80-5.

Clapp JF 3rd, Kim H, Burciu B, Lopez B. Beginning regular exercise in early pregnancy: effect on fetoplacental growth. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(6):1484-8.

Clerici G1, Luzietti R, Di Renzo GC. Monitoring of antepartum and intrapartum fetal hypoxemia: pathophysiological basis and available techniques. *Biol Neonate*. 2001;79(3-4):246-53.

Coq JO, Strata F, Russier M, Safadi FF, Merzenich MM, Byl NN, Barbe MF. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. *ExpNeurol*. 2008;210(1):95-108.

Crawford JS, Davies P, Pearson JF. Significance of the individual components of the Apgar score. *Br J Anaesth*. 1973;45(2):148-58.

Cunha AA, Fernandes DS, Melo PF, Guedes MH. Fatores Associados à Asfixia Perinatal. *RBGO*. 2004;26(10):799-805.

Daripa M, Caldas HMG, Flores LPO, Waldvogel BC, Guinsburg R, Almeida MFB. Perinatal asphyxia associated with early neonatal mortality: populational study of avoidable deaths. *Rev Paul Pediatr*. 2013;31(1):37-45.

Dayi A, Agilkaya S, Ozbal S, Cetin F, Aksu I, Gencoglu C, Cingoz S, Pekcetin C, Tugyan K, Kayatekin BM, Uysal N. Maternal aerobic exercise during pregnancy can increase spatial learning by affecting leptin expression on offspring's early and late period in life depending on gender. *Scientific World Journal*. 2012;2012:429-803.

Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Cabral-Filho JE, Souza SL, Freitas-Silva SR, Ferreira LM, Guedes RC, Câmara CR, Barros KM. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(10):1503-9.

Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Cabral-Filho JE, Barreto-Medeiros JM, Souza SL, Marinho SM, Castro FM, Toscano AE, Jesus-Deiró RA, Barros KM. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol Behav.* 2006;87(2):338-44.

Dell'Anna ME, Calzolari S, Molinari M, Iuvone L, Calimici R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav Brain Res.* 1991;45(2):125-34.

Dobbing J, Smart JL. Vulnerability of developing brain and behaviour. *Br Med Bull.* 1974;30(2):164-8.

Drew LJ, Fusi S, Hen R. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? *Learn Mem.* 2013;20(12):710-29.

Dwarkanath P, Muthayya S, Vaz M, Thomas T, Mhaskar A, Mhaskar R, Thomas A, Bhat S, Kurpad A. The relationship between maternal physical activity during pregnancy and birth weight. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16(4):704-10.

Ernfors P, Van De Water T, Loring J, Jaenisch R. Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron.* 1995;14(6):1153-64.

Ezmerli NM. Exercise in pregnancy. *Prim Care Update Ob Gyns.* 2000;7(6): 260-5.

Ferrari DC, Nesic O, Perez-Polo JR. Perspectives on neonatal hypoxia/ischemia-induced edema formation. *Neurochem Res.* 2010;35(12):1957-65.

Finster M, Wood M. The Apgar score has survived the test of time. *Anesthesiology.* 2005;102(4):855-7.

Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav.* 1965;13(2):234-41.

Francisco RPV, Yamamoto RM, Miyadahira S, Cunha CL, Zugaib M. Correlação entre testes para avaliação da vitalidade fetal, pH da artéria umbilical e os resultados neonatais em gestações de alto risco. *Ver Bras Ginecol Obstetr.* 2000;22(8):503-10.

Frank T, Kühl M, Makowski B, Bitsch R, Jahreis G, Hübscher J. Does a 100-km walking affect indicators of vitamin status? *Int J Vitam Nutr Res.* 2000;70(5):238-50.

Fritzsich B, Silos-Santiago I, Bianchi LM, Fariñas I. The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *Trends Neurosci.* 1997;20(4):159-64.

Funayama CAR. Anóxia neonatal e sequelas neurológicas. Campinas: Átomo; 2005.

Galeano P, Blanco Calvo E, Madureira de Oliveira D, Cuenya L, Kamenetzky GV, Mustaca AE, Barreto GE, Giraldez-Alvarez LD, Milei J, Capani F. Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(6):609-19.

Gomez-Pinilla F, Ying Z, Agoncillo T, Frostig R. The influence of naturalistic experience on plasticity markers in somatosensory cortex and hippocampus: effects of whisker use. *Brain Res.* 2011;1388:39-47.

Gulczyńska E, Gadzinowski J. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ginekol Pol.* 2012;83(3):214-8.

Hamasaki MY. Avaliação temporal e expressão gênica e proteica de S100 β no encéfalo de ratos neonatos submetidos à anóxia. [tese (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Hatch MC, Shu XO, McLean DE, Levin B, Begg M, Reuss L, Susser M. Maternal exercise during pregnancy, physical fitness, and fetal growth. *Am J Epidemiol.* 1993;137(10):1105-14.

Heffernan AE. Exercise and pregnancy in primary care. *Nurse Pract.* 2000;25(3):42, 49, 53-6 passim.

Herrera-Marschitz M, Neira-Pena T, Rojas-Mancilla E, Espina-Marchant P, Esmar D, Perez R, Muñoz V, Gutierrez-Hernandez M, Rivera B, Simola N, Bustamante D, Morales P, Gebicke-Haerter PJ. Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset. *Front Neurosci.* 2014;8:47.

Hillman CH, Snook EM, Jerome GJ. Acute cardiovascular exercise and executive control function. *Int J Psychophysiol.* 2003;48:307–14.

Hopkins SA, Baldi JC, Cutfield WS, McCowan L, Hofman PL. Exercise training in pregnancy reduces offspring size without changes in maternal insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2080-8.

Horvath G, Reglődi D, Farkas J, Vadasz G, Mammel B, Kvarik T, Bodzai G, Kiss-Illes B, Farkas D, Matkovits A, Manavalan S, Gaszner B, Tamas A, Kiss P. Perinatal positive and negative influences on the early neurobehavioral reflex and motor development. *Adv Neurobiol.* 2015;10:149-67.

Hunsaker MR, Kesner RP. The operation of pattern separation and pattern completion processes associated with different attributes or domains of memory. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(1):36-58.

Ito PH. Avaliação comportamental de ratos submetidos à anóxia neonatal. [tese (Mestrado em Neurociências e Comportamento)]. São Paulo: Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo; 2010.

Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013.

Jeneson A, Squire LR. Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. *Learn Mem.* 2011;19(1):15-25.

Ji Y, Pang PT, Feng L, Lu B. Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat Neurosci.* 2005;8(2):164-72.

Kamijo K, Nishihira Y, Higashiura T, Kuroiwa K. The interactive effect of exercise intensity and task difficulty on human cognitive processing. *Int J Psychophysiol.* 2007;65:114–21.

Kayser B, Verges S. Hypoxia, energy balance and obesity: from pathophysiological mechanisms to new treatment strategies. *Obes Rev.* 2013;14(7):579-92.

Kesner RP. A behavioral analysis of dentate gyrus function. *Prog Brain Res.* 2007;163:567-76.

Kim H, Lee SH, Kim SS, Yoo JH, Kim CJ. The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. *Int J Dev Neurosci.* 2007;25(4):243-9.

Kleim JA, Cooper NR, VandenBerg PM. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res.* 2002;934(1):1-6.

Koyama S, Kaga K, Sakata H, Iino Y, Kodera K. Pathological findings in the temporal bone of newborn infants with neonatal asphyxia. *Acta Otolaryngol.* 2005;125(10):1028-32.

Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature.* 1999;400:418–9.

Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev.* 2010;86(6):329-38.

Lee HH, Kim H, Lee JW, Kim YS, Yang HY, Chang HK, Lee TH, Shin MC, Lee MH, Shin MS, Park S, Baek S, Kim CJ. Maternal swimming during pregnancy enhances

short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain Dev.* 2006;28(3):147-54.

Lin TW, Chen SJ, Huang TY, Chang CY, Chuang JI, Wu FS, Kuo YM, Jen CJ. Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. *Neurobiol Learn Mem.* 2012;97(1):140-7.

Lobo N, Yang B, Rizvi M, Ma D. Hypothermia and xenon: novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy? *J Neurosci Res.* 2013;91(4):473-8.

Lohmann C, Kessels HW. The developmental stages of synaptic plasticity. *J Physiol.* 2014;592(Pt 1):13-31.

Lokey EA, Tran ZV, Wells CL, Myers BC, Tran AC. Effects of physical exercise on pregnancy outcomes: a meta-analytic review. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23(11):1234-9.

Lorek A, Takei Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, Peebles D, Wylezinska M, Owen-Reece H, Kirkbride V. Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res.* 1994;36(6):699-706.

MacDonald HM, Mulligan JG, Allen AC, Taylor PM. Neonatal asphyxia. I. Relationship to obstetrical and neonatal complications to neonatal mortality in 38,405 consecutive deliveries. *J Pediatr.* 1980;96:898-902.

Majeed R, Memon Y, Majeed F, Shaikh NP, Rajar UD. Risk factors of birth asphyxia. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2007;19(3):67-71.

Mao J, Yu JL, Fu XM, Wang TH. [Changes on the expression of aquaporin-4 is associated with edema of brain in neonatal rats subjected to hypoxic Ischemic brain damage]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2014;45(3):386-9, 409. [Chinese].

Marcelino TB, Longoni A, Kudo KY, Stone V, Rech A, de Assis AM, Scherer EB, da Cunha MJ, Wyse AT, Pettenuzzo LF, Leipnitz G, Matté C. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience.* 2013;246:28-39.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phase of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62(4A):609-14.

Marques-Aleixo I, Oliveira PJ, Moreira PI, Magalhães J, Ascensão A. Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. *Prog Neurobiol.* 2012;99(2):149-62.

Marsál K, Löfgren O, Gennser G. Fetal breathing movements and maternal exercise. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1979;58(2):197-201.

McMorris T, Collard K, Corbett J, Dicks M, Swain JP. A test of the catecholamines hypothesis for an acute exercise-cognition interaction. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;89(1):106-15.

Moretto MB, de Mattos-Dutra A, Arteni N, Meirelles R, de Freitas MS, Netto CA, Pessoa-Pureur R. Effects of neonatal cerebral hypoxia-ischemia on the in vitro phosphorylation of synapsin 1 in rat synaptosomes. *Neurochem Res.* 1999;24(10):1263-9.

Morozova EA, Belousova MB. Attention deficit hyperactivity syndrome: evolution, clinical presentations, treatment. *Zh Nevrol Psikhiatrlm S S Korsakova.* 2009;109(2):31-4.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.* 1982;297(5868):681-33.

Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci.* 2000;20(21):7994-8004.

Nomura RMY, Francisco RPV, Miyadahira S, Zugaib M. Cardiotocografia em gestações com diástole zero ou reversa nas artérias umbilicais: análise dos resultados perinatais. *Ver Assoc Med Bras.* 2003;49(1):79-85.

Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2011;69(5):743-58.

O'Reilly RC, McClelland JL. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus.* 1994;4(6):661-82.

Otellin VA, Khozhai LI, Shishko TT. [Reactions of the interneuronal synapses of rat brain to hypoxia during the early postnatal period]. *Morfologiya.* 2014;145(1):7-12. [Russian].

Park CY, Lee SH, Kim BK, Shin MS, Kim CJ, Kim H. Treadmill exercise ameliorates impairment of spatial learning ability through enhancing dopamine expression in hypoxic ischemia brain injury in neonatal rats. *J Exerc Rehabil.* 2013;9(4):406-12.

Park JW, Kim MH, Eo SJ, Lee EH, Kang JS, Chang HK, Leem YH. Maternal exercise during pregnancy affects mitochondrial enzymatic activity and biogenesis in offspring brain. *Int J Neurosci.* 2013;123(4):253-64.

Parnpiansil P, Jutapakdeegul N, Chentanez T, Kotchabhakdi N. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. *Neurosci Lett.* 2003;352(1):45-8.

Paxinos G, Watson C. The rat brain: in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998. Paginação irregular.

Paxinos G. The rat nervous system. 3rd ed. San Diego, USA: Elsevier; 2004. 1320 p.

Pereira DN, Procianoy RS. Effect of perinatal asphyxia on thyroid-stimulating hormone and thyroid hormone levels. *Acta Paediatr.* 2003;92(3):339-45.

Pin TW, Eldridge B, Galea MP. A review of developmental outcomes of term infants with post-asphyxia neonatal encephalopathy. *Eur J Paediatr Neurol.* 2009;13(3):224-34.

Ploughman M. Exercise is brain food: the effects of physical activity on cognitive function. *Dev Neurorehabil.* 2008;11(3):236-40.

Polley DB, Kvasnák E, Frostig RD. Naturalistic experience transforms sensory maps in the adult cortex of caged animals. *Nature.* 2004;429(6987):67-71.

Puka-Sundvall M, Wallin C, Gilland E, Hallin U, Wang X, Sandberg M, Karlsson J, Blomgren K, Hagberg H. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Dev. Brain Res.* 2000;125:43-50.

Puyal J, Ginet V, Clarke PG. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2013;105:24-48.

Rades, E, Bittar RE, Zugaib M. Determinantes diretos do parto prematuro eletivo e os resultados neonatais. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26(8):655-62.

Raff H, Bruder ED, Jankowski BM, Colman RJ. Effect of neonatal hypoxia on leptin, insulin, growth hormone and body composition in the rat. *Horm Metab Res.* 2001;33(3):151-5.

Ramos HAC, Cuman RKN. Risk factors for prematurity: document search. *Esc Anna Nery Rev Enferm.* 2009;13(2):297-304.

Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 2000;108 Suppl 3:511-33.

Rogalska J, Danielisova V, Caputa M. Effect of neonatal body temperature on postanoxic, potentially neurotoxic iron accumulation in the rat brain. *NeurosciLett.* 2006;393(2-3):249-54.

Rosa BV, Blair HT, Vickers MH, Dittmer KE, Morel PC, Knight CG, Firth EC. Moderate exercise during pregnancy in Wistar rats alters bone and body composition of the adult offspring in a sex-dependent manner. *PLoS One.* 2013;8(12):e82378.

Schinder AF, Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2000;23(12):639-45.

Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res.* 2012;226(1):56-65.

Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience.* 1991;40(3):599-636.

Schmutzhard J, Glueckert R, Sergi C, Schwentner I, Abraham I, Schrott-Fischer A. Does perinatal asphyxia induce apoptosis in the inner ear? *Hear Res.* 2009;250(1-2):1-9.

Shevell MI. The "Bermuda triangle" of neonatal neurology: cerebral palsy, neonatal encephalopathy, and intrapartum asphyxia. *Semin Pediatr Neurol.* 2004;11(1):24-30.

Shin MS, Ko IG, Kim SE, Kim BK, Kim TS, Lee SH, Hwang DS, Kim CJ, Park JK, Lim BV. Treadmill exercise ameliorates symptoms of methimazole-induced hypothyroidism through enhancing neurogenesis and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(3):214-23.

Simola N, Bustamante D, Pinna A, Pontis S, Morales P, Morelli M, Herrera-Marschitz M. Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Exp Brain Res.* 2008;185(4):595-601.

Souza E, Santos JFK, Bancher MM, Bertini AM, Camano L. Considerações sobre a prematuridade eletiva na Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 1995;17:583-9.

Squire LR. Memory and the Hippocampus: A Synthesis From Findings With Rats, Monkeys, and Humans. *Psychological Review.* 1992;99(2):195-231.

Sternfeld B, Quesenberry CP Jr, Eskenazi B, Newman LA. Exercise during pregnancy and pregnancy outcome. *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27(5):634-40.

Suguihara C, Lessa AC. [Strategies to minimize lung injury in extremely low birth weight infants]. *J Pediatr (Rio J).* 2005;81(1 Suppl):S69-78. [Portuguese].

Sykes GS, Molloy PM, Johnson P, Gu W, Ashworth F, Stirrat GM, Turnbull AC. Do Apgar scores indicate asphyxia? *Lancet.* 1982;1(8270):494-6.

Takada SH, Sampaio CA, Allemandi W, Ito PH, Takase LF, Nogueira MI. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fosimmunoreactivity. *J Neurosci Methods.* 2011;198(1):62-9.

Takada SH, Dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Takase LF, Cruz-Rizzolo RJ, Kihara AH, Xavier GF, Watanabe IS, Nogueira MI.

Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience*. 2015;284:247-59.

Tang AC, Nakazawa M. Neonatal novelty exposure ameliorates anoxia-induced hyperactivity in the open field. *Behav Brain Res*. 2005;163(1):1-9.

Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol*. 1999;9(1):93-117.

Titomanlio L, Kavelaars A, Dalous J, Mani S, El Ghouzzi V, Heijnen C, Baud O, Gressens P. Stem cell therapy for neonatal brain injury: perspectives and challenges. *Ann Neurol*. 2011;70(5):698-712.

Tsuji M, Aoo N, Harada K, Sakamoto Y, Akitake Y, Irie K, Mishima K, Ikeda T, Fujiwara M. Sex differences in the benefits of rehabilitative training during adolescence following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp Neurol*. 2010;226(2):285-92.

Uzendoski AM, Latin RW, Berg KE, Moshier S. Physiological responses to aerobic exercise during pregnancy and post-partum. *J Sports Med Phys Fitness*. 1990;30(1):77-82.

Vannucci RC. Hypoxic–ischemic encephalopathy. *American Journal of Perinatology*. 2000;17(3):113-20.

Vasconcelos RG. Efeito da influência da anóxia neonatal no comportamento maternal e no desenvolvimento somático se sensorio-motor de ratos *Wistar*. [tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento)]. São Paulo: Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo; 2013.

Vicario-Abejón C, Collin C, McKay RD, Segal M. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*. 1998;18(18):7256-71.

Volpe JJ. Brain injury in the premature infant: overview of clinical aspects, neuropathology, and pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol*. 1998;5(3):135-51.

Weitzdoerfer R, Gerstl N, Pollak D, Hoeger H, Dreher W, Lubec G. Long-term influence of perinatal asphyxia on the social behavior in aging rats. *Gerontology*. 2004;50(4):200-5.

Weitzdoerfer R, Pollak A, Lubec B. Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. *SeminPerinatol*. 2004;28(4):249-56.

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec*. 1991;231(4):482-97.

Wilson-Costello D, Friedman H, Minich N, Fanaroff AA, Hack M. Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s. *Pediatrics*. 2005;115(4):997-1003.

Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87(4):597-609.

Yanagita S, Amemiya S, Suzuki S, Kita I. Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life Sci*. 2007;80(4):356-63.

Zhang YS, Du JZ. The response of growth hormone and prolactin of rats to hypoxia. *Neurosci Lett*. 2000;279(3):137-40.