

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
RUDE DE SOUZA MACIEL**

**EXPRESSÃO DA PARVALBUMINA NA FORMAÇÃO
HIPOCAMPAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM PROGRAMA
DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO FORÇADO EM
DIFERENTES IDADES**

**Mogi das Cruzes, SP
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
RUDE DE SOUZA MACIEL**

**EXPRESSÃO DA PARVALBUMINA NA FORMAÇÃO
HIPOCAMPAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM PROGRAMA
DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO FORÇADO EM
DIFERENTES IDADES**

Dissertação apresentada à Universidade
de Mogi das Cruzes, como exigência final
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Ricardo Mário Arida

**Mogi das Cruzes, SP
2007**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, a Deus primeiramente, que me dá forças para superar todos os obstáculos, e seguir sempre trilhando o caminho das conquistas. Aos meus pais, meus maiores incentivadores, pois sem eles não haveria a possibilidade da realização deste sonho.

Ao meu irmão Rodrigo (*in memmoriám*), que onde estiver estará torcendo pelo meu sucesso.

E a todos os amigos que puderam contribuir de alguma forma seja ela direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor e orientador Ricardo Mário Arida, por disponibilizar seu tempo, sua atenção e seus conhecimentos nos momentos de dúvida durante todo o decorrer deste trabalho e ao professor Fúlvio Alexandre Scorza pela colaboração e co-orientação.

Aos coordenadores do mestrado Annie France Frère Slaets e Jean Jacques Bonvent.

Aos meus colegas de laboratório Fabiano, Sérgio, Leandro, Elisa, Adriana, Aninha, Carla, Cássia, aos de república Fred e Jandyr e aos que adquiri em Mogi Fernando, Aline e Diego pela amizade durante o tempo em que estivemos juntos e pela contribuição dada ao trabalho.

As funcionárias do NPT Fabiane e Therezinha pelo carinho com que sempre me trataram.

Aos funcionários do Biotério Paulo, Douglas, em especial ao Maurício pela atenção e por disponibilizar parte do material necessário para o andamento da pesquisa.

Aos meus familiares, em especial meu pai Edemilson José Gomes Maciel e minha mãe Marina de Souza Maciel, que são à base da minha vida, meu porto seguro e minha razão de viver.

A Deus, o mais importante de todos, pois, sem ele nada em nossa vida se realiza.

Ao apoio financeiro da CAPES e FAEP.

Obrigado a todos!

O autor.

"O futuro não pode ser previsto, mas pode ser inventado. É a nossa habilidade de inventar o futuro que nos dá esperança para fazer de nós o que somos".
(Dennis Gabor)

RESUMO

O exercício físico é conhecido por contribuir para a saúde em geral. Estudos clínicos fornecem evidências de que o exercício físico reduz a ansiedade e depressão, podendo proporcionar grandes benefícios à função cognitiva e a memória, principalmente durante o envelhecimento. Vários estudos têm mostrado o efeito do exercício físico na plasticidade neuronal ao longo da vida. Porém, seus mecanismos permanecem ainda pouco esclarecidos. Baseado neste fato, o presente estudo avaliou a expressão da parvalbumina, uma proteína ligante de cálcio, que está associada a um fator neuroprotetor e de aumento de resistência a lesões excitotóxica na formação hipocampal de ratos com diferentes idades, submetidos a um programa de treinamento físico aeróbio forçado em esteira rolante por um período de 30 dias. Foram utilizados ratos Wistar, machos, divididos em 4 grupos (2, 6, 12 e 18 meses de vida). Cada idade foi subdividida em 2 grupos: A - controle (n=5) e B – treinamento físico (n= 5). Após o programa de treinamento físico os animais de todos os grupos foram perfundidos com solução paraformaldeído e seus cérebros processados através da técnica de imuno-histoquímica para análise da expressão da parvalbumina. Para análise estatística entre os grupos controle e experimental utilizamos o teste *t não pareado* e para análise das diferentes idades utilizamos o teste de análise de variância de dois fatores ANOVA. Foi observado um aumento na expressão de parvalbumina nas células e fibras das regiões de CA1, CA3 e hilo do giro denteado nos animais do grupo exercício físico forçado quando comparado com os animais do grupo controle em todas as idades, não apresentando alterações significativas quando correlacionadas as diferentes idades do mesmo grupo. Os resultados indicam que um programa de exercício físico aeróbio forçado provoca plasticidade neuronal na formação hipocampal em ratos com diferentes idades.

Palavras-chave: exercício físico, neuroplasticidade, envelhecimento, parvalbumina.

ABSTRACT

Physical exercise is known as contribute for health in general. Clinical studies have shown positive effects of the physical exercise in the reduction of anxiety and depression, and can provide great benefits to the cognitive function and memory, mainly during the aging. Several studies have showed neuronal plasticity induced by physical exercise throughout the life. However, their mechanisms are not well understood. Based on this fact, the present study evaluated the expression of the parvalbumin (PV), a calcium-binding protein, that it is associated to you factor of neural protection and of resistance increase to lesions excitotoxic in the hippocampal formation of rats in different ages submitted to a physical exercise program in a treadmill for a period of 30 days. Male Wistar rats were divided into 4 groups (2, 6, 12 and 18 months of life). Each age was subdivided in 2 groups: A- control (n=5) and B- forced physical exercise program (n = 5). After the physical training program animals of all groups were perfused with paraformaldehyde and their brains processed through immunocytochemical technique for PV expression analysis. For statistical analysis among the control and experimental groups the *unpaired t test* was used and for the analysis of the different ages we used the ANOVA test. An increase in PV expression was observed in cells and fibers of CA1, CA3 areas and in the hilus of dentate gyrus (DG) in physical exercise group when compared with the control group in all ages. However, no significant alterations were observed when different ages of the same group were analysed. Our results indicate that a forced physical exercise program can induce neuronal plasticity in the hippocampal formation of rats with different ages.

Keywords: physical exercise, neuroplasticity, aging, parvalbumin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BrdU	5-bromo-3'-deoxiuridina
CA1	Corno de Ammon região 1
CA2	Corno de Ammon região 2
CA3	Corno de Ammon região 3
CaBP	Proteínas ligantes de Cálcio
DG	Giro dentado
NGF	Nerve Growth Factor
PV	Parvalbumina
SNC	Sistema Nervoso Central
ANOVA	Análise de Variância

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema representando as regiões do hipocampo CA1-CA3 e Giro denteado (DG) e as principais projeções.....	12
Figura 2:	Fotomicrografias de células imunorreativas a PV na região CA1 e fibras na região do stratum radiatum de CA1. Animais controle 2 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 meses (D) (N=5) e exercício forçado 2 (E), 6 (F), 12 (G) e 18 meses (H). (N=5)	22
Figura 3:	Fotomicrografias de células imunorreativas a PV na região CA3 e fibras na região do stratum radiatum de CA3. Animais controle 2 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 meses (D) (N=5) e exercício forçado 2 (E), 6 (F), 12 (G) e 18 meses (H). (N=5)	23
Figura 4:	Fotomicrografias de células e fibras imunorreativas a PV na região do hilo do giro denteado. Animais controle 2 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 meses (D) (N=5) e exercício forçado 2 (E), 6 (F), 12 (G) e 18 meses (H). (N=5)	24
Figura 5:	Comparação do percentual de densidade de fibras de células PV-positivas na região do hilo do giro denteado dos grupos controle e exercício forçado com 2, 6, 12 e 18 meses de idade	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Plasticidade neuronal.....	10
1.2 Alterações plásticas decorrentes da evolução da idade	11
1.3 Alterações plásticas decorrentes do exercício físico.....	13
2 OBJETIVO	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais	18
3.2 Programa de Treinamento Físico.....	18
3.3 Preparação do tecido	19
3.4 Imunohistoquímica.....	19
3.5 Análise dos dados.....	20
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Análise qualitativa	21
4.2 Análise quantitativa.....	25
5 DISCUSSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plasticidade neuronal

A plasticidade neuronal é uma importante propriedade do cérebro, caracterizada pela ocorrência de mudanças reversíveis (plasticidade funcional) e de longo prazo (TROJAN & POKORNY, 1999). Estas mudanças podem ser desencadeadas por estímulos naturais ou artificiais, internos ou externos e resultar em alterações positivas ou negativas, sendo seus mecanismos baseados na modulação da transmissão sináptica. Dentre as mudanças importantes que podem ocorrer no Sistema Nervoso Central (SNC) estão o crescimento neuronal, mediado por família de neurotrofinas, candidatas a moduladoras da plasticidade neuronal e o processo de neurogênese.

O processo de neurogênese é conhecido como a formação de novos neurônios, estando identificadas em todas as espécies de mamíferos já examinados inclusive em humanos (GOUD *et al.*, 1997; 1998; ERIKSON *et al.*, 1998). Na grande maioria dos organismos este processo pode persistir por períodos bastante prolongados, provavelmente até a senescência (KEMPERMANN *et al.*, 1997).

A neurogênese ocorre em regiões como a zona subventricular dos ventrículos laterais (ZSV) e a zona subgranular do giro dentado (ZSG) onde se localizam células progenitoras mitoticamente ativas, sendo estas capazes de gerar novos neurônios durante a fase adulta (LOIS & ALVAREZ-BUYLLA, 1994; GOUD *et al.*, 1997; 1998; ERIKSON *et al.*, 1998). Essa nova organização neuronal apresenta 3 fases. Durante a primeira fase, futuros neurônios proliferam, na segunda eles migram para o lugar de seu destino, e somente na terceira fase, durante a diferenciação, eles assumem seu tamanho final e organizam seus circuitos de entrada e saída (TROJAN & POKORNY, 1999).

Outra mudança importante que pode ocorrer no SNC é o aumento da expressão de algumas proteínas. Para visualização destas alterações plásticas, a utilização de proteínas ligantes de cálcio (CaBP) como marcadoras neuronais, tem sido bastante difundida, devido as suas diversas propriedades e funções em todo SNC. Por exemplo, a sinalização pré-sináptica de Ca^{2+} desenvolve um papel crucial

na plasticidade da transmissão sináptica em curto prazo (MULLER *et al.*, 2007). Essas proteínas carrreadoras de cálcio são conhecidas por serem expressas por diferentes grupos de interneurônios hipocampais (XU *et al.*, 2007).

Alguns estímulos são de grande interesse por desencadearem essas mudanças importantes no SNC. O exercício físico considerado um estímulo artificial é um deles, atuando de forma positiva nos mecanismos de plasticidade neuronal ao passo que, o envelhecimento que é um processo lento, progressivo e inevitável caracterizado como estímulo natural (OLIVEIRA & FURTADO, 1999), acarreta em diminuição do número de células neuronais (RICHARD, 1991), provocando alterações negativas no SNC.

1.2 Alterações plásticas decorrentes da evolução da idade

O cérebro é uma estrutura em processo dinâmico de modificações e algumas dessas mudanças podem ser decorrentes da evolução da idade. Uma diminuição no volume e peso do cérebro (DAVIES & WRIGTH, 1977) assim como alterações na estrutura química cerebral tem sido observada. Observa-se também uma redução nos níveis de dopamina e noradrenalina em várias regiões do encéfalo (núcleos da base, hipotálamo e córtex cerebral), sobretudo no tronco encefálico. Os neurotransmissores acetilcolina e o GABA estão igualmente diminuídos decorrentes também da diminuição da atividade das enzimas que os sintetizam, colina-acetiltransferase e ácido glutâmico descarboxilase em diferentes estruturas cerebrais (TRELLES, 1986).

Segundo Foster (2006), prejuízos de memória relacionados com a idade começam na meia vida e este déficit cognitivo continua com o avançar da idade. Dentro da população de idosos sem demência, existe uma variabilidade muito grande de níveis de memória. Grande parte de ratos idosos analisados em laboratório exhibe um profundo déficit de memória espacial, quando testados em labirintos (testes de memória). Esta tarefa depende da integridade de áreas cerebrais importantes, responsáveis pelo aprendizado e memória, como a formação hipocampal. Animais idosos com memória prejudicada mostram perda de espinhos

durante o processo de envelhecimento como diminuição do número de células neuronais, alterações dendríticas, placas senis, degeneração neurofibrilar, degeneração granulo-vacuolar e acúmulo de lipofucsina. Estas lesões foram mais evidentes no córtex pré-frontal, parieto-temporal, *locus ceruleus*, *substantia nigra* e núcleo de Meynert (RICHARD, 1991).

Contrárias a idéia de que durante no envelhecimento normal ocorre uma deterioração global do cérebro, observações experimentais indicam que existe preservação de funções no cérebro velho e, em geral as mudanças que ocorrem são relativamente específicas para diferentes sub-regiões do hipocampo (ROSENZWEIG & BARNES, 2003)

Por volta dos anos 80 (KHACHATURIAN, 1984; LANDFIELD & PITLER, 1984; GIBSON *et al.*, 1986), alguns pesquisadores sugeriram que alterações em processos dependentes de Ca^{2+} durante o envelhecimento poderiam afetar o processo de sinalização de Ca^{2+} e, conseqüentemente trazer prejuízos à plasticidade neuronal. Desta forma, alterações na comunicação neuronal representariam impactos negativos na cognição e memória.

Nos últimos anos, vários aspectos de sinalização e regulação intracelular de Ca^{2+} têm sido estudados durante o envelhecimento cerebral. Mecanismos como captação e liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático, influxo associado com a membrana plasmática e remoção de Ca^{2+} intracelular estariam associadas a alterações na função sináptica e declínio cognitivo (KELLY *et al.*, 2006).

1.3 Alterações plásticas decorrentes do exercício físico

O exercício físico pode se tornar um importante implemento no estilo de vida, pois, está relacionado a uma redução da ansiedade e depressão (MARTINSEN *et al.*, 1985), melhora do humor (FOLKINS & SIME, 1981), redução do déficit cognitivo (STEWART *et al.*, 2001), aumento da plasticidade sináptica, diminuição dos efeitos deletérios do envelhecimento (VAYNMAN & PINILLA, 2005) e controle de algumas patologias do sistema nervoso como Alzheimer (YU *et al.*, 2006) e epilepsia (ARIDA *et al.*, 1998/1999/2003/2004/2007).

Estudos mostram que a atividade física pode conduzir a uma proliferação de células precursoras neurais, (VAN PRAAG *et al.*, 1999; JACINI *et al.*, 2004), proporcionando regeneração de terminações axoniais de neurônios danificados (MOLTENI *et al.*, 2004), além de ter um importante papel na redução da vulnerabilidade de neurônios dopaminérgicos a agentes agressores (SMITH & ZIGMOND, 2003). Animais de laboratório que são submetidos ao exercício físico regular desenvolvem novos neurônios na região do hipocampo, quando comparados com animais inativos (VAN PRAAG *et al.*, 1999; GAGE, 2002).

Tem sido também observado que o exercício físico voluntário em roda facilita a recuperação de lesões neuronais, melhora a função cognitiva, promove fatores neurotróficos associados à sobrevivência de células progenitoras, diferenciação e elevação da memória de longo prazo (VAN PRAAG *et al.*, 1999). Van Praag e colaboradores (2005) mostraram em ratos com 19 meses de idade submetidos ao exercício físico voluntário por 30 dias, um aumento no número de neurônios no giro denteado e melhora no teste de memória (water maze), quando comparados com ratos controle da mesma idade.

Jacini *et al.*, (2004) observaram que os exercícios físicos proporcionam um aumento significativo no número de células BrdU positivas (um marcador de divisão celular) no hipocampo, tanto em animais que realizam atividade voluntária quanto em atividade forçada. Arida e colaboradores (2004) mostraram um aumento do número de células parvalbumina-positivas no hilo do giro denteado em exercício voluntário e forçado, indicando a viabilidade do método de exercício físico forçado. Foi demonstrado também que os gânglios sensoriais dos animais submetidos ao exercício físico, apresentam alteração de fatores neurotróficos e sinapses entre o 3º e o 7º dia de exercício físico, quando comparados com animais sedentários (MOLTENI *et al.*, 2004).

Embora a literatura relate várias alterações no SNC, os mecanismos moleculares pelo qual o exercício influenciaria na plasticidade, ou seja, na estruturação e na função do SNC, não estão bem definidos. Fatores de crescimento, como a família das neurotrofinas tem sido candidatos a moduladores da plasticidade neuronal. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) e Nerve Growth Factor (NGF), membros da família das neurotrofinas, são de particular interesse pela sua capacidade de promover a sobrevivência e função de vários sistemas de neurotransmissão. A regulação da expressão de neurotrofinas está claramente

ligada à atividade neuronal (BOATELL *et al.*, 1992; GALL, 1993; LAUTERBORN *et al.*, 1994). Estudos prévios têm mostrado que ratos com acesso a atividade voluntária em roda, apresentam um aumento da expressão de BDNF no hipocampo (NEEPER *et al.*, 1995).

A atividade neuronal e interações de neurotransmissores controlam a expressão do BDNF no hipocampo, sendo que vários neurotransmissores modulatórios que convergem para neurônios glutamatérgicos, incluindo a acetilcolina, GABA e monoaminas, podem afetar a expressão de BDNF (COTMAN & BERCHTOLD, 2002). O septo medial, sendo a origem de aferências colinérgicas e GABAérgicas do hipocampo, poderia participar da “upregulation” do BDNF em resposta ao exercício físico. Vanderwolf (1969) mostrou que a atividade voluntária em roda ativava um padrão de disparo persistente (conhecido como ritmo teta) no hipocampo de rato, e esse padrão de disparo era dependente de neurônios colinérgicos e GABAérgicos do septo medial.

A relação entre exercício físico e função cognitiva ainda não está totalmente esclarecida, porém uma hipótese é que a atividade física pode minimizar o declínio da função cardiovascular associada com hipóxia cerebral e conseqüente declínio cognitivo (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2004). Um aumento da oxigenação no cérebro estimula e protege o sistema nervoso central (DISHMAN, 1985). Colcombe *et al.* (2004) demonstraram que o aumento da aptidão cardiovascular influenciou na melhora da plasticidade cerebral em ratos idosos, com aumento da atividade metabólica nas regiões pré-frontal e cortico-parietal.

Os estudos dos fatores de crescimento neuronal, exercício físico e função cognitiva são de grande interesse para determinar a influência do exercício sobre a plasticidade cerebral. Alguns autores têm sugerido que a expressão de calbindina e a parvalbumina (PV), poderia ter um efeito protetor e de aumento de resistência à lesão excitotóxica (SLOVITER, 1989; FERRER *et al.*, 1994). O único estudo que analisou a expressão da calbindina induzida pelo exercício físico, demonstrou um aumento no número de neurônios calbindina-positivos nas células granulares do giro denteado e nas regiões de CA1 e CA3 de ratos após atividade locomotora em roda (EILAM, *et al.*, 1999).

Com relação a PV, além de ser encontrada aumentada em animais adultos que realizam exercício físico (ARIDA *et al.*, 2004), sua expressão também é maior em animais que foram tratados com vitamina D (VIRAGH *et al.*, 1989). O mesmo não

acontece com animais com esquizofrenia, onde é encontrada uma redução de pelo menos 50% de neurônios dos corpos mamilares e interneurônios gabaérgicos imunoreativos à PV (BERNSTEIN *et al.*, 2007). Estudos têm comprovado a eficácia da PV como marcador neuronal, sendo útil para uma variedade de sistemas e circuitos funcionais cerebrais (HEIZMANN, 1992). Suas principais funções são a de proteção, transporte de Ca^{2+} , regulação de vários sistemas enzimáticos (HEIZMAN, 1992) e modulação da plasticidade sináptica de curto prazo (CAILLARD *et al.*, 2000). Considerando que o processo de degeneração celular é acompanhado de prejuízos na homeostase de Ca^{2+} , foi postulado um papel protetor para as (CaBP) que se ligam a certas populações de neurônios (HEIZMAN, 1992). Existe a hipótese de que as CaBP são componentes necessários para a manutenção da homeostase do cálcio, evitando a ocorrência de morte nas células onde se encontram presente (SLOVITER, 1989; FERRER *et al.*, 1994). A ausência da homeostase do cálcio neuronal pode ser a causa de muitas doenças degenerativas encontradas em ratos idosos (KELLY *et al.*, 2006). Estudos prévios têm mostrado um aumento da marcação de PV na formação hipocampal em ratos submetidos ao exercício físico voluntário e forçado (ARIDA *et al.*, 2004), assim como em ratos com epilepsia (ARIDA *et al.*, 2007).

Tendo em vista que o exercício físico provoca alterações plásticas na formação hipocampal utilizando a PV como marcador desta plasticidade torna-se importante verificar as possíveis alterações nos diferentes estágios de vida do animal (2, 6 12, 18 meses), após um programa de treinamento físico aeróbio forçado em esteira rolante (30 dias).

2 OBJETIVO

Determinar as possíveis alterações da expressão da PV na formação hipocampal de ratos com diferentes idades submetidos ao um programa de exercício físico forçado aeróbio em esteira rolante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados para o estudo ratos albinos da raça Wistar, machos, com idade de 2, 6, 12 e 18 meses provenientes do biotério central da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC). Os animais ficaram alojados em grupo de até 4 ratos, em gaiolas apropriadas, onde tiveram livre acesso à água e comida. As condições do biotério obedeceram a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro: 07:00-19:00), sendo a temperatura ambiente mantida constante entre 21 e 22 °C. Os animais foram divididos em 4 grupos separados por idades (2, 6, 12, 18 meses) e subdivididos em 2 grupos: grupo (A) - controle e grupo (B) - treinamento físico. O protocolo experimental obteve aprovação da Comissão de Ética em Manipulação e Experimentação Animal (CEMEA) da UMC.

3.2 Programa de Treinamento Físico

O programa de treinamento físico foi realizado em esteira rolante. Para determinar uma medida de treinabilidade dos animais, uma escala de desempenho na esteira de 1 a 5, classificada por Dishman e col. (1988) onde, 1. o animal se recusa a correr, 2. corrida sem constância (corre e para ou corre em direção errada), 3. corrida regular, 4. corrida boa (ocasionalmente corre na parte de trás da esteira), 5. corrida excelente (corre permanentemente na parte da frente da esteira), foi realizada. Os animais com uma classificação igual ou superior a 3 foram incluídos no grupo de treinamento físico. Este procedimento é usado para excluir possíveis níveis diferentes de estresse entre os animais. Os animais foram familiarizados com a esteira rolante por 3 dias durante 10 min/dia. O programa de treinamento aeróbio consistiu de 30 sessões em esteira rolante, 7 vezes por semana com intensidade do exercício (60% VO_2 máx) de acordo com parâmetros prévios utilizados em estudo anterior (Arida e col. 1999). Cada sessão de treinamento iniciou-se com um

aquecimento de 5 min a 10-12 m/min. O tempo e a velocidade de corrida foram aumentados gradativamente durante os dias subseqüentes.

3.3 Preparação do tecido

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico 75mg/kg (i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca com tampão fosfato salina (PBS pH 7,4) contendo heparina. A seguir, essa solução foi substituída por paraformaldeído 4% em PBS. Os cérebros foram removidos imediatamente e deixados por 4 horas na solução fixadora de paraformaldeído 4% e depois foram colocados em uma solução sacarose 30% em PBS a 4°C. Após 48 horas, esses cérebros foram cortados num vibratomo (LEICA) em fatias de 40µm.

3.4 Imunohistoquímica

Para o processo imunohistoquímico, as fatias foram embebidas em solução de peróxido de hidrogênio 0,1% por 30 minutos, para o bloqueio da atividade das peroxidases endógenas do tecido, que seriam responsáveis por uma marcação inespecífica. A seguir, as fatias foram lavadas em Tris HCL e TRITON X-100 10%, objetivando-se a permeabilização celular. Em seguida, as fatias foram incubadas em solução de soro albumina 0,1% durante 90 minutos à temperatura ambiente, a fim de evitar reações inespecíficas. Posteriormente, os cortes foram incubados em solução contendo o anticorpo primário anti-Parvalbumina na diluição adequada à temperatura de 4°C ao longo da noite. A seguir, as fatias foram colocadas na solução contendo o anticorpo secundário biotilado, na diluição de 1:200, por um período de 90 minutos à temperatura ambiente, permitindo a ligação do anticorpo secundário ao primário. Posteriormente as fatias foram colocadas em uma solução do kit ABC por 90 minutos e depois foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) 0,06% em Tris-HCl 0,05M pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 1µl/ml. O DAB é um substrato cromógeno da enzima peroxidase, que confere ao sítio onde se encontra uma cor castanho-amarelada ao sofrer a ação dessa enzima, permitindo a

visualização da imunomarcção. Por fim as fatias foram montadas, desidratadas, diafenizadas e cobertas com lamínulas, usando-se Entellam (MERK).

3.5 Análise dos dados

Após esses procedimentos, as lâminas de todos os grupos foram analisadas qualitativamente e quantitativamente em microscópio óptico por dois pesquisadores. A análise qualitativa da expressão de células imunorreativas a PV foi realizada nos subcampos CA1-CA3 e hilo do giro denteado do hipocampo dorsal. A quantificação de fibras foi realizada no hilo do giro denteado (X400) usando um programa de imagem (image tool-UTHSCSA). Para análise estatística entre os grupos controle e experimental utilizamos a comparação das médias através do *teste t não pareado* e para análise das diferentes idades utilizamos o teste de análise de variância *ANOVA*.

4 RESULTADOS

4.1 Análise qualitativa

A expressão da PV na formação hipocampal foi analisada qualitativamente em todos os grupos. Foi observado um aumento da expressão de células imunorreativas a PV nas regiões de CA1, CA3 e hilo do giro denteado; e de fibras no *stratum radiatum* de CA1 (figura 1), CA3 (figura 2) e hilo do giro denteado (figura 3), dos grupos de 2 (figura 1 e 2 E), 6 (figura 1 e 2 F), 12 (figura 1 e 2 G) e 18 meses (figura 1 e 2 H) que realizaram um programa de exercício físico forçado quando comparadas com as mesmas regiões do grupo controle de 2 (figura 1 e 2 A), 6 (figura 1 e 2 B), 12 (figura 1 e 2 C) e 18 meses (figura 1 e 2 D).

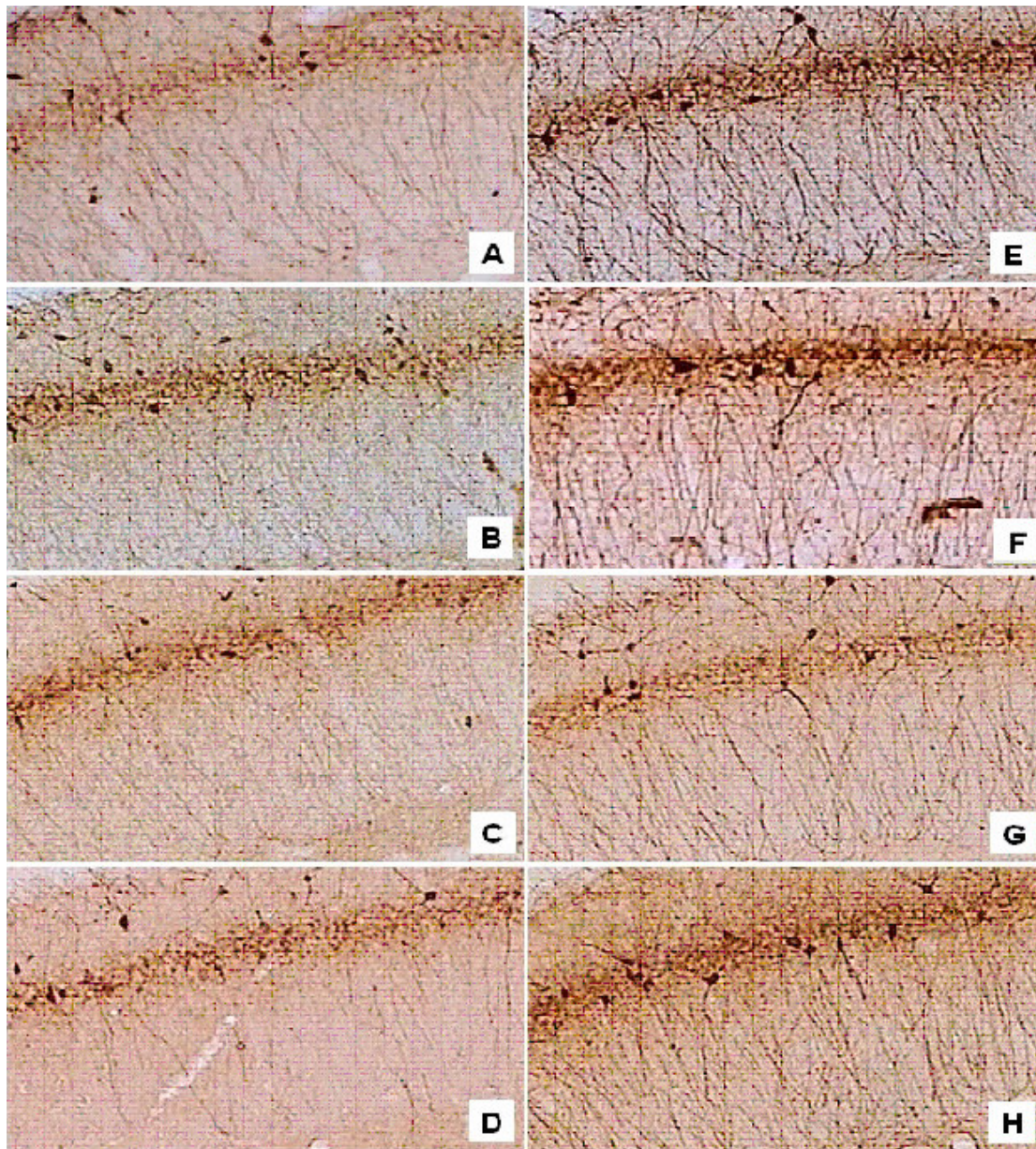


Figura 2: Fotomicrografias de células imunorreativas a PV na região CA1 e fibras na região do *stratum radiatum* de CA1. Animais controle 2 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 meses (D) (N=5) e exercício forçado 2 (E), 6 (F), 12 (G) e 18 meses (H), (N=5) (Do autor).

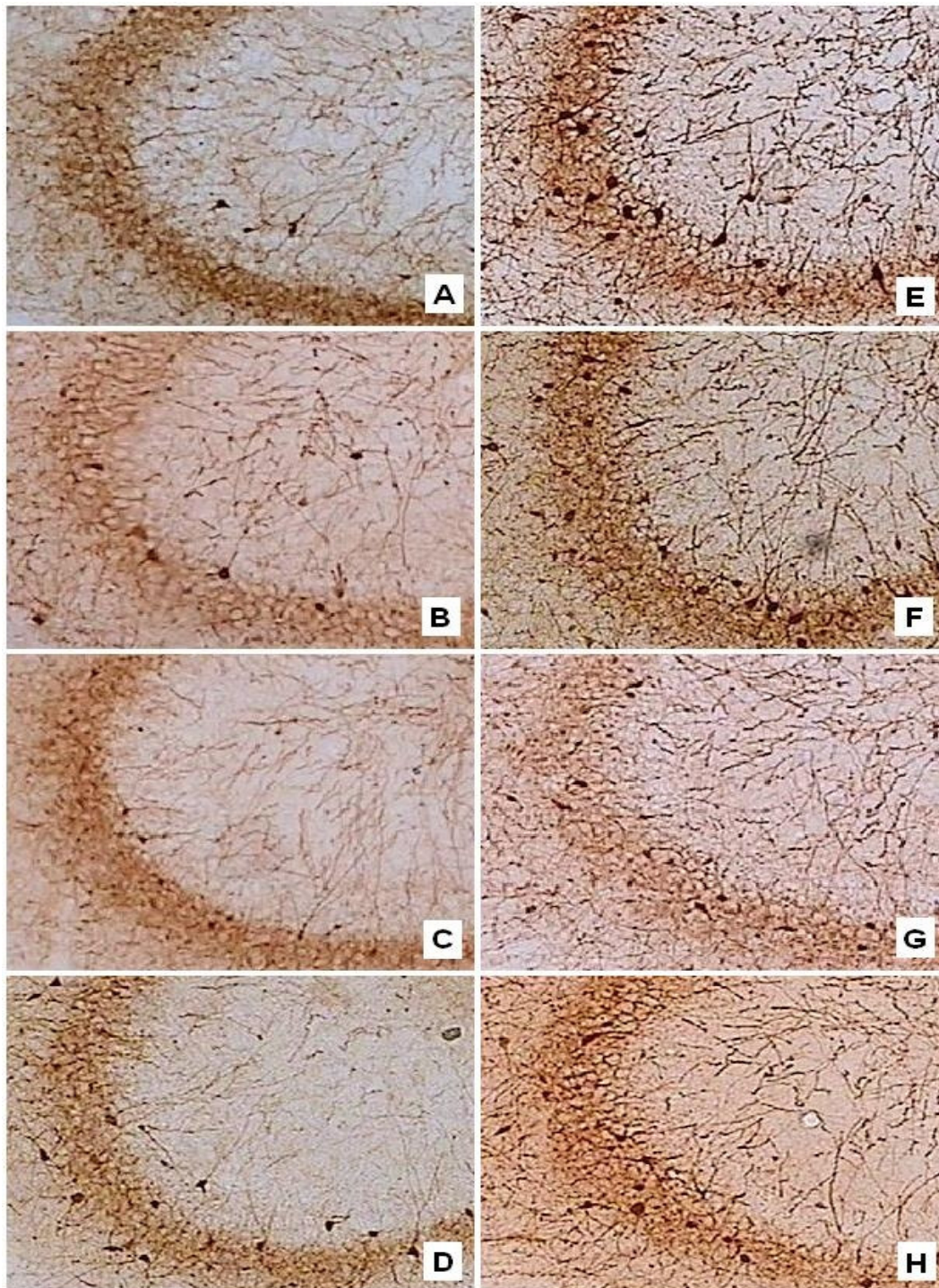


Figura 3: Fotomicrografias de células imunorreativas a PV na região CA3 e fibras na região do *stratum radiatum* de CA3. Animais controle 2 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 meses (D) (N=5) e exercício forçado 2 (E), 6 (F), 12 (G) e 18 meses (H). (N=5) (Do autor).

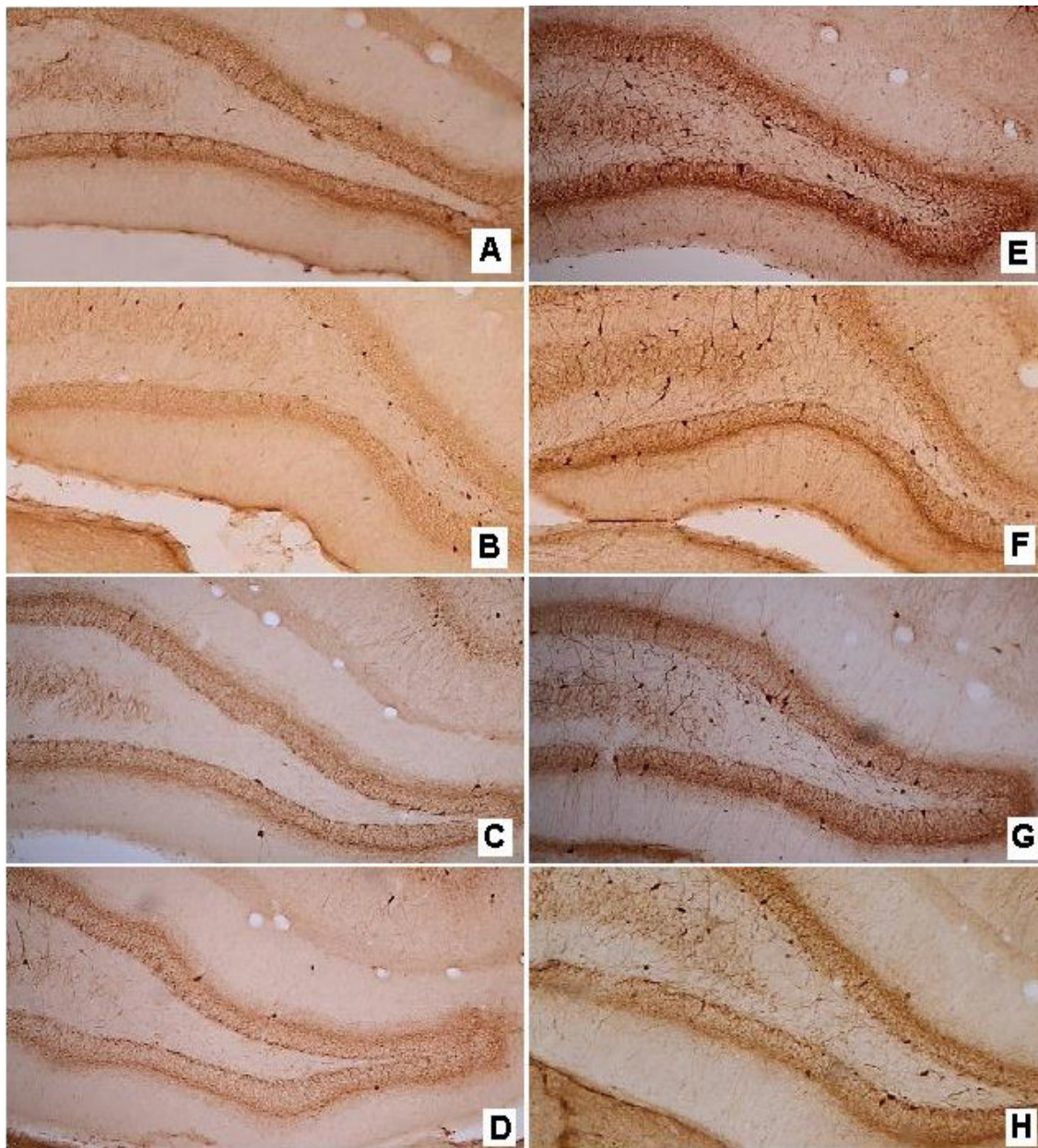


Figura 4: Fotomicrografias de células imunorreativas a PV e fibras na região do hilo do giro denteado. Animais controle 2 (A), 6 (B), 12 (C) e 18 meses (D) (N=5) e exercício forçado 2 (E), 6 (F), 12 (G) e 18 meses (H). (N=5) (Do autor)

4.2 Análise quantitativa

Foi observado um aumento significativo ($p < 0.05$) na marcação de fibras de células PV-positivas na região do hilo do giro denteado nos animais do grupo treinamento físico quando comparado com os animais do grupo controle em todas as idades, não apresentando alterações significativas quando correlacionadas as diferentes idades do mesmo grupo.

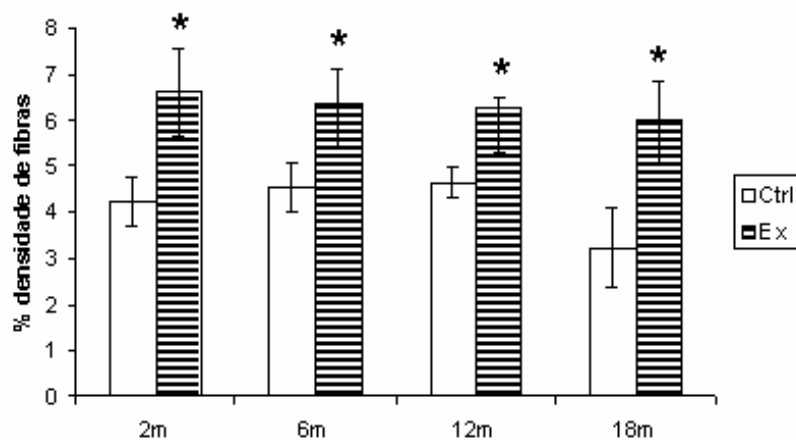


Figura 5: Comparação do percentual de densidade de fibras de células PV-positivas na região do hilo do giro denteado dos grupos controle e exercício forçado com 2, 6, 12 e 18 meses de idade (Do autor).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que o exercício físico moderado em esteira, leva a alterações na marcação de fibras e células que expressam PV nas regiões de CA1, CA3 e hilo do giro denteado em diferentes idades. Nossos estudos sugerem que a PV pode ser um marcador útil para o estudo de mudanças relacionadas ao exercício físico.

O exercício físico em esteira tem sido relacionado com o aumento da proliferação celular no giro denteado (Kim *et al.* 2004). Essa região é de grande importância, pois na zona subgranular, encontram-se células progenitoras mitoticamente ativas, sendo estas capazes de gerar novos neurônios durante a fase adulta (LOIS & ALVAREZ-BUYLLA, 1994; GOUD *et al.*, 1997; 1998; ERIKSON *et al.*, 1998). A proliferação de novas células no giro denteado é conhecida por representar um papel de destaque no processo de aprendizagem (LEMAIRE *et al.*, 2000). Outro estudo também demonstrou que ratos que realizaram exercício físico em esteira por um período de 7 dias apresentaram um aumento na expressão de potenciais de longo-prazo (LTP) e fatores neurotróficos (BDNF) no giro denteado, melhorando assim sua atenção e memória (GALLAGHAN *et al.*, 2007)

Apesar de ter sido encontrada em nosso estudo alterações em todos os grupos com diferentes idades que realizaram exercício físico, o mesmo não aconteceu quando avaliamos a evolução da idade dentro de um mesmo grupo. Em contraste, outros estudos que avaliaram a expressão de fatores neurotróficos como BDNF decorrentes do exercício voluntário por 28 dias (ADLARD *et al.*, 2005) e proliferação celular decorrente de exercício forçado durante 5 dias (KIM *et al.* 2004), tem encontrado uma diminuição desses fatores relacionadas ao processo de evolução da idade. Com relação aos níveis basais do grupo controle, um estudo demonstrou que as concentrações da proteína BDNF não variam significativamente com a idade (ADLARD *et al.*, 2005). O mesmo padrão de variação foi encontrado em nosso trabalho utilizando a proteína PV. Em outro estudo os níveis de BDNF apresentaram-se aumentados entre 2 e 6 meses de idade, mas mantidos até os 18 meses de idade (NRISAWA-SAITO & NAWA, 1996).

Um estudo mostra que as alterações plásticas cerebrais provocadas pelo exercício em esteira podem está moduladas pela intensidade e duração do exercício

(KIM *et al.*, 2003). Em outro estudo, o aumento na marcação de fibras no hilo do giro denteado em animais submetidos a exercício voluntário em roda é significativamente maior do que o observado após o exercício forçado em esteira (ARIDA *et al.*, 2004). Animais que realizam exercício em esteira em baixa intensidade apresentam um número maior de células BrDU- positivas no giro denteado, quando comparado com animais que realizam exercício em alta intensidade, sendo o pico de proliferação celular alcançado durante o sétimo dia de exercício (KIM *et al.*, 2003).

Em estudo realizado por ADLARD *et al.*, (2005), animais jovens, adultos e idosos que realizaram corrida voluntária por um período de 7 dias, apresentaram os mesmos níveis de BDNF, embora os animais jovens tenham percorrido distâncias maiores do que os demais. Com o passar dos dias, estes animais jovens permanecem correndo distâncias maiores e mantêm seus níveis de BDNF aumentados. Já os animais adultos e idosos mantêm suas distâncias percorridas e diminuem seus níveis de BDNF, passando a não apresentar diferenças significativas quando comparados com os animais controles. Esta discrepância de dados pode ser atribuída a protocolos diferentes de exercício. Provavelmente, o tipo de estímulo físico pode interferir neste processo.

Os resultados presentes neste estudo demonstram que a marcação de fibras no hilo do giro denteado de animais submetidos a exercício físico em esteira é significativamente maior do que os animais controles em todas as idades, e que a evolução da idade não representou um fator de grande importância. Um interesse maior no estudo desta região se faz necessário, principalmente porque estudos prévios têm mostrado que neurotransmissor como N-metil-D-aspartato (NMDA), crises epiléticas, isquemia, ambiente enriquecido e exercício físico também contribuem para o aumento da proliferação de células granulares precursoras e neurogênese no giro dentado (CAMERON *et al.*, 1998; KEMPERMANN *et al.*, 1997; PARENT *et al.*, 1998).

Outros fatores são conhecidos por inibir a taxa de produção de novas células no giro denteado. O estresse induzido pelo exercício de alta intensidade assim como o envelhecimento são conhecidos por diminuir drasticamente essa taxa (KUHN, 1996; BORER, *et al.*, 1992), além de provocarem perda neuronal no hilo do giro denteado (WEST *et al.*, 1994). O aumento na secreção de glucocorticóides, como cortisol e corticosterona que suprime a neurogênese no DG são sugeridos como mecanismo subjacente da diminuição da proliferação celular relacionada com o

estresse e a idade (CAMERON, 1999; GOULD *et al.*, 1992). Desta forma para que o exercício funcione como um mecanismo positivo para o SNC é interessante que seja realizado em intensidade baixa ou moderada (KIM *et al.*, 2003), podendo proporcionar assim uma redução dos níveis de estresse e uma diminuição dos efeitos deletérios do envelhecimento (KIRALY, 2005; VAYNMAN & PINILLA, 2005).

Embora nossas experiências não permitam identificar se o aumento na expressão de PV acontece em novos neurônios ou em neurônios preexistentes, estes resultados sugerem que respostas plásticas no cérebro ocorrem em todas as idades avaliadas em função de um programa de exercício físico moderado em esteira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLARD, P.A.; PERREAU, V.M.; COTMAN, C.W. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. **Neurobiology of Aging**, v. 26, p. 511-520, 2005.

ARIDA, R.M.; SCORZA, C.A.; SCORZA, F.A.; DA SILVA, S.G.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 2007.

ARIDA, R.M.; SCORZA, C.A.; SILVA, A.V.; SCORZA, F.A.; CAVALHEIRO, E.A. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. **Neuroscience Letters**, v. 364, p.135-138, 2004.

ARIDA, R.M.; FERNANDES, M.J.; SCORZA, F.A.; PRETI, S.C.; CAVALHEIRO, E.A. Physical training does not influence interictal LCMRglu in pilocarpine-treated rats with epilepsy. **Physiol Behav**, v.79, p.789-794, 2003.

ARIDA, R.M.; SCORZA, F.A.; SANTOS, N.F.; PERES, C.A.; CAVALHEIRO E.A. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res**, v.37, p.45-52, 1999.

ARIDA, R.M.; VIEIRA, J.A.; CAVALHEIRO, EA. Effect of physical exercise on kindling development. **Epilepsy Res**, v.30, n.2, p.127-132, 1998.

BERNSTEIN, H. G.; KRAUSE, S.; KRELL, D.; DOBROWOLNY, H.; WOLTER, M.; STAUCH, R.; RANFT, K.; DANOS, P.; JIRIKOWSKI, G. F.; BOGERTS, B. Strongly reduced number of parvalbumin-immunoreactive projection neurons in the mammillary bodies in schizophrenia: further evidence for limbic neuropathology. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1096: 120-127, 2007.

BOATELL, L.L.; LINDEFORS, N.; BALLARIN, M.; ERSNFORS, P. MAHY, N.; PERSSON, H. Activation of basal forebrain cholinergic neurons differentially regulates brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in different projection areas. **Neurosci. Lett**, v.136, p. 203-208, 1992.

BORER, K.T.; BESTERVELT, L.L.; MANNHEIM, M.; BROSAMER, M.B.; THOMPSON, M.; SWAMY, U.; PIPER, W.N. Stimulation by voluntary exercise of

adrenal glucocorticoid secretion in mature female hamsters. **Physiol Behav** v. 51, p. 713–718, 1992.

CAILLARD, O.; MORENO, H.; SCHWALLER, B.; LLANO, I.; CELIO, R.M.; MARTY, A. Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. **Biophysical Chemistry**, 2000.

CAMERON, H.A.; MCKAY, R.D.G. Restoring production of hippocampal neurons in old age. **Nature Neurosci.** v. 2, p. 894–897, 1999.

CAMERON, H.A.; TANAPA, T. P.; GOULD, E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. **Neuroscience** v. 82, p. 349–354, 1998.

COLCOMBE, S.J.; KRAMER, A.F.; ERICKSON, K.I.; SCALF, P.; MCAULEY, E.; COHEN, N.J.; WEBB, A.; JEROME, G.J.; MARQUEZ, D.X.; ELAVSKY, S. Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. **Neuroscience**, v.101, p. 3316-3321, 2004.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v.25, p.295-301, 2002.

DAVIES, P.J.M; WRIGHT, E.A. A New Method for Measuring Cranial Cavity Volume and its Application to the Assessment of Cerebral Atrophy of autopsy. **Neuropath and Applied Neurobiology**, v.3, p. 341-353, 1977.

DISHMAN, R.K.; ARMSTRONG, R.B.; DELP, M.D.; GRAHAM, R.E. and DUNN, A.L., Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats, **Physiol. Behav**, v. 43, p. 541-546, 1988.

DISHMAN, R.K, Medical psychology in exercise and sport. **Med Clin North**, v.69, p. 123-143, 1985.

ERIKSSON. P.S. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Med**, v. 4, p. 1313-1317, 1998.

FANG, Y.; KOLANOWSKI, A.M.; STRUMPF, N.E.; ESLINGER, J.P. Improving cognition and function through exercise intervention in Alzheimer's Disease. **Journal of nursing**, 2006; v. 38:4, p. 358-365, 2006.

FERRER, I.; OLIVER, B.; RUSSI, A.; CASAS, R.; RIVERA, R. Parvalbumin and calbindin-D28k immunocytochemistry in human neocortical epileptic foci. **J Neurol Sci**, v.123, p.18-25, 1994.

FOLKINS, C.H.; SIME, W.E. Physical fitness training and mental health. **Am Psychol**, v. 36(4), p.37-389, 1981.

FOSTER, T.C., Biological markers of age-related memory deficits: treatment of senescent physiology. **CNS Drugs**, v. 20(2), p.153-66, 2006.

FRIEDLAND, R.P.; FRITSCH, T.; SMYTH, K.A.; KOSS, E.; LERNER, A.J.; CHEN, C.H. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in mid life compared with healthy control-group members. **Proc Natl acad Sci USA**, v.98, p. 3440-5, 2001.

GAGE, F.H, Neurogenesis in the adult brain. **J Neurosc**, v. 22, p. 612-3, 2002.

GALL, C. Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy. **Exp. Neurol**, v. 124, p. 150-166, 1993.

GEINISMAN, Y.; MORRELLT, L.T.; MORRELLT, F. Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: Morphological substrate of memory deficit in aged rats. **Neurobiology**, v. 83, p. 3027-3031,1986.

GIBSON, G.; PERRINO, P.; DIENEL, G.A. In vivo brain calcium homeostasis during aging. **Mech. Ageing Dev**, v. 37, p. 1–12, 1986.

GOULD E, ET AL. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosc**, v. 17, p. 2492-2498, 1997.

GOULD E, ET AL. Proliferatin of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 3168-3171, 1998.

HEIZMANN, C.W. Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. **Gen Physiol Biophys**. v. 11(5), p. 411-25, 1992.

HARRY, J.G.; D'HELLENCOURT, L.C. Dentate Gyrus: Alterations that Occur with Hippocampal Injury. **NeuroToxicology**, v. 24, p. 343-356, 2003.

HIMEDA, T.; MIZUNO, K.; KATO, H.; ARAKI, T. Effects of age on immunohistochemical changes in the mouse hippocampus. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, p. 673–677, 2005.

HOLMES, M.M.; GALEA, L.A.M.; MISTLBERGER, R.E.; KEMPERMANN, G. Adult Hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: circadian and dose-dependent effects. **Journal of Neuroscience Research**, v. 76, p. 216 - 222, 2004.

JACINI, W. F.S.; MENDEZ-OTERO, R.; SANTIAGO, M.F.; Exercício físico e neurogênese no hipocampo de hamsters adultos: uma comparação entre exercícios voluntários e forçados. **Rev Bras Med Esporte**, v.10, p. 5, 2004.

KELLY, K.M.; NADON, N.L.; MORRISON, J.H.; THIBAUT, O; BARNES, C.A.; BLALOCK, E.M. The neurobiology of aging. **Epilepsy Research**, v. 68, p.5–20, 2006.

KHACHATURIAN, Z.S. Towards theories of brain aging. In: Kay,D.S., Burrows, G.W. (Eds.), Handbook of Studies on Psychiatry and Old Age. **Elsevier**, p. 7–30, 1984.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, p. 10409- 10414, 1997.

KEMPERMANN G, KUHN HG. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, p. 493–495, 1997.

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. Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats, **Int. J. Sports Med**, v. 24, p. 114–117, 2003.

KIM, Y.; HONG KIM, H.; SHIN, M.; CHANG, H.; JANG, M.; SHIN, M.; LEE, S.; LEE, H.;B, YOON, J.; JEONG, I.; KIM, C. Age-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. **Neuroscience Letters**, v. 355 , p. 152–154, 2004.

KIRALY, M. A.; KIRALY, S. J. The effect of exercise on hippocampal integrity: review of recent research. **Int. J. Psychiatry Med.**, v. 35(1), p. 75-89, 2005.

KUHN, H.G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F.H., Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation, **J. Neurosci**, v.16, p. 2027–2033, 1996.

LANDFIELD, P.W.; PITLER, T.A. Prolonged Ca²⁺-dependent afterhyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats. **Science**, v. 226, p. 1089–1092, 1984.

LAUTERBORN, J.C.; ISACKSON, P.J.; GALL, C.M. Seizure-induced increases in NGF Mrna exhibit different time courses across forebrain regions and biphasic in hippocampus. **Exp. Neurol**, v. 125, p. 22-40, 1994.

LAUTENSCHLAGER, N.T.; ALMEIDA, O.P.; FLICKER, L.; JANCA, A. Can physical activity improve the mental health of older adults? **Annals of general Hospital Psychiatry**, v. 3, p. 12, 2004.

LEMAIRE, V.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. D.N. Abrous, Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 97, p.11032–11037, 2000.

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, v. 264, p. 1145-1148, 1994.

MARTINSEN, E.W.; MEDHUS, A.; SANDVIK, L. Effects of aerobic exercise on depression: a controlled study. **Br Med J**, v. 13, p. 291, 1985.

MOLTENI, R.; ZHENG, J.Q.; YING, Z, PINILLA.; F.G, TWISS, J.L. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **Neuroscience Letters**, v. 101(22), p. 8473–8478, 2004.

MORRISON, J.H.; HOF, P.R. Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. **Prog. Brain Res.** v. 136, p. 467–486, 2002.

MULLER, M.; FELMY, F.; SCHWALLER, B.; SCHNEGGENBURGER, R. Parvalbumin is a mobile presynaptic Ca²⁺ buffer in the calyx of held that accelerates the decay of Ca²⁺ and short-term facilitation. **J. Neurosci.**, v.27(9), p. 2261-2271, 2007.

NARISAWA-SAITO, M.; WAKABAYASHI, K.; TSUJI, S.; TAKAHASHI, H.; NAWA, H. Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 7, p. 2925–58, 1996.

NEEPER, S.A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**, v.373, p.109, 1995.

OLIVEIRA, R.J.; FURTADO, A.C. Envelhecimento, sistema Nervoso e o exercício Físico. [Lecturas: Educación Física y Deportes http://www.efdeportes.com/ revista digital](http://www.efdeportes.com/revista_digital), · Ano 4 · N° 15 | Buenos Aires, 08/99.

O'CALLAGHAN, R.M.; OHLE, R.; KELLY, A.M. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. **Behav Brain Res** v. 176, p. 362-366, 2007.

PARENT, J.M.; YU, T.W.; LEIBOWITZ, R.T.; GESCHWIND, D.H.; SLOVITER, R.S.; LOWENSTEIN, D.H. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus, **J. Neurosci.** v. 17, p. 3727–3738, 1997.

PRAAG, H.V.; CHRISTIE, B.R.; SEJNOWSKI, T.J.; GAGE, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Neurobiology**, v. 96, p. 13427-13431, 1999.

PRAAG, H.V.; SHUBERT, T.; ZHAO, C.; GAGE, F.H. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 8680-8665, 2005.

RICHARD, J. J. The neuropathology of alzheimers disease. Investigated by transplantation of mouse trisomy 16 hippocampal tissues. **Tins**, v. 14(8), p. 334-338, 1991.

ROSENZWEIG, E.S.; BARNES, C.A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Prog. Neurobiol.** v. 69, p. 143–179, 2003.

SLOVITER, R.S. Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. **J Comp Neurol**, v.280, p.183-196, 1989.

SMITH, A.D.; ZIGMOND, M.J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. **Exp Neurol**, v.184, p.31-39, 2003.

STEWART, R.; RICHARDS, M.; BRAYNE, C.; MANN, A. Vascular risk and cognitive impairment in an older, British, African-Caribbean population. **J AM Geriatr Soc**, v. 49(3), p. 263-269, 2001

TRELLES, L – El envejecimiento del sistema nervioso: Aspectos estructurales y bioquímicos. **Rev . Neuropsiquiatr**. v. 49(4), p.192-202, 1986.

TROJAN, S.; POKORNY, J. Theoretical aspects of neuroplasticity. **Physiol. Res**, v. 48, p. 87-97, 1999.

VANDERWOLF, C.H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol**, v.26, p. 407-418, 1969.

VAYNMAN, S.; GOMES-PINILLA, F. License to Run: Exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 19, p. 283–295, 2005.

VIRAGH, P.A.; HAGLIDT, K.G.; CELIO, M.R. Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis **Neurobiology**, v. 86, p. 3887-3890, 1989.

WEST, M.J.; COLEMAN, P.D.; FLOOD, D.G.; TRONCOSO, J.C.; Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease, **Lancet**, v. 344, p. 769–772, 1994.

XU, J. H.; LONG, L.; TANG, Y. C.; HU, H. T.; TANG, F. R. Ca(v)1.2, Ca(v)1.3, and Ca(v)2.1 in the mouse hippocampus during and after pilocarpine-induced status epilepticus. **Hippocampus**, v.17(3), p. 235-251, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)