

LANE COELHO VIANA

**INFLUÊNCIAS DOS ESTADOS NUTRICIONAIS E DO
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A EXPRESSÃO DAS SINTASES DO
ÓXIDO NÍTRICO NO HIPOCAMPO E ESTRIADO DE CAMUNDONGOS
SUÍÇOS ALBINOS**

BELÉM

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LANE COELHO VIANA

**INFLUÊNCIAS DOS ESTADOS NUTRICIONAIS E DO
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A EXPRESSÃO DAS SINTASES DO
ÓXIDO NÍTRICO NO HIPOCAMPO E ESTRIADO DE CAMUNDONGOS
SUÍÇOS ALBINOS**

**Dissertação de mestrado apresentada
ao colegiado do Programa de Pós-
Graduação em Neurociências e
Biologia Celular da Universidade
Federal do Pará, para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências**

Orientador: Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz

BELÉM

2006

**INFLUÊNCIAS DOS ESTADOS NUTRICIONAIS E DO
EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A EXPRESSÃO DAS SINTASES DO
ÓXIDO NÍTRICO NO HIPOCAMPO E ESTRIADO DE CAMUNDONGOS
SUÍÇOS ALBINOS**

LANE COELHO VIANA

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Prof. Dra. Silene Maria Araújo de Lima

Prof. Dr. Antonio Pereira Júnior

Data da defesa: 24 de março de 2004.

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Viana, Lane Coelho

Influências dos Estados Nutricionais e do Exercício Físico sobre a Expressão das Sintases do Óxido Nítrico no Hipocampo e Estriado de Camundongos Suíços Albinos/ Lane Coelho Viana ; orientador, Cristovam Wanderley Picanço Diniz – 2006.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2006.

1. Hipocampo (Cérebro). 2. Cortex cerebral. 3. Distúrbios da nutrição em animais. 4. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos. 5. NADPH desidrogenase. 6. Camundongo como animal de laboratório.
I. Título.

CDD – 20. ed. 599.32330448

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Universidade Federal do Pará, sob orientação do prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz, e contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Nossos sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que ajudaram a realizá-lo.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 - INTRODUÇÃO	11
1.1 – Nutrição e desenvolvimento encefálico	12
1.2 – Atividade Física e Neuroproteção	17
1.3 – Estriado, Hipocampo, Atividade Física e Cognição	20
1.3.1 – Estriado, Atividade Motora e Memória Espacial	21
1.3.2 – Hipocampo, Atividade Motora Voluntária e Cognição	24
1.3.2.1 – As Células de Localização Espacial	28
1.3.2.2 – A Potenciação de Longa Duração	30
1.4 – O Óxido Nítrico, suas enzimas de Síntese, e seu papel na plasticidade neural durante o desenvolvimento	32
2 – Objetivos	37
3 – Material e Métodos	38
3.1 – Animais	38
3.2 – Grupos Experimentais	38
3.3 – Teste de aprendizado de memória espacial no labirinto aquático de Morris.....	40
3.4 – Perfusão e reação histoquímica	42
3.5 – Processamento histológico	42
3.6 - Análise densitométrica no estriado e hipocampo	43
3.7 – Atividade histoquímica	45
3.8 – Por que a adoção do índice de contraste?	46
3.9 – Análises estatísticas	47
4 – Resultados	48
4.1 – peso corporal dos animais	48

4.2 – Desenvolvimento nas rodinhas de correr	49
4.3 - As alterações nutricionais nas primeiras fases de vida pós-natal afetam a atividade histoquímica da NADPH-diaforase no hipocampo aos 21 dias pós-natais, sem alterações no estriado nesse período.....	49
4.4 - A subnutrição perinatal precoce reduz a atividade histoquímica da NADPH-diaforase no hipocampo durante a vida adulta, apresentando diferenças regionais em CA1, giro denteado e CA3.....	50
4.5 - O exercício voluntário associado à alimentação ad libitum não são suficientes para recuperar a atividade histoquímica da NADPH-diaforase prejudicada pela subnutrição perinatal no giro denteado, mas apresentam melhoras significativas em algumas camadas de CA1 e CA3.....	52
4.6 - A atividade física voluntária associada à reabilitação nutricional apresenta-se insuficiente na recuperação da atividade histoquímica da NADPH-diaforase no estriado de animais submetidos à subnutrição perinatal	54
4.7 - O desempenho dos animais no labirinto aquático de Morris não foi alterado pelas condições experimentais.....	56
5 – Discussão	58
5.1 - Mudanças na histoquímica da NADPH-diaforase no giro denteado, hipocampo e estriado: conseqüências funcionais da produção alterada de óxido nítrico	59
5.1.1 - Alterações vasculares, atividade histoquímica da NADPH-diaforase e atividade física voluntária	59
5.1.2 - Mudanças histoquímicas da NADPH-diaforase, plasticidade sináptica, neurogênese, desempenho no teste de aprendizado espacial e isolamento social	61
5.2 - Considerações Técnicas	65
6 – Referências Bibliográficas	67

LISTA DE FIGURAS

1. Curvas representando o desenvolvimento encefálico	17
2. Fotomicrografia e desenho esquemático do hipocampo	29
3. Animal praticando exercício na rodinha de correr	43
4. Áreas hipocampais de medida de transmitância	47
5. Gráficos representando valores de transmitância e de contraste ..	50
6. Peso corporal dos grupos aos 21 dias	51
7. Atividade diaforásica aos 21 dias	53
8. Atividade diaforásica aos 21 e 58 dias	54
9. Valores de contraste em CA1, CA2 e DG aos 58 dias	56
10. Fotomicrografias de CA1 e DG	57
11. Fotomicrografias de CA3	57
12. Valores de contraste no estriado aos 21 e 58 dias	58
13. Gráficos de latência de escape no labirinto aquático	59
14. Comparação de resultado de estudos prévios	60

Resumo

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar as possíveis contribuições do exercício voluntário na recuperação das alterações na atividade nitrérgica no hipocampo e estriado de camundongos, induzidas por subnutrição baseado na alteração do número de filhotes por nutriz. Para quantificar a atividade nitrérgica utilizamos a técnica histoquímica para NADPH-diaforase, uma técnica simples e robusta utilizada para localizar e quantificar os sítios de produção de óxido nítrico no tecido. Vinte e quatro camundongos suíços albinos machos foram randomicamente distribuídos no 5º dia pós natal em ninhadas de 6 (grupo controle) e 12 (grupo subnutrido) filhotes e assim mantidos até o 21º dia pós-natal. Ao 21º dia pós-natal, quatro animais de cada grupo foram sacrificados e os dezesseis restantes foram distribuídos em quatro grupos: Controle inativo (**CI**), controle exercício (**CE**), subnutrido inativo (**SnI**) e subnutrido exercício (**SnE**), agrupados de modo a formar dois animais por gaiola, com água e comida *ad libitum* em todos os grupos, e rodinhas de correr nas gaiolas dos grupos exercício. A análise por densitometria óptica da neurópila do hipocampo e estriado dos animais de 21 dias revelou uma diminuição da atividade histoquímica diaforásica da camada molecular do giro denteado e do estrato lacunoso molecular de CA1 e de todas as camadas de CA3 no grupo subnutrido comparado ao grupo controle. O estriado não apresentou diferenças entre os grupos aos 21 dias. Após uma recuperação nutricional, ao 58º dia, o grupo **SnE** apresentou um aumento na atividade nitrérgica em todas as camadas hipocampais comparado ao grupo **SnI**, porém sem alcançar os níveis do grupo **CE**. No estriado, o grupo **SnE** apresentou um aumento na atividade nitrérgica comparado ao grupo **SnI**, porém sem atingir os níveis do grupo controle, que apresentou maior atividade diaforásica no 58º dia em relação ao 21º dia. Aparentemente, a subnutrição atinge diferentemente as diversas áreas cerebrais e o exercício parece agir como modulador da atividade nitrérgica, auxiliando na recuperação da atividade reduzida pela subnutrição. O significado fisiopatológico das mudanças observadas permanece por ser investigado.

Abstract

The aim of the present study was to investigate the possible contributions of voluntary exercise on the recovery of the alterations on nitrenergic activity on mice hippocampus and striatum induced by a model of undernutrition based on litter size changes. To quantify the nitrenergic activity we used the NADPH-diaphorase histochemistry, a simple and robust technique used to localize and quantify the nitric oxide production sites on tissue. Twenty four Swiss male mice were randomly distributed at 5th postnatal day, to form litters with 6 (control group) or 12 pups (undernourished group). At 21th postnatal day, four animals of each group were sacrificed and the remaining sixteen were distributed into four groups: Inactive control (*CI*), exercise control (*CE*), inactive undernourished (*SnI*) and exercise undernourished (*SnE*), housed two animals per cage, with water and food *ad libitum*, and with running wheels on the cages of exercise groups. Densitometric analysis of hippocampal and striatum neuropil at 21th day groups revealed a decrease of histochemical activity of the molecular layer of the dentate gyrus and stratum lacunosum of CA1 and all layers of CA3 in the undernourished group when compared to control group. Striatum has not presented differences between groups at 21th day. After a nutritional recovery, at 58th day, the *SnE* group presented an increase on nitrenergic activity in all hippocampal layers when compared to the *SnI* group, but did not reach the *CE* group levels. In the striatum, *SnE* group presented an increase on nitrenergic activity when compared to the *SnI* group, but did not reach the levels of control group, which presented diaphorasic activity higher at 58th day then the 21th postnatal day. Apparently, the undernourishment affect differently the diverse cerebral areas and exercise seems to act as a nitrenergic activity modulator, helping on recovery of the activity impaired by environmental factors. The pathophysiological mechanisms underlying the observed changes remain to be investigated.

1 - INTRODUÇÃO

Segundo a Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations), em seu Relatório Anual sobre a Fome no Planeta, cerca de 826 milhões de pessoas atualmente são vítimas da fome em seu estágio mais avançado, o que representa quase um sexto da população mundial. Entre os países em situação de emergência encontram-se nos primeiros lugares a Somália, o Afeganistão e o Haiti (www.fao.org).

O Brasil, apesar de já ter sido um país no qual o quadro da fome, especialmente nas regiões menos desenvolvidas, alcançou níveis alarmantes, tem passado por uma transição nutricional nas últimas quatro décadas no que diz respeito à nutrição da sua população, revelando uma redução da prevalência de casos de desnutrição em crianças menores de cinco anos, e aumento da prevalência de casos de obesidade em adultos (Filho e Rissin, 2000).

Mesmo tendo passado por um processo de transição nutricional entre os quadros de desnutrição e obesidade, o Brasil ainda retém atualmente um quadro no qual a mortalidade infantil de crianças abaixo de um ano de idade chega a 9%, condenando um terço da sua população a viver em estado de má nutrição (ver www.webciencia.com).

Agravando essa situação está o fato de que muitos dos distúrbios nutricionais que se instalam no período perinatal e que não matam, deixam marcas permanentes nessas crianças, pelo fato de ocorrerem durante um período crítico de intenso desenvolvimento do sistema nervoso. Assim, esforços para compreender os mecanismos neuropatológicos associados a essas lesões perinatais permanentes são de grande interesse para o formulador de políticas públicas.

1.1 - Nutrição e desenvolvimento encefálico

Diversos estudos com modelos animais e humanos demonstram que influências ambientais complexas afetam de forma direta ou indireta o desenvolvimento cognitivo. Diferentes fatores ambientais nos períodos pré e pós-natal podem afetar as funções cognitivas e o desenvolvimento neural ao longo da vida de forma permanente ou transitória. Em ambientes desfavoráveis, o desenvolvimento inadequado das redes neurais pode afetar de forma permanente os níveis de expressão de diversas substâncias, tais como neurotransmissores, marcadores sinápticos e fatores neurotróficos, e essas alterações costumam se expressar em todas as escalas, incluindo mudanças morfológicas e comportamentais (Keller e Murua, 1997; Picanço-Diniz *et al*, 1998; Borba *et al*, 2000; Kehoe *et al*, 2001; Rotta *et al*, 2002; Koo *et al*, 2003; Picanço-Diniz *et al*, 2004; Rocha-de-Melo *et al*, 2004; Maia *et al*, 2006).

A inadequação nutricional é um dos principais fatores não-genéticos que afetam o desenvolvimento cerebral. Tem sido amplamente aceito que de forma geral a maturação do sistema nervoso central depende de três fatores críticos: características inatas ou genéticas, estimulação ou enriquecimento ambiental e nutrição adequada. Alterações desfavoráveis em um ou na combinação desses fatores resultam em disfunção no desenvolvimento cerebral (Katz e Davies, 1982; Jorgenson *et al*, 2003), podendo acarretar danos que podem ser ou não recuperados posteriormente pelo indivíduo. No presente trabalho emprega-se o termo subnutrição no sentido de indicar que, embora todos os nutrientes requeridos para o desenvolvimento adequado do animal estejam presentes na dieta, a quantidade de alimento ofertada é insuficiente para suprir as necessidades do indivíduo, enquanto que o termo má nutrição é usado para indicar que um ou mais dos nutrientes essenciais está faltando na dieta, ou está presente em proporções inadequadas, ver (Morgane *et al*, 2002) para revisão.

A subnutrição experimental, assim como diversas condições ambientais adversas aos quais animais experimentais podem ser submetidos durante o período crítico de desenvolvimento cerebral podem induzir diferentes

anormalidades morfológicas e funcionais (Bonthius e West, 1991; Chen *et al*, 2006), uma vez que durante o período de rápido crescimento cerebral ocorrem de forma acelerada os processos de síntese de componentes celulares (ácidos nucléicos e proteínas), neurogênese, gliogênese, migração neuronal e de células gliais, diferenciação e crescimento celular, proliferação e ramificação de dendritos e axônios assim como sinaptogênese. Em um elegante estudo utilizando encéfalos de crianças que foram levadas a óbito por desnutrição, Benítez-Bribiesca e colaboradores (Benitez-Bribiesca et al, 1999) verificaram que a desnutrição no período perinatal em humanos resulta em anormalidades nos dendritos, com a redução no número e morfologia de espinhas dendríticas, redução no tamanho dos dendritos nos córtices somestésico, motor e áreas corticais occipitais. O significado funcional de tais alterações não está completamente claro, mas podem estar relacionados com as anormalidades neuropsicológicas apresentadas por crianças que sofrem de desnutrição.

O desenvolvimento do sistema nervoso central nas primeiras fases de vida ocorre em fases que seguem uma seqüência precisa e diferente em diversas regiões cerebrais, e que varia em função do tempo e das espécies consideradas, porém a seqüência dos processos de desenvolvimento do sistema nervoso central não se modifica fundamentalmente entre os mamíferos. A diferença mais marcante é encontrada nos tempos de maturação de cada região e do conjunto delas em relação ao nascimento, ver (Morgane et al, 2002) para revisão. Em roedores, por exemplo, o desenvolvimento cerebral, em especial o desenvolvimento dos neurônios hipocámpais é predominantemente pós-natal. Nesse período os sistemas responsáveis pelo processamento cognitivo estão mais suscetíveis a prejuízos causados por fatores ambientais. Em humanos estima-se que a aceleração do crescimento cerebral começa por volta do terceiro trimestre de gestação e termina no segundo ou terceiro ano de vida, tendo-se, portanto, um período pré e outro pós-natal, como pode ser visto na figura 1 (Morgane et al, 2002).

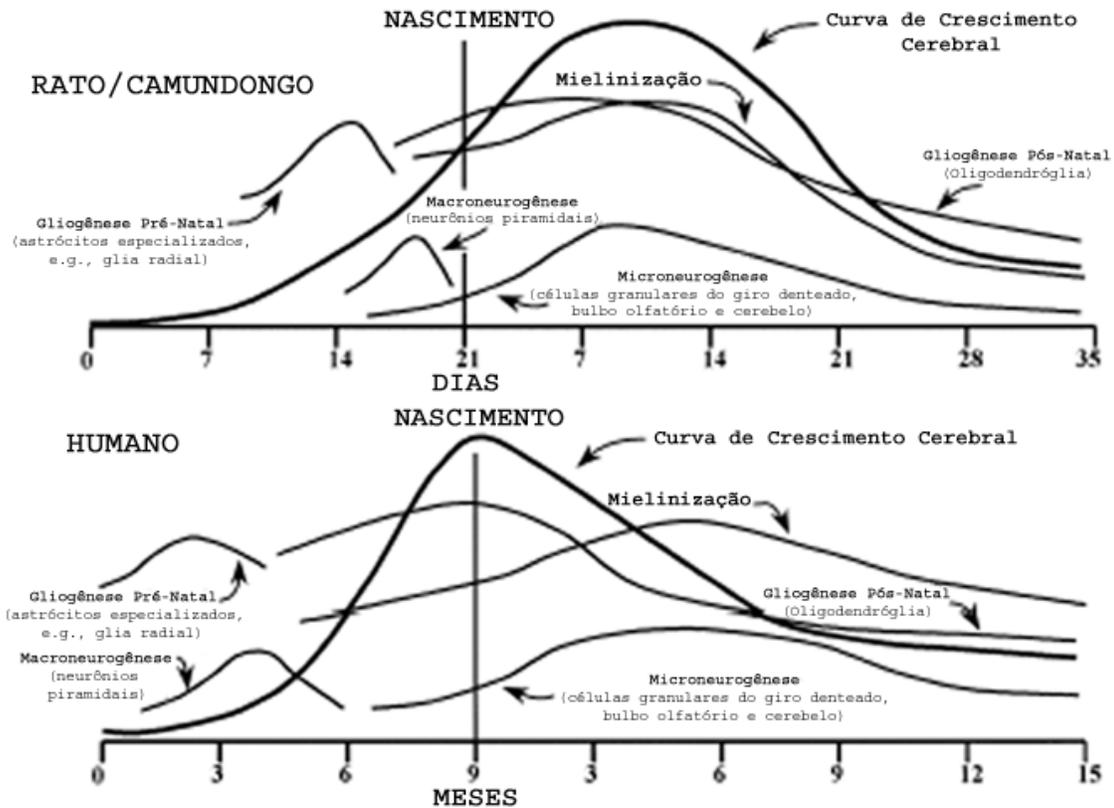


Figura 1: Curvas representando o desenvolvimento encefálico nos períodos pré e pós-natal em roedores e humanos, comparando a duração de cada evento. A curva de crescimento cerebral representa as taxas de mudança no peso encefálico em relação ao peso do encéfalo adulto. Nos humanos o desenvolvimento precoce das células piramidais e astrócitos levam a uma aquisição de 27% do peso encefálico em relação ao adulto ao nascimento enquanto que em roedores, aproximadamente 12% do peso encefálico é alcançado ao nascimento, e nestes últimos as curvas de crescimento são predominantemente pós-natais. Adaptado de Morgane *et al*, 2002.

As seqüências de eventos plásticos que ocorrem no sistema nervoso central no início do desenvolvimento são primeiramente determinadas pelo genoma, porém essa regulação genética sofre influências de fatores nutricionais. Essa consideração é de especial importância para os uso de modelos animais para examinar os processos cerebrais afetados pela subnutrição, ver (Morgane et al, 2002) para revisão.

No que concerne a áreas específicas ligadas ao desenvolvimento cognitivo, tem sido demonstrado que a subnutrição afeta o crescimento cerebral interferindo na taxa de divisão celular com redução do número total de células hipocampais em CA1 e um decréscimo no volume da camada piramidal do subiculum em ratos (Lister et al, 2005), demonstrando a vulnerabilidade dos componentes-chave do circuito trissináptico hipocampal, um circuito essencial para a memória e o aprendizado.

Uma vez que o período de crescimento neuronal do hipocampo em roedores se dá predominantemente nas primeiras semanas pós-natais, danos ocorridos nessa fase por deficiência de nutrientes podem se dar em caráter permanente mesmo após um período de reabilitação nutricional (Jorgenson et al, 2003). Esses danos, no que concerne à formação hipocampal, incluem alteração dos circuitos neurais e da plasticidade, com déficits comportamentais que se refletem no aprendizado de longa duração envolvendo sistemas de interneurônios gabaérgicos (Bronzino et al, 1997; Morgane et al, 2002).

O leite materno, principal fonte de nutrientes durante o período pós-natal precoce, reúne em sua composição ácidos graxos de cadeia longa (presentes em grandes quantidades no cérebro e retina), hormônios, peptídeos biologicamente ativos e fatores tróficos que influenciam no crescimento cerebral (Gordon, 1997). Em testes de inteligência feitos com crianças entre sete e oito anos de idade, aquelas que foram alimentadas com leite materno nas primeiras semanas de vida tiveram resultados significativamente melhores nos testes do que aquelas que não foram alimentadas com leite materno (Gordon, 1997). Isso demonstra a importância da amamentação nos primeiros estágios de vida para o desenvolvimento cerebral em humanos. Animais submetidos igualmente à subnutrição por redução de oferta de leite materno em ninhadas grandes durante os períodos de rápido desenvolvimento cerebral apresentam dificuldades para adquirir certas habilidades (Gordon, 1997).

Tem sido demonstrado experimentalmente que os ácidos graxos de cadeia longa, presentes no leite materno, especialmente no período perinatal, são necessários para a manutenção das concentrações e atividade de diversos fatores

importantes no aprendizado e memória, como o óxido nítrico, *ras*, insulina e diversos neurotransmissores e citocinas, e para o crescimento e desenvolvimento encefálico normais (Das, 2003). Os ácidos graxos de cadeia longa presentes no leite materno parecem ser essenciais para o desenvolvimento normal e para a memória, estando envolvidos com a modulação da acuidade visual, maturação neuronal, regulação do metabolismo energético, modulação dos processos de LTP, plasticidade sináptica e aumento das taxas de aprendizado em animais experimentais, ver (Das, 2003) para revisão. A suplementação com esses nutrientes tem demonstrado efeitos benéficos no desenvolvimento cerebral, aprendizado e memória (Makrides et al, 1995).

Evidências recentes demonstram que o déficit nutricional nos estágios iniciais de vida leva igualmente à redução nos níveis de proteína CREB (um importante fator de transcrição nos mecanismos de LTP) na região CA1 hipocampal, e diminuição na taxa de fosforilação da mesma proteína, com déficits na aquisição de aprendizado espacial associada à perda neuronal no hipocampo (Huang et al, 2003). Esses dados demonstram que estados de carência nutricional causam distúrbios nas cascatas de transdução de sinal responsáveis pelos mecanismos de aprendizado e memória. A consolidação hipocampal da memória requer síntese protéica (Guzowski et al, 2000), mediada pela ativação da proteína CREB, que por sua vez ativa os genes de transcrição. Na ausência ou deficiência de substrato para tal síntese, logicamente o processo será prejudicado.

A má nutrição afeta também diversos parâmetros da plasticidade sináptica como a transdução de sinal pela proteína G, a fosforilação de proteínas sinápticas e a taxa de ligação de neurotransmissores (Rotta et al, 2002), assim como diminui a velocidade de condução e a resposta à estimulação das vias motoras, com redução da excitabilidade dos neurônios corticoespinhais, associadas aparentemente à redução da mielinização e do diâmetro das fibras (Quirk et al, 1995). Ainda, a má nutrição contribui para a alteração da morfologia dendrítica das células piramidais corticais em ratos (Cordero et al, 2003) e em humanos (Benitez-Bribiesca et al, 1999).

1.2 - Atividade física e Neuroproteção

Tem sido amplamente demonstrado que a atividade física regular exerce efeitos benéficos sobre o sistema nervoso central, podendo induzir mudanças morfológicas e comportamentais e atuar como fator de neuroproteção. Algumas das mudanças morfológicas que têm sido descritas como consequência de diferentes modalidades de exercício incluem aumento da arborização dendrítica, aumento de densidade de espinhas dendríticas, da densidade neuronal, da gliogênese, da neurogênese, da angiogênese e da sinaptogênese (Black et al, 1990; Comery et al, 1996; Kleim et al, 1997; Farmer et al, 2004; Uysal et al, 2005). Durante o envelhecimento diversos estudos em humanos e animais apontam efeitos benéficos da atividade física regular para a saúde em geral e para a função cognitiva em particular, retardando os efeitos deletérios do envelhecimento, ver (Cotman e Berchtold, 2002) para revisão. Estudos recentes com modelos animais têm sido direcionados ao entendimento das bases neurobiológicas desses benefícios.

Sabe-se atualmente que diversas modalidades de exercício físico acarretam benefícios moleculares, anatômicos e comportamentais ao sistema nervoso (van Praag *et al*, 1999; Cotman e Berchtold, 2002; Will *et al*, 2004). Existe um número considerável de estudos empregando diversos modelos de atividade física no sentido de investigar suas influências sobre o sistema nervoso central. Desses, diversos estudos indicam que o exercício físico aeróbico (*e.g.* rodinha de correr ou esteira) promove um aumento nos níveis de fatores neurotróficos como BDNF, NGF, GDNF, FGF-2 e neurotrofina 3 (Neeper *et al*, 1995; Cotman e Berchtold, 2002; Kleim *et al*, 2002; Johnson e Mitchell, 2003; Johnson *et al*, 2003; Vaynman *et al*, 2003; Pietropaolo *et al*, 2004). A periodicidade do exercício é um fator importante para que o mesmo possa exercer efeitos benéficos sobre o organismo.

Existem evidências de que um pequeno período de atividade física promove um aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio e espécies

nitrogenadas e que a regularidade nos períodos da atividade leva a um aumento da resistência das células a danos oxidativos, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo (Radak et al, 1999; Radak et al, 2001).

Também tem sido demonstrado que níveis elevados de atividade física acabam por exercer influência prejudicial, promovendo um aumento da vulnerabilidade neuronal (Ramsden et al, 2003), o que demonstra a importância da prática de atividade física de forma regular e moderada.

No hipocampo, um dos benefícios mais referidos está relacionado à atividade física regular na rodinha de correr para roedores, o que promove aumento na taxa de neurogênese no giro denteado (van Praag et al, 1999; van Praag et al, 1999; Rhodes et al, 2003). Ocorre também um aumento no fluxo sanguíneo independente da pressão arterial sistêmica, aparentemente mediado por produção de óxido nítrico (Kimura et al, 1994; Nakajima et al, 2003), aumento na atividade das células piramidais do hipocampo (Czurko et al, 1999), aumento na densidade neuronal em CA1 e CA3 (Uysal et al, 2005), manutenção dos níveis de proteínas relacionadas à plasticidade neuronal, como a proteína GAP (Growth Associated Protein) e a sinaptofisina (Chen et al, 1998).

Lee e colaboradores (Lee et al, 2005), em estudo utilizando o modelo de exercício físico em esteira, demonstraram que a atividade física em diversos níveis de intensidade recupera os níveis de expressão das sintases do óxido nítrico no hipocampo de animais que sofreram privação alimentar na fase adulta. Outros estudos indicam que o exercício físico atua também como moderador da atividade nitrérgica em outras áreas do encéfalo, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (DiCarlo et al, 2002). A regulação que acontece em nível hipocampal, ligada aos benefícios cognitivos proporcionados pelo exercício físico, é evidente em testes de aprendizado espacial que são hipocampo-dependentes (Anderson et al, 2000).

Em humanos, o exercício físico tem demonstrado promover a manutenção da função cognitiva durante o envelhecimento (Kramer *et al*, 1999; Colcombe e Kramer, 2003; Kramer *et al*, 2003; Tomporowski, 2003). No estriado, uma estrutura-chave localizada no telencéfalo basal, que participa ativamente do

processamento motor, assim como no córtex motor, o exercício físico induz angiogênese, liberação de neurotrofinas, assim como promove aumento da capacidade metabólica (McCloskey et al, 2001; Kleim et al, 2002; Swain et al, 2003; Ding et al, 2004). Lee e colaboradores (Lee et al, 2003) em um elegante trabalho demonstraram que o exercício físico reduz as taxas de morte neuronal em modelos animais de hemorragia induzida no estriado, aparentemente por inibição da caspase 3, reduzindo significativamente a área da lesão estriatal em relação aos animais utilizados como controle.

O estresse oxidativo tem sido apontado como um dos maiores fatores de risco, fator primário e agravante para as doenças neurodegenerativas (McLellan et al, 2003; Katayama et al, 2004). Sabe-se que existe um aumento na vulnerabilidade ao estresse oxidativo em função da idade (Shin et al, 2002) assim como existe uma redução dos níveis de antioxidantes endógenos durante o envelhecimento. O exercício físico regular aparentemente age como fator neuroprotetor durante o processo de envelhecimento, diminuindo os danos causados pelo estresse oxidativo (Radak et al, 2001), provavelmente através de mecanismos que promovem um aumento da resistência celular a danos oxidativos que comprometem o DNA e proteínas (Radak et al, 1999), promovendo melhora no desempenho cognitivo que é prejudicado durante o envelhecimento (Kramer et al, 1999). É razoável, portanto, sugerir que o exercício físico regular age como fator de neuroproteção em doenças neurodegenerativas, uma vez que os danos causados pelo estresse oxidativo no encéfalo guardam relação direta com o desenvolvimento dessas doenças.

Diversos estudos têm indicado efeitos neuroprotetores do exercício contra danos neuronais, provavelmente por um aumento nos níveis de fatores neurotróficos endógenos (Ang et al, 2003), apresentando também efeitos positivos sobre o processo de progressão da patologia de Alzheimer (Adlard et al, 2005), retardando o processo de progressão da doença. Outras evidências indicam também que o exercício físico voluntário aumenta a expressão de BDNF no hipocampo de camundongos, expressão que decresce em função da idade (Vaynman et al, 2004). O aumento da expressão do BDNF atua favorecendo a

plasticidade sináptica e melhorando o desempenho dos animais de experimentação na aquisição de aprendizado em testes de memória hipocampo-dependentes (*e.g.* Morris Water Maze). Sob condições de inibição do BDNF, os níveis de desempenho nos testes dos animais experimentais cai, igualando-se aos níveis de aprendizado de animais sedentários (Vaynman et al, 2004), demonstrando que os efeitos benéficos da atividade física regular sobre os mecanismos de aprendizado e memória aparentemente estão ligados à regulação da expressão de fatores neurotróficos que a mesma atividade promove.

Outros estudos apontaram também para um aumento da neurogênese e da eficácia sináptica em animais que praticaram exercício voluntário por períodos regulares obtidos em testes de aprendizado de memória espacial com resultados cognitivos aumentados em comparação aos animais que não se exercitaram (van Praag et al, 1999; van Praag et al, 1999; Anderson et al, 2000). O exercício físico regular tem efeitos a longo prazo, induzindo um aumento na expressão de genes relacionados à atividade neuronal, estrutura e plasticidade sináptica (Tong et al, 2001; Molteni et al, 2002; Farmer et al, 2004); ver (Cotman e Berchtold, 2002) para revisão; com melhores resultados após um longo período de prática periódica da atividade (Molteni et al, 2002).

1.3 - Estriado, Hipocampo, Atividade Física e Cognição

No presente trabalho estudamos a influência da subnutrição sobre a atividade nitrérgica no hipocampo e estriado de animais experimentais, assim como a influência do exercício físico como agente recuperador das possíveis alterações encontradas. Investigamos também a influência da subnutrição e da atividade física voluntária sobre o desempenho no teste de aprendizado de memória espacial (labirinto aquático de Morris).

Por essas razões, o estriado e o hipocampo, estruturas-chave nos processos cognitivo e motor, objeto de investigação no presente trabalho, merecerão consideração um pouco mais detalhada a seguir.

1.3.1 Estriado, atividade motora e memória espacial

Localizado no telencéfalo basal, o estriado, composto pelos núcleos caudado e putâmen, é o maior complexo nuclear dos núcleos da base. Recebe aferências corticais, talâmicas e de núcleos do tronco cerebral (Shepherd, 1990). Aferências corticais e da substância negra são recebidas pelos neurônios de projeção espinhosos, que, juntamente com os interneurônios estriatais, estão envolvidos com o processamento de informações provenientes de várias regiões do encéfalo. O núcleo caudado recebe e processa informações oriundas do sistema límbico, córtex cingulado, córtex associativo e núcleos talâmicos, enquanto que o putâmen recebe projeções oriundas dos córtices sensoriais, áreas motoras, pré-motoras, áreas associativas do córtex auditivo e área visual secundária (Purves, 2001).

A alça motora dos núcleos da base, envolvida diretamente com o controle motor, tem sua origem nas aferências do córtex motor para o putâmen, que projeta seus axônios para o globo pálido interno, o principal ponto de eferência dos núcleos da base, para o núcleo ventral lateral e finalmente para o córtex motor (Shepherd, 1990). O óxido nítrico parece desempenhar importante papel na modulação do comportamento motor, interferindo na neurotransmissão estriatal. Os neurônios estriatais recebem uma grande variedade de *inputs* sinápticos oriundos de diferentes áreas. As aferências das áreas corticais e do tálamo representam a maior fonte de neurotransmissores excitatórios para o estriado. A via negroestriatal e circuitos intrínsecos são as fontes estriatais de dopamina, acetilcolina, óxido nítrico e GABA (Wichmann e DeLong, 1996). Esses sistemas de neurotransmissores interagem na regulação da transmissão sináptica no estriado.

O óxido nítrico parece afetar a atividade estriatal através de interações com canais dependentes de ligantes químicos nos neurônios espinhosos estriatais, agindo através de segundo mensageiro nos neurônios de projeção estriatais. Uma via intracelular do óxido nítrico bem descrita na literatura é a ativação da guanilil

ciclase solúvel (sGC), que aumenta a concentração intracelular de guanilil monofosfato cíclico (cGMP), e a conseqüente estimulação da proteína cinase cGMP dependente, mecanismo molecular presente no processo da potenciação de longa duração (LTP). Os neurônios de projeção estriatais contém altas concentrações de sGC, o que sugere sua interação com o óxido nítrico produzido pelas células nitrérgicas no estriado (NADPH-d positivas); ver (Calabresi et al, 2000; Del Bel et al, 2005) para revisão. Estas vias de segundo mensageiro podem estar envolvidas com a depressão de longa duração (LTD) e a potenciação de longa duração (LTP) estriatal, uma vez que os neurônios NADPHd positivos possuem receptores para glutamato (East et al, 1996) e recebem sinapses glutamatérgicas dos neurônios espinhosos respondendo com LTD (Calabresi et al, 1999) e LTP (Doreulee et al, 2003) após estimulação tetânica das aferências corticoespinhais.

Existe igualmente evidência acumulada de que o complexo estriatal contribui para a memória espacial (Packard, 1999; Roullet *et al*, 2001; Ragozzino e Choi, 2004; Schmitzer-Torbert e Redish, 2004) e que sua interação com o hipocampo é importante para tal contribuição (Gengler et al, 2005). Estudos empregando registro unitário no estriado dorsal revelaram que neurônios localizados nessa área estão envolvidos na codificação de informação espacial. Esses neurônios têm propriedades semelhantes às das células de lugar (*place cells*) do hipocampo, que disparam durante a execução de tarefas espaciais (Ragozzino *et al*, 2001; Schmitzer-Torbert e Redish, 2004). À medida que as memórias relacionadas a essas atividades são formadas e consolidadas, uma cascata de eventos intracelulares envolvendo uma variedade de moléculas sinalizadoras é desencadeada, resultando em última instância na ativação de genes e síntese de proteínas para formação de memória a longo prazo. Genes de ativação precoce do tipo c-fos e c-jun são rapidamente ativados de forma transitória em resposta à ativação dos muitos tipos celulares estimulados servindo como marcadores dessa ativação decorrente da experiência em curso (Teather et al, 2005). No caso específico do estriado e hipocampo e sua relação com a formação de memória espacial, tem sido sugerido que o hipocampo está associado com memória

cognitiva e que o estriado está associado com memória do tipo estímulo-resposta (memória de hábito).

Estudos acerca dos papéis seletivos do hipocampo e do estriado dorsal nas memórias cognitiva e de hábito têm empregado diversas metodologias; ver (Packard e Knowlton, 2002) para revisão. Alguns desses estudos sugeriram um papel dissociado do estriado dorsal no aprendizado de hábito do sistema de memória declarativa do lobo temporal medial que inclui o hipocampo como componente primário. Evidências sugerem que durante o aprendizado, o estriado e os sistemas de memória do lobo temporal medial são ativados simultaneamente, atuando numa interferência competitiva em algumas situações de aprendizado; ver (Packard e Knowlton, 2002) para revisão.

Voermans e colaboradores (Voermans et al, 2004), empregando estudos de neuroimagem funcional em humanos durante a exploração de ambientes virtuais, verificaram que o hipocampo e o estriado dorsal exercem funções distintas porém complementares, indicando que ambos os sistemas estão envolvidos na memória de navegação, e que o envolvimento de ambos os sistemas depende da estratégia utilizada pelo indivíduo durante a navegação em um determinado ambiente. O hipocampo e o estriado dorsal podem estar ativos seqüencialmente durante o treino ou a familiarização a um dado ambiente. Aparentemente, o hipocampo gerencia representações mais flexíveis do ambiente, fazendo uma representação neural de uma espécie de mapa do ambiente, enquanto que o estriado gerencia aprendizados mais inflexíveis, como seguimento de rotas (Voermans et al, 2004). O envolvimento sucessivo dos dois sistemas varia de acordo com o estado de proficiência do animal na navegação, e, em alguns casos, pode ocorrer uma compensação por parte do sistema hipocampal a danos ocorridos no estriado, mantendo o nível de desempenho (Hartley e Burgess, 2005).

Existem evidências de que a subnutrição nas primeiras fases de vida tem como resultados a indução de hiperatividade e alterações no sistema dopaminérgico estriatal (Alamy et al, 2005).

Tem sido amplamente demonstrado que o óxido nítrico desempenha papéis importantes na circuitaria estriatal. Doreulee e colaboradores (Doreulee et

al, 2003) demonstraram que o óxido nítrico tem papel funcional importante para a gênese da LTP no estriado, através da indução de mutação no gene codificador de uma das enzimas de síntese do óxido nítrico. Os animais mutantes deficientes de óxido nítrico apresentaram uma redução dramática da LTP no estriado em relação aos animais controle, evidenciando que o óxido nítrico desempenha papel fundamental nos processos plásticos no complexo estriatal. O óxido nítrico regula a atividade basal e a responsividade dos neurônios dopaminérgicos no estriado (West e Galloway, 1998), desempenhando um importante papel na integração da informação das vias estriatais envolvidas no comportamento motor. Em modelos mutantes de discinesia paroxística, a densidade de neurônios que apresentaram imunoreatividade para as sintases do óxido nítrico apresentou redução drástica no estriado dos animais mutantes em relação aos controles, principalmente durante a fase crítica na qual os episódios de distonia se apresentavam mais frequentes (Sander et al, 2006).

1.3.2 Hipocampo, atividade motora voluntária e cognição

O hipocampo se divide em quatro regiões, designadas cornos de Amon (CA1, CA2, CA3 e CA4), por causa da sua forma. O giro denteado, subiculum e córtex entorrinal constituem a forma mais geral, chamada formação hipocampal ou região hipocampal (Shepherd, 1990). Os principais inputs hipocampais provêm do córtex entorrinal, região do septo, e hipocampo contralateral. Outras projeções importantes que alcançam o hipocampo são projeções do hipotálamo, córtices, tálamo e amígdala.

Os elementos neuronais da formação hipocampal são células piramidais e granulares, porém as células piramidais constituem a maior parte das unidades celulares hipocampais. O circuito hipocampal é basicamente trisináptico, com projeções vindas do córtex entorrinal chegando ao giro denteado pela via perfurante e estabelecendo sinapses com as células granulares do giro denteado, que por sua vez projetam fibras chamadas fibras musgosas (por possuírem varicosidades) que fazem sinapses com os neurônios piramidais de CA3, que

projetam seus axônios (colaterais de Schaffer) para as células piramidais de CA1, que são o principal output hipocampal, enviando axônios através do subiculum de volta ao córtex entorrinal e para o hipocampo contralateral pelo fórnix (Shepherd, 1990); ver (Sweatt, 2004) para revisão; encerrando o principal circuito hipocampal. O córtex entorrinal recebe e envia ao hipocampo a maior parte de *inputs* sensoriais advindos de diversas áreas corticais, atuando como o principal *input* hipocampal.

A reação histoquímica para NADPH-diaforase no hipocampo revela um padrão laminar bem definido, como pode ser visto na figura 2, e coincide com o padrão laminar encontrado na coloração de Nissl. As camadas hipocampais definidas pela coloração são o estrato oriens, o estrato piramidal, o estrato radiado e o estrato lacunoso molecular em CA1. Em CA3, define-se também o estrato lúcido (não mostrado na figura), que se distingue entre o estrato radiado e o estrato piramidal nessa área. O estrato oriens é a camada mais dorsal e onde se encontram os axônios dos neurônios piramidais. O estrato piramidal contém os corpos celulares das células piramidais, cujos dendritos se situam na camada encontrada logo abaixo, que corresponde ao estrato radiado. É nessa camada que ocorrem as sinapses das fibras musgosas e dos colaterais de Schaffer em CA3 e CA1, respectivamente. As camadas estrato lacunoso molecular e camada molecular do giro denteado definem as margens da fissura hipocampal, atravessada por vasos calibrosos, aparentemente responsáveis pelo controle do fluxo sanguíneo no hipocampo. As camadas a seguir de situação mais ventral são as camadas granular e polimórfica do giro denteado. Existe um corpo crescente de evidências acerca da ocorrência de neurogênese na fase adulta na camada granular do giro denteado. Essa neurogênese parece desempenhar um papel-chave nos mecanismos de aprendizado e memória, e está sujeita a influências ambientais benéficas ou não, que se refletem a nível cognitivo em animais experimentais (Bruehl-Jungerman et al, 2005; Karten et al, 2005; Chen et al, 2006; Leuner et al, 2006; Xu et al, 2006).

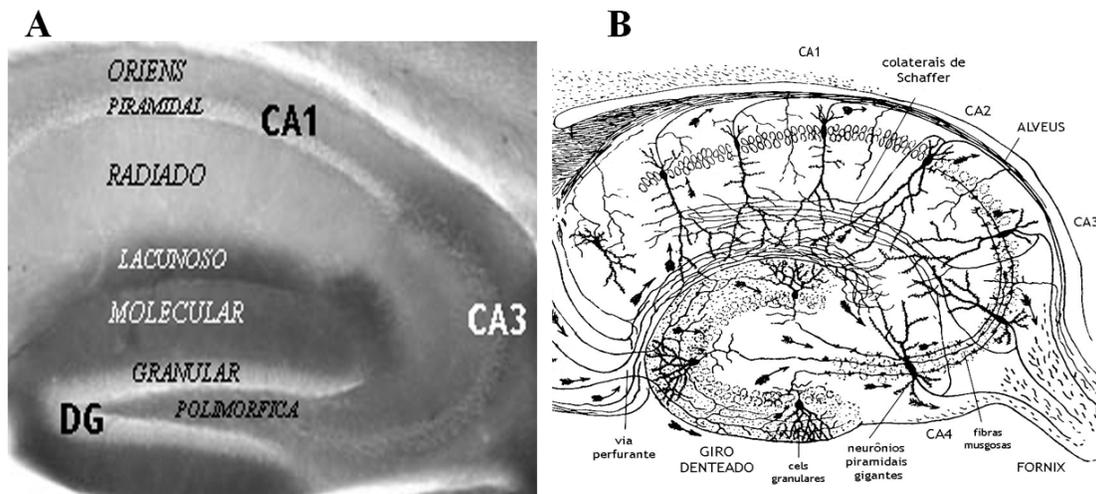


Figura 2: (A) Fotomicrografia do hipocampo corado pela histoquímica para NADPH-diaforase, mostrando a clara definição do padrão laminar conferido pela histoquímica. (B) Desenho esquemático do hipocampo mostrando os principais elementos neuronais encontrados em cada área hipocampal. Note o detalhamento dos circuitos sinápticos hipocâmpais e a localização em relação às camadas. Adaptado de Cajal, 1911 *apud* Brown e Zador, 1990.

O papel mais conhecido do hipocampo nos mecanismos de aprendizado e memória é o de consolidação da memória de longo prazo, através da potenciação de longo prazo, ou LTP (Long-Term Potentiation), que depende de óxido nítrico (ON) para sua indução e manutenção (Holscher, 1997; Huang, 1997; Haley, 1998; Hawkins *et al*, 1998; Wheal *et al*, 1998; Yamada, 1998; Zorumski e Izumi, 1998). Os processos de aprendizado e consolidação de memória que ocorrem no hipocampo são dependentes de óxido nítrico, tendo em vista que sob condições de inibição das sintases do óxido nítrico (SON), suas enzimas de síntese, a participação hipocâmpal nos processos de consolidação de aprendizado é inibida ou anulada (Mogensen *et al*, 1995; Mogensen *et al*, 1995).

Um número considerável de investigações têm sido desenvolvidas no intuito de compreender os mecanismos celulares e moleculares que sustentam os processos cognitivos e especial atenção tem sido dada ao papel do hipocampo e córtices associados nesses processos. Essas investigações incluem testes

comportamentais, experimentos com lesões, administração de drogas, registros eletrofisiológicos *in vivo*, assim como estudos de mudanças moleculares do hipocampo após treinamento e manipulações genéticas (Izquierdo et al, 1999; Dragoi et al, 2003; Lynch, 2004; Nakazawa et al, 2004; Steffenach et al, 2005). As conexões hipocampais com diversas áreas sensoriais e de associação através dos córtices entorrinal e perirrinal também evidenciam o envolvimento hipocampal no processamento geral da informação.

O hipocampo está funcionalmente interconectado com o córtex prefrontal; ver (Sweatt, 2004) para revisão; e essa integração também sugere uma participação do hipocampo na cognição em geral. Outro fato que sustenta a hipótese de que o hipocampo está diretamente envolvido com os processos de aprendizado é a neurogênese que permanece no cérebro adulto e que parece ser importante para a manutenção da função hipocampal normal (Eriksson et al, 1998; Snyder et al, 2005). A neurogênese que ocorre no giro denteado parece estabelecer ligação direta com os processos de plasticidade neuronal no hipocampo, sendo importante ferramenta para a função hipocampal nos mecanismos de aprendizado e memória. A presença de novos neurônios parece ser necessária para a função normal dessa região no encéfalo, estando diretamente ligada à plasticidade sináptica (Derrick et al, 2000; Snyder et al, 2001; Madsen et al, 2003; Snyder et al, 2005), aparentemente desempenhando papel nos mecanismos de aprendizado espacial (Snyder et al, 2005). Animais que sofreram inibição dessa proliferação neuronal (o que pode ocorrer, por exemplo, por efeito de irradiação) apresentaram déficits na aquisição de aprendizado de testes hipocampo-dependentes, com perda da capacidade de reconhecimento de locais e objetos (Madsen et al, 2003), e obtiveram prejuízo na memória espacial de longa duração (Snyder et al, 2005). Alguns casos em humanos submetidos a procedimentos profiláticos de irradiação no intuito de bloquear possíveis metástases no sistema nervoso central de determinados tipos de câncer, os efeitos colaterais do tratamento incluem prejuízo de memória, disforia e letargia. Tem sido demonstrado que diversas “tarefas” necessárias à sobrevivência de um animal em um determinado ambiente são dependentes da participação hipocampal

para sua execução, tais como a organização temporal entre eventos, localização espacial e estabelecimento de relações entre objetos no ambiente (Sweatt, 2004).

Um dos papéis mais bem documentados do hipocampo, além de seu papel na consolidação da memória de longo prazo pelo processo da potenciação de longa duração (LTP: *Long-Term Potentiation*), que discutiremos de forma mais detalhada posteriormente, é a participação hipocampal na localização espacial.

1.3.2.1 As células de localização espacial (place cells)

No presente trabalho pretende-se investigar possíveis déficits cognitivos espaciais associados ao hipocampo decorrentes de subnutrição induzida durante o desenvolvimento pós-natal e para isso é importante nos determos um pouco acerca do papel funcional do hipocampo na memória espacial. O indicativo de que o hipocampo está relacionado a esse papel é o declínio da cognição espacial em animais submetidos a lesões hipocampais (Steffenach et al, 2005).

As células de localização espacial são neurônios piramidais hipocampais, localizados mais precisamente em CA1, CA3 e no córtex entorrinal. Evidências indicam que as células espaciais localizadas em CA1 parecem estar mais ligadas ao processamento de informações espaciais em tempo real, enquanto que as células espaciais de CA3 parecem estar envolvidas com os processos de consolidação da memória espacial a longo prazo (Hartley et al, 2005).

As células de localização espacial formam no hipocampo uma espécie de mapa topográfico do ambiente que cerca o animal. Para cada ponto do espaço em uma determinada orientação, uma célula ou um grupo de células dispara potenciais em resposta a esse estímulo, fazendo com que o animal construa uma representação do espaço a partir do grau de disparo dessas células.

O ponto no espaço para o qual uma célula ou um grupo de células apresenta disparos de potenciais é chamado de campo de localização espacial.

Durante a exploração de um novo ambiente, quando o animal ainda está em processo de reconhecimento e construção da representação espacial do mesmo, a atividade das células de localização espacial é influenciada por uma

variedade de fatores, como a geometria do ambiente, a detecção de objetos que são utilizados como pistas visuais, suas cores, odores e o estado interno do animal (Chakraborty et al, 2004); ver (Poucet et al, 2003) para revisão. Baseado nessas pistas, o animal cria o contexto do espaço que o cerca.

O mapeamento de um determinado ambiente é feito seguindo um padrão hierárquico de pistas a serem utilizadas como referencial. Os primeiros estímulos que um animal busca em um determinado ambiente como ponto de localização espacial são estímulos visuais (Poucet et al, 2003). Na ausência de pistas visuais, o animal busca orientar-se por outras pistas do contexto espacial que possam servir como marcos para sua localização no ambiente.

Em um ambiente com limites circulares, e estando o animal desprovido de pistas visuais e outros estímulos como odor ou pistas auditivas, ele passa a ser orientado pelo senso interno de direção, composto por pistas “idiotéticas” (Chakraborty et al, 2004). Pistas idiotéticas consistem em informações oriundas de aferências motoras, proprioceptivas, vestibulares e de fluxo ótico.

As células de localização espacial exibem uma seletividade de disparos. Cada célula dispara preferencialmente quando o animal se encontra em um determinado ponto no espaço e em uma determinada direção. É o conjunto e o padrão de disparos de uma determinada população de células que codifica a localização espacial e direção na qual o animal se encontra (Mizumori, 2006).

Ao ocorrerem mudanças no ambiente, as células de localização espacial reorganizam seus padrões de disparo, num fenômeno chamado de remapeamento. O processo de remapeamento nas células de localização espacial ocorre através de mudanças nos padrões de disparo e nas conexões sinápticas, estabelecendo novos campos de disparo das células de localização espacial em resposta às mudanças ambientais.

O aprendizado de localização espacial, assim como o remapeamento dos campos de localização espacial em resposta a uma modificação no ambiente são processos dependentes de um mecanismo específico de plasticidade sináptica, a Potenciação de Longa Duração (LTP), que detalharemos a seguir. Dragoi e colaboradores (Dragoi et al, 2003) em um elegante trabalho demonstraram

claramente a ligação entre reforço sináptico associado à LTP e aprendizado espacial, demonstrando que a indução da LTP causa alterações na representação hipocampal do espaço. Discutiremos a seguir o papel da LTP nos mecanismos de aprendizado e memória e a importância do óxido nítrico (foco do presente trabalho) nesses processos.

1.3.2.2 - A potenciação de longa duração (LTP)

Os correlatos eletrofisiológicos da plasticidade neural são a Potenciação de Longa Duração (LTP - do inglês Long-Term Potentiation) e a Depressão de Longa Duração (LTD – do inglês Long-Term Depression). Entretanto, uma vez que temos como uma das variáveis em estudo a taxa de aprendizado de memória espacial, que é dependente da LTP no hipocampo, e como a LTP e a LTD são dependentes de óxido nítrico (variável importante no presente trabalho) para seu estabelecimento no hipocampo e estriado (Hawkins *et al*, 1998; Calabresi *et al*, 1999; Bon e Garthwaite, 2001), discutiremos brevemente acerca do papel da LTP no aprendizado e memória e o papel do óxido nítrico nesses processos.

Em 1913, Cajal originalmente hipotetizou que o armazenamento das informações dependia das mudanças na configuração das conexões sinápticas entre os neurônios ativos. Donald Hebb em 1949 manteve essa hipótese, e propôs que se dois neurônios são ativados ao mesmo tempo, a eficiência sináptica seria ampliada (Shepherd, 1990). A evidência veio em 1973, quando Timothy Bliss e Terje Lomo publicaram a descoberta do fenômeno chamado Potenciação de Longo Prazo (LTP); ver (Lomo, 2003) para revisão. Estudando o hipocampo de coelhos, Bliss e Lomo estimularam um conjunto de axônios na via perfurante e registraram a resposta em neurônios de outra parte do hipocampo. A surpresa veio quando, ao estimular os axônios no subiculum a altas frequências (100 estímulos por segundo), a resposta do grupo de células não só foi fortalecida como continuou fortalecida por várias horas; ver (Bennett, 2000) para revisão.

Desde então grande esforço tem sido feito no sentido de compreender o mecanismo pelo qual o reforço das conexões sinápticas é alcançado, a LTP; ver (Lynch, 2004) para revisão.

No estudo da LTP, ênfase particular tem sido dada à análise das mudanças que acompanham e dão suporte à memória espacial por causa da sua dependência hipocampal e por causa dos protocolos bem desenvolvidos que estão disponíveis para esta análise. A plasticidade sináptica dependente de atividade desempenha um papel vital em esculpir conexões sinápticas durante o desenvolvimento e tem sido identificada em diversas vias sinápticas. O sistema nitrérgico exerce um papel importante no mecanismo da LTP, tendo sido demonstrado em diversos experimentos que a LTP pode ser bloqueada por situações de inibição das sintases do óxido nítrico (SON) (Son et al, 1996), ou, no caso contrário, aumentada por ativadores ou potencializadores das SON (Chien et al, 2003). A nível molecular, a LTP é dependente da ativação do receptor metabotrópico NMDA; ver (Nakazawa et al, 2004) para revisão; acoplado à sintase do óxido nítrico cálcio/calmodulina dependente, que, quando ativado, causa um aumento no influxo de cálcio na célula, formando o complexo cálcio/calmodulina, que ativa a produção de óxido nítrico pela enzima. As altas taxas de difusão do óxido nítrico permitem que ele funcione como uma rápida molécula de sinalização intercelular, e, segundo a hipótese do mensageiro retrógrado, a especificidade sináptica pode ser conferida pelo óxido nítrico que modifica somente aqueles terminais que estiveram recentemente ativos, aumentando a liberação de neurotransmissores pela membrana pré-sináptica; ver (Larkman e Jack, 1995; Medina e Izquierdo, 1995) para revisão.

A primeira evidência do papel do óxido nítrico na LTP vem de grupos independentes mostrando que inibidores das sintases do óxido nítrico, como a L-nitroarginina, bloqueiam a geração da LTP (Xiaojuan et al, 1998). A injeção de inibidores das sintases do óxido nítrico nas células piramidais de CA1 inibem a LTP pré-sináptica, indicando que o óxido nítrico é produzido pós-sinápticamente e serve provavelmente como mensageiro retrógrado; ver (Medina e Izquierdo, 1995) para revisão. Da mesma forma, a aplicação de óxido nítrico ou de um

potencializador de seu efeito é capaz de gerar ou aumentar a LTP (Bon e Garthwaite, 2001; Chien *et al*, 2003).

1.4 - O óxido nítrico, suas enzimas de síntese e seu papel na plasticidade neural durante o desenvolvimento.

O óxido nítrico é um gás que, por ser hidro e lipossolúvel, tem grande facilidade de se difundir através dos tecidos e é produzido por uma família de enzimas presentes na maior parte das células. A distribuição do óxido nítrico pelo organismo indica sua participação em uma ampla variedade de processos fisiológicos. No sistema nervoso, sua relevância se deve aos efeitos fisiológicos gliais, neuronais e vasculares. Age como neuromodulador, neurotransmissor anterógrado e retrógrado, atuando também no controle do fluxo sanguíneo cerebral (Wang *et al*, 2005; Wang *et al*, 2005). Sua relevância para o sistema nervoso deve-se também ao seu envolvimento em doenças neurodegenerativas, abrindo uma possibilidade para tratamentos farmacológicos direcionados às vias metabólicas do óxido nítrico; ver (Bishop e Anderson, 2005; Guix *et al*, 2005) para revisão.

Durante as fases críticas de desenvolvimento encefálico, pré e pós-natal, a expressão das SON se altera em diferentes eventos temporais, indicando um possível papel do óxido nítrico nos processos de desenvolvimento encefálico (Moritz *et al*, 1999; Chung *et al*, 2004). Recentemente foi descrito que o óxido nítrico interage com fatores neurotróficos através de uma alça de regulação recíproca entre o óxido nítrico e o BDNF (Cheng *et al*, 2003; Chen *et al*, 2006). Akassoglou (Akassoglou, 2005) descreveu a interação das vias ON/cGMP e NGF/TrKA na ausência de NGF mediando a sobrevivência neuronal.

Por ser um gás altamente difusível, se torna bastante difícil conseguir quantificar o óxido nítrico em um determinado tecido. A alternativa mais simples para localizar e quantificar os sítios de produção de óxido nítrico é medindo a expressão de suas enzimas de síntese, as Sintases do Óxido Nítrico (SON).

Existem três isoformas para as SON: a SON neuronal (SONn), que é produzida nos neurônios, a SON endotelial (SONe), produzida pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos e a SON imunológica (SONi), produzida por células gliais envolvidas com a resposta imune.

A SON neuronal é uma enzima citosólica, constitutiva, cálcio-calmodulina dependente que ocorre somente nos corpos celulares dos neurônios, dendritos e axônios. Os neurônios marcados para SON apresentam marcação para NADPH diaforase, e a SON purificada apresenta atividade diaforásica; ver (Del Bel et al, 2005) para revisão.

As isoformas neuronal e endotelial são expressas constitutivamente e ativadas brevemente pelo aumento do cálcio intracelular ligando-se à calmodulina. A isoforma induzida por macrófago não é detectada em condições normais, sendo expressada somente em condições de agressão ao sistema imunológico.

O óxido nítrico produzido pela SONn e SONe age como segundo mensageiro através da ativação da guanilil ciclase solúvel (sGC) enquanto que o óxido nítrico produzido pela SONi no sistema imune serve como agente citotóxico (Li e Poulos, 2005). Recentemente foi evidenciada a existência de uma outra isoforma da SON, a SON mitocondrial (SONmt), posteriormente identificada como SON η (Elfering et al, 2002).

O óxido nítrico parece participar ativamente nos processos de desenvolvimento cerebral e diferenciação funcional do encéfalo durante as fases críticas de desenvolvimento. Em camundongos, a reatividade para NADPH-diaforase aparece inicialmente após o 14º dia de vida pré-natal, vindo a aparecer nas áreas corticais entre o 17º e o 20º dia de desenvolvimento pré-natal, alterando seus padrões de marcação durante o período pós-natal (Oermann et al, 1999), o que reforça a hipótese de que o óxido nítrico pode estar envolvido nos processos plásticos que ocorrem no período de desenvolvimento, uma vez que sua expressão

aparentemente é regulada em períodos nos quais o desenvolvimento cerebral se dá de forma mais acelerada.

Como já foi discutido anteriormente, tem sido relatado que o óxido nítrico parece exercer influência significativa no desenvolvimento das conexões sinápticas em diversas áreas do sistema nervoso central por um mecanismo dependente de atividade. Aparentemente, o óxido nítrico atua no desenvolvimento neuronal e na modulação da diferenciação e maturação neuronal em diversas áreas, como no córtex cerebral, hipocampo e estriado. Uma das fortes evidências acerca desse papel é a distribuição das sintases do óxido nítrico que ocorre diferentemente durante as fases de desenvolvimento (Morys et al, 2002), em comparação com a distribuição dessas enzimas no encéfalo adulto (Wendland et al, 1994; Vaid et al, 1996; Burette et al, 2002; Czeh et al, 2005; Gotti et al, 2005).

Alguns estudos realizados no intuito de investigar as alterações na expressão das sintases do óxido nítrico em diversas áreas encefálicas em diversas janelas temporais demonstraram que as mesmas são expressas em diferentes níveis de intensidade, com distribuição variada no córtex, hipocampo e estriado, de acordo com o estágio de desenvolvimento, a região cerebral e a espécie (Morys et al, 2002; Blackshaw et al, 2003; Murata e Masuko, 2003; Chung et al, 2004). Essas alterações refletem um papel do óxido nítrico durante o desenvolvimento, aparentemente estando envolvido com o estabelecimento de projeções.

Chung e colaboradores (Chung et al, 2004) estudaram a distribuição dos neurônios que apresentavam imunoreatividade para a SONn durante o desenvolvimento pós natal de ratos, tendo verificado que ocorre uma modificação nos padrões de marcação no hipocampo durante o desenvolvimento. Estudando as variações na expressão da SONn e SONE em encéfalos de ratos, camundongos e humanos, Blackshaw e colaboradores (Blackshaw et al, 2003) verificaram que a expressão da SONn nas células piramidais de CA1 varia entre as espécies, tanto na distribuição espacial como na janela temporal, o que pode refletir as diferenças de estágios de desenvolvimento cerebral em relação ao tempo que varia entre as

espécies, como já citado anteriormente (Morgane et al, 2002). Essa variação ocorre em função do desenvolvimento, estando diretamente relacionada com a plasticidade sináptica óxido nítrico- dependente (LTP) (Blackshaw et al, 2003).

Fazendo as mesmas investigações no estriado de ratos, Murata e Masuko (Murata e Masuko, 2003) verificaram, utilizando marcação histoquímica para NADPH-diaforase e imunomarcação para SONn, que a expressão das SON no estriado também apresenta variações significativas durante o desenvolvimento, tendo observado marcação diaforásica no estriado a partir do 18º dia de vida pré-natal, e maior densidade neuronal por volta do 5º dia de vida pós natal, observaram também que o número de neurônios marcados pela técnica alcança seu pico de atividade nitrérgica por volta do 2º ao 3º mês de vida.

O papel do óxido nítrico nos fenômenos de plasticidade neural tem sido amplamente evidenciado através de diversos estudos, demonstrando que o óxido nítrico parece ser um elemento essencial, envolvido diretamente nos mecanismos de aprendizado e memória (Susswein et al, 2004), agindo como neurotransmissor nos processos de plasticidade sináptica (Bon e Garthwaite, 2001; Bon e Garthwaite, 2003). Aparentemente, a diminuição na expressão da SONn que ocorre em decorrência da idade parece estar diretamente ligada ao declínio cognitivo que aparece ao longo do processo de envelhecimento (Law et al, 2002), e estímulos ambientais que estimulem ou estejam envolvidos com os processos de plasticidade sináptica induzem um aumento da produção de óxido nítrico nas áreas envolvidas (Zhang et al, 1998).

Modificações no processo de formação do óxido nítrico são capazes de modular diversas condições fisiológicas e/ou patológicas no encéfalo como a LTP no hipocampo, a LTD no cerebelo, mecanismos de neurotoxicidade e de neuroproteção, etc; ver (Del Bel et al, 2005) para revisão.

A análise por densitometria óptica dos tecidos marcados pela NADPH diaforase consiste em uma técnica simples de quantificação da atividade das SON (Picanco-Diniz et al, 2004; Rocha-de-Melo et al, 2004).

A histoquímica para NADPH diaforase é uma técnica simples que se baseia na presença de uma enzima capaz de catalisar a conversão NADPH dependente dos sais solúveis de tetrazolium a produtos insolúveis e visíveis (formazan). Essa técnica permite a localização das sintases do óxido nítrico no tecido. Ela marca os sítios de produção do óxido nítrico no parênquima cerebral, obtendo-se marcação da neurópila e de uma população neuronal denominada neurônios diaforase positivos, que podem ser classificados em tipos I e II. A técnica foi descrita inicialmente em 1961 por Thomas e Pearse e posteriormente aperfeiçoada por Scherer-Singler e colaboradores em 1983 (Vincent e Hope, 1992).

Ensaio bioquímico e imunohistoquímico identificaram a NADPH diaforase neuronal como sintase do óxido nítrico, revelando que a histoquímica para NADPH diaforase é um marcador específico da produção do óxido nítrico nos neurônios (Dawson et al, 1991; Hope et al, 1991; Beesley, 1995).

No presente trabalho investigamos os efeitos da subnutrição sobre a atividade histoquímica para NADPH-diaforase no hipocampo e estriado de camundongos subnutridos no período perinatal (amamentação), e subsequentemente a influência da atividade física sobre as alterações histoquímicas apresentadas no 21º dia de vida associadas à subnutrição. Para tanto utilizamos um modelo experimental de subnutrição por alteração no tamanho da ninhada, já utilizado em outros estudos (Rocha-de-Melo et al, 2004; Maia et al, 2006).

2 - OBJETIVOS

Apesar do esforço sistemático de investigação dos efeitos dos desequilíbrios nutricionais de diversas naturezas sobre o sistema nervoso central, utilizando como modelos experimentais diversas linhagens de roedores, pouco se sabe acerca dos efeitos da subnutrição durante a fase de aleitamento sobre o sistema nitrérgico do hipocampo e estriado de camundongos antes e após a recuperação nutricional. Por essa razão, é objetivo do presente trabalho investigar:

- A influência da subnutrição perinatal sobre a histoquímica para NADPH diaforase no hipocampo e estriado aos 21 dias de vida pós-natal, quando apenas o leite materno está sendo utilizado na dieta em condições insuficientes.

- A ocorrência de recuperação nutricional por oferecimento de água e ração *ad libitum* durante o período de desenvolvimento pós-natal tardio, verificada pelo peso corporal.

- A influência da provável recuperação nutricional e do exercício físico empreendidos entre o 21º e o 58º dias pós-natais sobre a atividade histoquímica da NADPH-diaforase possivelmente alterada pela desnutrição detectada aos 21 dias.

- A influência da subnutrição perinatal e da atividade física voluntária sobre o teste hipocampo-dependente de aprendizado espacial;

- A relação entre o padrão de marcação da atividade nitrérgica e o desempenho nos testes de aprendizado.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

No presente estudo foram utilizados 24 camundongos suíços albinos machos, provenientes da colônia do biotério da UFPA. Durante todo o período de experimentos, todos os animais foram mantidos à temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12/12h, com as luzes sendo ligadas às 7:00h. Todos os experimentos foram executados de acordo com o guia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (National Institute of Health – NIH/USA), “Princípios para o Cuidado de Animais de Laboratório” (Principles of Laboratory Animal Care), para uso de animais de experimentação. Aos 21 e 58 dias de vida pós-natal, todos os animais foram pesados a fim de se verificar a diferença na condição nutricional entre os grupos.

3.2 - Grupos Experimentais

Camundongos suíços albinos fêmeas provenientes do biotério da UFPA foram colocadas para acasalamento, e depois de detectada a prenhez foram separadas em gaiolas individuais, com suprimento de água e ração balanceada para animais de laboratório (NUVILAB), *ad libitum*. A ração contém 23g de proteína/100g de ração. Cinco dias após o nascimento, os filhotes foram separados por sexo, sendo manipulada a quantidade de filhotes por nutriz.

O experimento consistia em dois grupos, sendo um grupo subnutrido, onde a oferta de leite materno era escassa, e um grupo controle, onde a oferta era adequada. O grupo subnutrido foi obtido com um número de doze filhotes por nutriz, enquanto o grupo controle foi obtido com uma ninhada de seis filhotes. Todas as nutrizas receberam água e ração *ad libitum* durante o período de amamentação (até o 21º dia de vida pós-natal das crias), a fim de garantir que a alteração do estado nutricional das crias se desse devido à maior ou menor oferta

de leite materno alterada pelo tamanho da ninhada (ver tabela 1 para informação nutricional da ração).

ALIMENTO COMPLETO PARA CAMUNDONGOS E RATOS - NUVILAB - CR1					
Níveis de Garantia		Vitaminas		Microelementos Minerais	
umidade	12,50%	A	UI 12.000	Ferro	mg 50.00
proteína bruta	22,00%	D ₃	UI 1.800	Zinco	mg 60.00
extrato etéreo	4,00%	E	mg 30.00	Cobre	mg 10.00
material mineral	10,00%	K ₃	ng 3.00	Iodo	mg 2.00
matéria fibrosa	8,00%	B ₁	mg 5.00	Manganês	mg 60.00
cálcio	1,40%	B ₂	mg 6.00	Selênio	mg 0.05
fósforo	0,80%	B ₆	mg 7.00	Cobalto	mg 1.5
Indicação: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do National Research Council e National Institute of Health - USA.		B ₁₂	mg 20.00		
		niacina	mg 6.00	Aminoácidos Aditivos	
		panotolato	mg 20.00	DL-metionina	mg 300.00
		folato	mg 1.00	Lisina	mg 100.00
		biotina	mg 0.05		
		colina	mg 600.00	Antioxidante	mg 100.00

Tabela 1. Informação nutricional da ração utilizada para alimentar as nutrizes e os animais experimentais a partir do 22º dia de vida pós-natal.

Ao término do período de amamentação (21º dia de vida pós-natal), oito animais (quatro do grupo controle e quatro do grupo subnutrido, **C₂₁** e **Sn₂₁**) foram sacrificados, e os dezesseis animais restantes foram separados de suas nutrizes, sendo colocados em gaiolas plásticas (16.5 x 32 x 39 cm), dois animais em cada gaiola, onde permaneceram até o 58º dia de vida pós-natal, com suprimento de água e ração *ad libitum*. Para cada grupo nutricional foram criados dois subgrupos: o grupo de exercício voluntário e o grupo inativo, sendo estabelecidos ao final dos experimentos dois grupos de animais de 21 dias de vida pós-natal (**C₂₁** e **Sn₂₁**, ambos de n=4), e quatro grupos de animais adultos: controle inativo (**CI** n=4), controle exercício (**CE** n=4), subnutrido inativo (**SnI** n=4) e subnutrido exercício (**SnE** n=4). A diferença entre os subgrupos inativo e exercício se deu pela presença de rodinhas de correr (12,5 cm de diâmetro) acopladas às gaiolas dos animais do grupo exercício (duas rodinhas por gaiola). Em cada rodinha foi

colocado um ciclômetro que consistia de um ímã acoplado na rodinha com um sensor magnético ativado a cada revolução da rodinha (ver figura 3). Diariamente eram aferidos a distância percorrida e o tempo de exercício realizado pelos animais. A velocidade média era igualmente estimada a partir do quociente espaço/tempo.

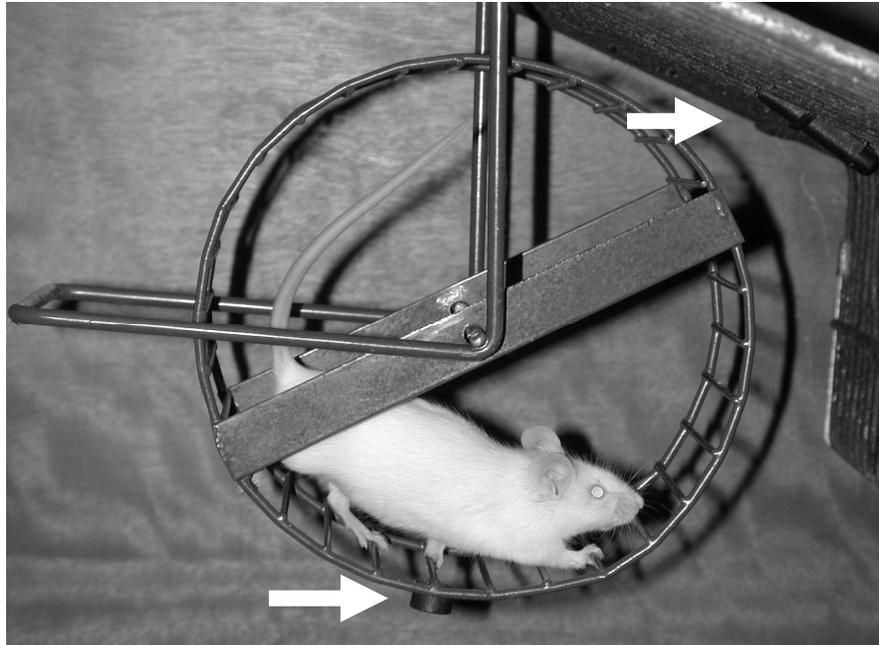


Figura 3: Animal praticando exercício na rodinha de correr. As setas apontam para o ímã e o sensor acoplado à gaiola.

3.3 - Teste de aprendizado de memória espacial no labirinto aquático de Morris

Entre o 54º e o 58º dia de vida pós-natal, os animais foram submetidos ao treinamento em uma versão do labirinto aquático de Morris, a fim de verificar o desempenho dos grupos no teste de memória espacial. O labirinto aquático consiste em um tanque circular de fibra de vidro, medindo 94cm de diâmetro de boca e 1.04m de fundo, preenchido com água na profundidade de 24cm. No tanque foram estabelecidos quatro pontos: norte, sul, leste e oeste, com o intuito de dividir a área do tanque em quatro quadrantes (nordeste, sudeste, noroeste e

sudoeste) e no centro do quadrante noroeste foi colocada uma plataforma circular de PVC, medindo 23cm de altura e 14cm de diâmetro, de modo que a plataforma ficasse submersa a 1cm da superfície da água. Para garantir que os animais não poderiam visualizar a plataforma, a água foi turvada utilizando-se dois litros de leite. O tanque foi circundado por cortinas na cor cinza, para dificultar a utilização de pistas visuais do ambiente pelos animais.

As cortinas pretendiam minimizar as pistas visuais estimulando o animal a utilizar igualmente o senso interno de direção (pistas idiotéticas) (Chakraborty et al, 2004).

Durante as últimas horas da fase clara do ciclo, os animais foram submetidos aos testes de aprendizado espacial no labirinto aquático. O teste consistia em quatro tentativas diárias de encontrar a plataforma, com intervalos de descanso de 1 minuto entre as tentativas.

Os animais eram colocados gentilmente na água com o auxílio de um sistema de suporte para o animal com cabo longo. Sempre de frente para a parede do tanque, os animais eram soltos para nadar a partir de quadrantes escolhidos de forma randômica.

O tempo que o animal levava para encontrar a plataforma submersa era registrado (tempo de latência de escape), sendo considerado acerto quando o animal encontrava a plataforma e permanecia na mesma por 5s. Tempos acima de um minuto e meio eram registrados como erro.

No caso de erro, o animal era manualmente colocado em cima da plataforma pelo experimentador, onde permanecia por 5s.

O primeiro dia de teste (55º dia de vida) foi utilizado como treinamento e adaptação dos animais ao ambiente aquático, e durante os três dias seguintes os dados de latência de escape foram registrados para análise. A taxa de aprendizado no labirinto aquático foi designada pelo cálculo de índice de contraste (C) entre as médias das latências de escape (L) da cada indivíduo entre o primeiro e o terceiro dia de treinamento $C=(L1-L3) / (L1+L3)$, permitindo que os dados das latências iniciais de cada animal fossem utilizados como controle da taxa de aprendizado do mesmo.

3.4 - Perfusão e Reação Histoquímica

Aos 21 e 58 dias de vida pós-natal, no último dia de treinamento no labirinto aquático (para os animais de 58 dias), após a última sessão de testes, os animais foram pesados e anestesiados profundamente com uma mistura de Cloridrato de Ketamina (100 mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (10 mg/Kg) (König). Os animais foram então perfundidos transcárdiacamente através do ventrículo esquerdo com solução salina 0,9% por 10 minutos, seguido de paraformaldeído a 4% em solução tampão fosfato (pH 7,2-7,4) por 30 minutos. A reação de diaforase requer fixação aldeídica para promover a inibição de outras oxi-redutases dependentes de NADPH-diaforase, que através de mecanismos de redução também convertem os sais de tetrazólio a produtos insolúveis e coloridos. A utilização de paraformaldeído a 4% inibe a atividade das outras diaforases (Buwalda et al, 1995; Grozdanovic et al, 1995) enquanto preserva a deposição de formazan no tecido que é proporcional à concentração da enzima ativa no tecido mantidas constantes a temperatura, pH, grau de fixação, espessura do corte, etc. No cérebro de ratos, diferentes fixações aldeídicas afetam a distribuição da atividade diaforásica mas não a da sintase do óxido nítrico (Buwalda et al, 1995). Após a fixação os animais foram decapitados e tiveram seus encéfalos retirados e seccionados na fissura sagital a fim de separar os hemisférios, que foram mantidos em solução tampão fosfato 0,1M a 4°C durante a noite.

3.5 - Processamento Histológico

No dia seguinte à perfusão, secções parassagitais de 100 µm de espessura dos hemisférios direitos de cada animal foram obtidas em vibrátomo (Pelco), sendo recolhidas em tampão fosfato 0,1M (pH 7.2-7.4) e processados para a reação histoquímica da NADPH-diaforase.

A histoquímica para revelação da atividade da enzima NADPH-diaforase foi realizada pelo método da enzima málica (Scherer-Singler et al, 1983), segundo os procedimentos a seguir:

Após o corte, as secções eram recolhidas brevemente em tampão fosfato 0,1M, e incubadas a 37° C em solução de 0,6% de ácido málico em tampão TRIS 0,1M pH 8.0. Adicionou-se à mistura β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (β -NADP - 0.1% p/v), cloreto de manganês (0.04% p/v) e azul de nitrotetrazólio (nitroblue terazolium, NBT - 0.03% p/v), previamente diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO - 0.3% p/v), acrescentando-se em seguida Triton X-100 a 0.1% v/v, obtendo-se assim uma solução de cor amarela fotossensível, que foi protegida da luz com papel laminado. As secções foram incubadas nessa solução sob agitação constante à temperatura de 37° C. A reação foi monitorada em intervalos de 30 minutos, com a utilização de um microscópio óptico e o tempo máximo de reação obtido foi de três horas. A interrupção da reação se dava quando as camadas hipocampais e as células do estriado estavam bem definidas, fazendo-se a lavagem das secções em tampão fosfato 0,1M por 10 minutos, repetindo-se a lavagem por três vezes. A seguir, os cortes foram montados em lâminas e cobertos com lamínula com auxílio de um meio de inclusão (glicerol), para posterior análise. Todos os reagentes químicos utilizados foram supridos pela companhia farmacêutica Sigma (Poole, UK).

3.6 - Análise densitométrica no estriado e hipocampo

De cada animal, foram selecionadas cerca de cinco a dez secções contendo cada estrutura: hipocampo dorsal, cerebelo e estriado para análise densitométrica. A fim de quantificar a densidade da reação, a quantidade de luz transmitida através dessas estruturas foi medida utilizando-se um fotômetro digital TekLumacolor (Tektronix mod J17), com sonda de luminância (J1803) acoplada a microscópio óptico axiophot (Zeiss), com valores expressos em candelas/ μm^2 , a fim de determinar a densidade da reação histoquímica. Todas as medidas foram feitas sob valor constante de intensidade luminosa (10V no potenciômetro). A escolha desse valor foi feita de modo que as medidas estivessem dentro da faixa de resposta linear do fotômetro obtida a partir de curva de calibração construída antes das medidas. Esse valor foi escolhido com base a se fazer uma relação linear

entre os depósitos de formazan e os valores de transmitância. Logo, quando a atividade nitrérgica associada à presença de depósitos de formazan aumentava, o valor de transmitância correspondente diminuía.

A magnificação da objetiva também foi escolhida de maneira que, ao se analisar o estriado e as camadas hipocampais, o círculo do diafragma de campo do microscópio se mantivesse dentro dos limites da estrutura/camada analisada, sem avançar sobre estruturas adjacentes.

Após a determinação dos valores de luminância em cada estrutura das secções individuais de cada animal, obtinha-se a média dos valores por animal, e da média dos valores de cada animal obtinha-se a média dos valores por grupo experimental.

No hipocampo foram quantificadas as medidas de luminância das camadas granular, polimórfica e estrato molecular do giro denteado (DG), estrato lacunoso molecular, estrato radiado e estrato oriens no corno de Amon I (CA1), e as camadas estrato lacunoso molecular, estrato radiado, e estrato oriens no corno de Amon III (CA3). No estriado foram obtidas três medidas, sendo duas no estriado dorsal e uma no estriado ventral, sendo mensuradas áreas livres da passagem de fibras e corpos celulares de neurônios diaforase positivos. As áreas padronizadas de coleta de dados no hipocampo e estriado estão demonstradas na figura 4

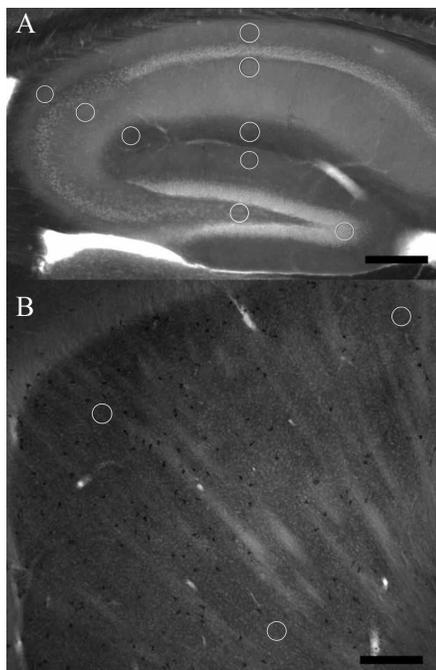


Figura 4: Fotomicrografias de secções do hipocampo e estriado ilustrando as áreas sistematicamente mensuradas das quais foram obtidos os dados de transmitância. **A** - áreas coletadas no hipocampo. **B** - áreas coletadas no estriado. Escala = 250µm.

A fim de evitar equívocos metodológicos, as quantificações foram efetuadas por dois experimentadores, dos quais um manipulava o microscópio enquanto o outro fazia os registros dos dados mensurados com o fotômetro.

Levando em conta que as secções parasagittais selecionadas correspondem ao hipocampo dorsal, a análise empregada no presente estudo corresponde aproximadamente à área entre a linha média e 2,5mm lateral. As medidas densitométricas no estriado foram realizadas entre 1 e 3mm lateral.

3.7 - Atividade Histoquímica

A reação histoquímica para NADPH-diaforase está sujeita a variações dentro e entre os animais. O padrão de marcação de uma determinada secção em relação à outra pode variar em função de parâmetros histológicos como tempo de reação, espessura do corte, grau de fixação e outros valores aos quais a reação pode estar sujeita. A fim de manter a comparabilidade dos dados, para a análise da transmitância nas camadas hipocâmpais e no estriado, adotamos como controle uma região que quase não exibe atividade histoquímica para funcionar como indicador do background da reação, a camada granular do giro denteado. A partir da medida de transmitância da camada granular do giro denteado, fizemos as comparações entre as secções de diferentes animais, reagidas em diferentes momentos, utilizando o cálculo de contraste para cada camada analisada em cada secção. O cálculo de contraste foi utilizado com o intuito de reduzir o efeito da variabilidade da reação associado aos diferentes parâmetros histológicos, da seguinte maneira:

A região escolhida como controle para as medidas hipocâmpais foi designada valor de transmitância máximo (Tmax), enquanto o valor de transmitância da camada a ser estudada foi designado valor de transmitância mínimo (Tmin). A partir desses valores, calculava-se o índice de contraste (C) entre a região de interesse e o padrão de referência, utilizando-se a seguinte equação (Borba et al, 2000; Picanco-Diniz et al, 2004; Torres et al, 2006):

$$C = (T_{max} - T_{min}) / (T_{max} + T_{min})$$

O cálculo de contraste para os valores de transmitância do estriado foram feitos utilizando-se como T_{max} a camada granular do giro denteado, sendo T_{min} o valor de transmitância da neurópila do estriado.

O índice de contraste foi calculado para cada camada em cada secção, obtendo-se o valor médio por camada de cada grupo experimental através das médias de cada animal.

3.8 – Por que a adoção do índice de contraste?

O índice de contraste foi calculado para cada camada em cada secção, obtendo-se o valor médio por camada de cada grupo experimental através das médias de cada animal. A figura 5 apresenta as representações gráficas dos valores de transmitância (Figura 5A) e de contraste (Figura 5B) das camadas do giro denteado e de CA1 de três secções obtidas de três animais pertencentes a um mesmo grupo experimental (*CI*). A variabilidade apresentada nos valores de transmitância pode ter sido induzida por diferentes parâmetros histológicos, como variações na espessura da secção, grau de fixação, tempo de reação, etc, que podem afetar a quantidade de depósitos de formazan no tecido. Note que os valores de transmitância em todas as camadas tendem a seguir a variação no *background* da reação. Uma vez que os depósitos não específicos de formazan são facilmente observados nas camadas que apresentam menor atividade nitrérgica, a camada granular do giro denteado se torna uma ótima escolha para utilização de um controle interno da intensidade da reação. Utilizando-se dessa camada para estimar os valores de contraste, pode-se facilmente reduzir a influência de possíveis variações induzidas por alterações em parâmetros histológicos em cada secção. Observe que na figura 5B a variação apresentada na figura 5A é reduzida após a estimação dos valores de contraste para cada secção. O presente estudo baseia-se na análise comparativa dos índices de contraste obtidos nos grupos experimentais previamente descritos, e confirma resultados previamente obtidos (Picanco-Diniz et al, 2004; Torres et al, 2006), indicando que a utilização de

medidas relativas na quantificação da atividade histoquímica da NADPH-diaforase é uma alternativa confiável para a densitometria quantitativa.

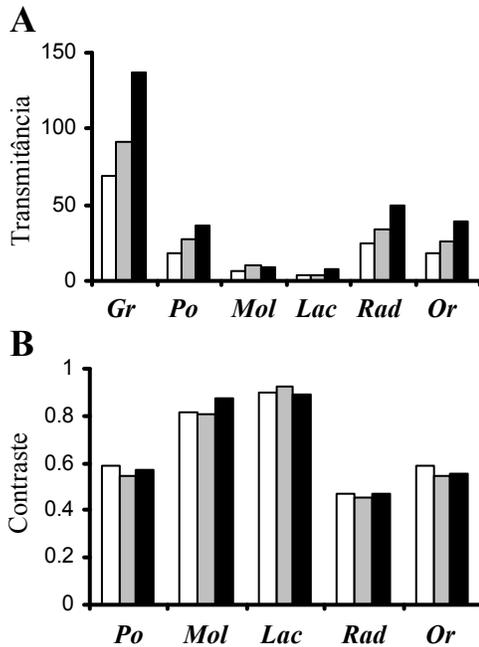


Figura 5 – **A** – Valores de transmitância nas camadas de CA1 e DG de três animais do grupo *CI*. □ - animal 1 ; ▒ - animal 2; ■ - animal 3. **B** – Valores de contraste estimados para os mesmos animais. **Gr** – Granular, **Po** – Polimórfica; **Mol** – Molecular; **Lac** – Lacunoso Molecular; **Rad** – Radiatum; **Or** – Oriens.

3.9 - Análises estatísticas

Para avaliar o grau de significância dos resultados foi adotada a análise estatística paramétrica aplicando-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni, aceitando-se como significantes as diferenças entre grupos com intervalos de confiança de 95% ($p < 0,05$), e de 99% ($p < 0,01$). Todos os testes estatísticos foram efetuados utilizando o software Bioestat 4.0 (Ayres, 2005). Em todos os casos, as medidas das secções de um mesmo animal foram estimadas, obtendo-se a média entre os valores de um mesmo animal, sendo esta média o valor utilizado para os cálculos estatísticos. A média obtida dos valores dos animais de um mesmo grupo foi utilizada para a obtenção das representações gráficas (média \pm erro padrão).

4 - RESULTADOS

4.1 - Peso corporal dos animais

Aos 21 dias pós-natais observamos diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, teste *a priori* de Bonferroni, $p < 0,05$) nas médias dos pesos dos animais dos grupos **Sn₂₁** ($10.35 \pm 0.58\text{g}$) e **C₂₁** ($13.20 \pm 0.36\text{g}$). Nesse período, os grupos controle e subnutrido revelaram uma diferença de peso em termos percentuais equivalente a 21,6%, o que indica que a alteração do tamanho da ninhada foi suficiente para induzir uma alteração do estado nutricional dos animais, revelado no peso dos mesmos (Figura 6). O período de desenvolvimento pós-desmame, no qual todos os animais receberam água e ração *ad libitum*, foi suficiente para estabelecer uma recuperação na condição nutricional verificada aos 21 dias nos animais do grupo **SnE** ($37.23 \text{ g} \pm 1.28\text{g}$). Após 37 dias, a diferença entre as médias dos pesos dos animais dos grupos **CI**, **CE**, e **SnE** se normalizou a níveis não significativos, porém os animais do grupo **SnI** ($31.31 \text{ g} \pm 0.87\text{g}$) permaneceram com o peso significativamente reduzido quando comparado ao do grupo **CI** ($36.30 \text{ g} \pm 2.04\text{g}$).

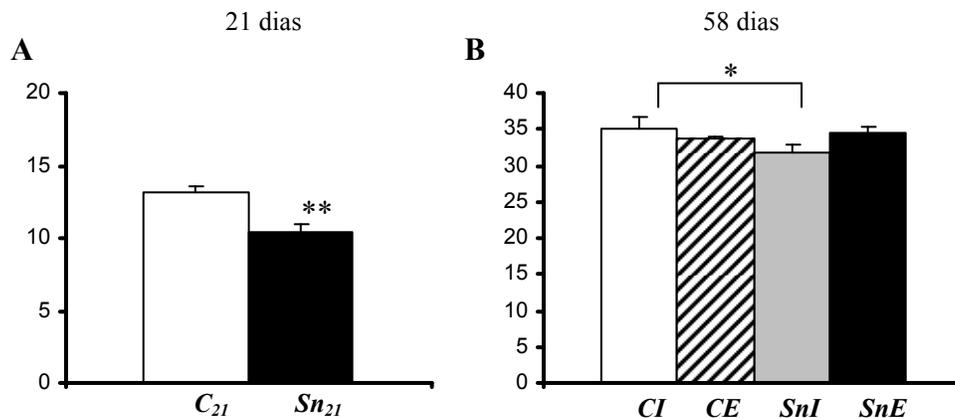


Figura 6. **A** – Peso corporal dos grupos aos 21 dias pós-natais. **C₂₁** – Controle; **Sn₂₁** – Subnutrido. **B** – Peso corporal aos 58 dias pós-natais. **CI** – Controle Inativo; **CE** – Controle Exercício; **SnI** – Subnutrido Inativo; **SnE** – Subnutrido Exercício. ANOVA, teste *a priori* de Bonferroni. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$. Barras de erro = + E.P.

4.2 - Desenvolvimento nas rodinhas de correr

As alterações nutricionais nas fases precoces pós-natais não afetaram o desempenho dos animais dos diferentes grupos experimentais nas rodinhas de correr. As distâncias percorridas pelos animais dos grupos **CE** (75.87 ± 15.27 km) e **SnE** (5.55 ± 6.23 km) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, um critério, teste *a priori* de Bonferroni, $p < 0,05$).

4.3 – As alterações nutricionais nas primeiras fases de vida pós-natal afetam a atividade histoquímica da NADPH-diaforase no hipocampo aos 21 dias pós-natais, sem alterações no estriado nesse período.

A reação histoquímica da NADPH-diaforase permitiu revelar a atividade das enzimas óxido nítrico sintases no hipocampo e estriado dos animais de todos os grupos experimentais. Como já descrito previamente na literatura, a histoquímica da NADPH-diaforase é um marcador confiável que marca não somente a ocorrência, mas a atividade da enzima NADPH diaforase, sendo um marcador confiável das sintases do óxido nítrico no encéfalo, uma vez que reações histoquímicas para marcação da NADPH diaforase neuronal e sintase do óxido nítrico indicam a atividade e ocorrência da mesma enzima, respectivamente (Hope et al, 1991).

Aos 21 dias de vida pós-natal, ao compararmos os valores de contraste dos grupos **C₂₁** e **Sn₂₁**, observamos que o grupo **Sn₂₁** apresenta valores significativamente menores que os do grupo controle no estrato molecular do giro denteado [$F(5,18) = 4.35$, $p < 0.01$] e estrato lacunoso molecular de CA1 [$F(5,18) = 3.54$, $p < 0.05$] (Figura 7A), assim como no estrato lacunoso [$F(5,41) = 117.37$, $p < 0.01$], estrato radiado [$F(5,41) = 102.29$, $p < 0.01$] e estrato oriens [$F(5,39) = 112.5$, $p < 0.01$] de CA3 (Figura 7B). Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos C21 e Sn21 nesse período [$F(2,9) = 1.43$, $p = 0.28$] (Figura 7C).

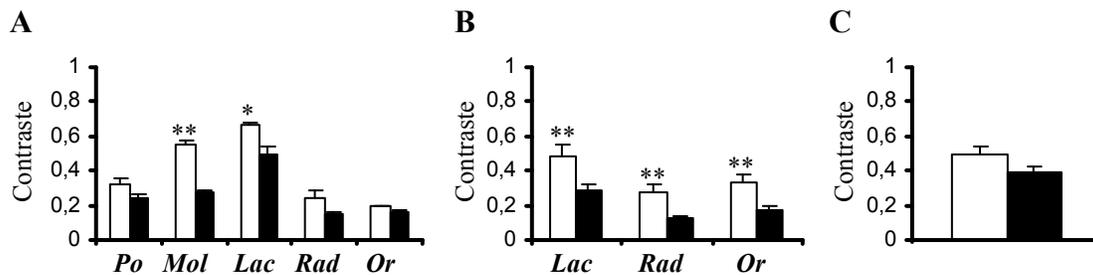


Figura 7. Representações gráficas da atividade diaforásica no 21º dia pós-natal. **A** – Médias dos valores de contraste nas camadas de CA1 e DG. **Po** – Polimórfica; **Mol** – Molecular; **Lac** – Lacunoso; **Rad** – Radiado; **Or** – Oriens. **B** – Média dos valores de contraste nas camadas de CA3. **Lac** – Lacunoso; **Rad** – Radiado; **Or** – Oriens. **C** – Média dos valores de contraste no estriado. □ – *C*₂₁; ■ – *Sn*₂₁. ANOVA, teste *a priori* de Bonferroni. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$. Barras de erro = + E.P.

4.4 – A subnutrição perinatal precoce reduz a atividade histoquímica da NADPH-diaforase no hipocampo durante a vida adulta, apresentando diferenças regionais em CA1, giro dentado e CA3.

A figura 8 mostra as representações gráficas das médias dos valores de contraste no giro dentado, CA1 (Figura 8A) e CA3 (Figura 8B) dos grupos **C** e **Sn** após o desmame (21º dia pós-natal) e na fase adulta (58º dia pós-natal). Note que o desenvolvimento da atividade nitrérgica no grupo controle demonstrou uma tendência (não estatisticamente significativa) de aumento dos valores de contraste entre o 21º e o 58º dia pós-natal em todas as camadas do giro dentado e de CA1. Em CA3 este aumento dos valores de contraste no grupo controle entre o 21º e o 58º dia de vida pós-natal foi estatisticamente significativo em todas as camadas (SL-[$F(5,41) = 117.37$, $p < 0.01$]; SR-[$F(5,41) = 102.29$, $p < 0.05$]; SO-[$F(5,39) = 112.5$, $p < 0.01$]). A atividade nitrérgica no grupo subnutrido (**Sn**) não apresentou aumento entre o 21º e o 58º dia pós-natal no giro dentado e em CA1, permanecendo com valores de contraste significativamente mais baixos que os do controle no estrato molecular do giro dentado [$F(5,18) = 4.35$, $p < 0.01$],

estrato lacunoso de CA1 [$F(5,18) = 3.54, p < 0.01$] e estrato oriens de CA1 [$F(5,18) = 5.16, p < 0.01$]. Em CA3, o grupo *Sn* apresentou um aumento não significativo da atividade nitrérgica entre o 21º e o 58º dia de vida pós-natal, porém sem conseguir alcançar os níveis de atividade apresentados pelo grupo controle, permanecendo uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos *SnI* e *CI* nesse período.

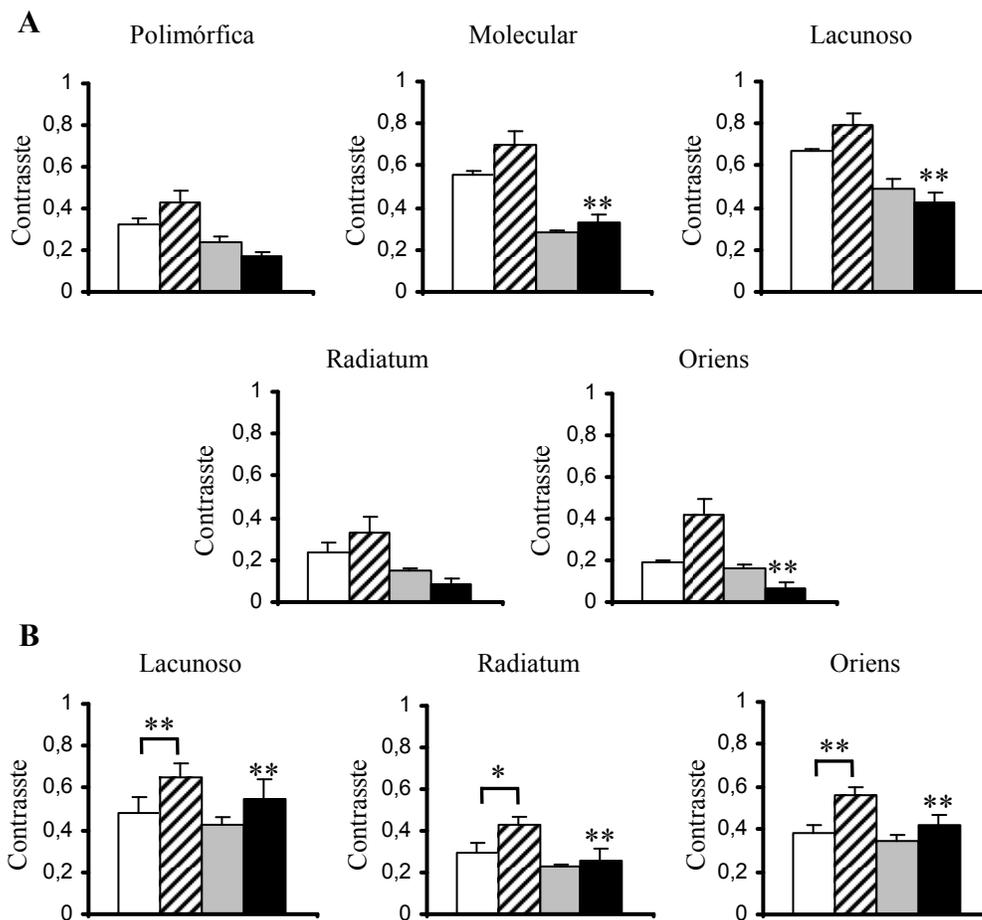


Figura 8. Representações gráficas da atividade diaforásica hipocampal, expressa como média dos valores de contraste dos grupos *C* e *Sn* aos 21º e 58º dia pós-natal. **A.** Camadas de CA1 e DG. **B.** Camadas de CA3. □ – *C*₂₁; ▨ – *CI*; ▤ – *Sn*₂₁; ■ – *SnI*. ANOVA, teste *a priori* de Bonferroni, (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$. Barras de erro = +E.P.

4.5 – O exercício voluntário associado à alimentação ad libitum não são suficientes para recuperar a atividade histoquímica da NADPH-diaforase prejudicada pela subnutrição perinatal no giro denteado, mas apresentam melhoras significativas em algumas camadas de CA1 e CA3.

A atividade física voluntária aparentemente não se mostrou suficiente para promover uma recuperação da atividade histoquímica da NADPH-diaforase no hipocampo de animais submetidos à subnutrição perinatal. Aparentemente, porém, os animais submetidos à subnutrição perinatal seguida de reabilitação nutricional com água e comida *ad libitum* associada à atividade física voluntária apresentaram uma melhora na atividade histoquímica em relação aos animais que não tiveram a oportunidade de realização de atividade física voluntária. Após o período de recuperação nutricional, no qual os animais receberam água e ração *ad libitum*, associado a exercícios voluntários, o grupo subnutrido exercício (***SnE***) apresentou uma tendência não significativa de aumento da atividade nitrérgica em relação ao grupo subnutrido inativo (***SnI***) nas camadas polimórfica e molecular do giro denteado, porém permanecendo com os níveis de atividade histoquímica da NADPH-diaforase significativamente abaixo dos níveis apresentados pelo grupo controle. Em contraste, em CA1 o grupo ***SnE*** apresentou uma recuperação parcial da atividade nitrérgica, apresentando valores de contraste significativamente maiores em relação ao grupo ***SnI*** no estrato lacunoso [$F(5,18) = 3.93, p < 0.05$], estrato radiado [$F(5,18) = 3.62, p < 0.05$] e estrato oriens [$F(5,18) = 5.73, p < 0.05$] de CA1, alcançando os níveis de atividade apresentados pelo grupo controle nos estrato lacunoso e estrato radiado. Em CA3, o exercício voluntário se apresentou insuficiente na recuperação da atividade nitrérgica no grupo ***SnE*** nos estrato radiado e estrto oriens, porém apresentou um aumento significativo da atividade nitrérgica do grupo ***SnE*** em comparado ao grupo ***SnI*** no estrato lacunoso [$F(5,27) = 41.43, p < 0.05$], alcançando os níveis encontrados no grupo controle (Figura 9).

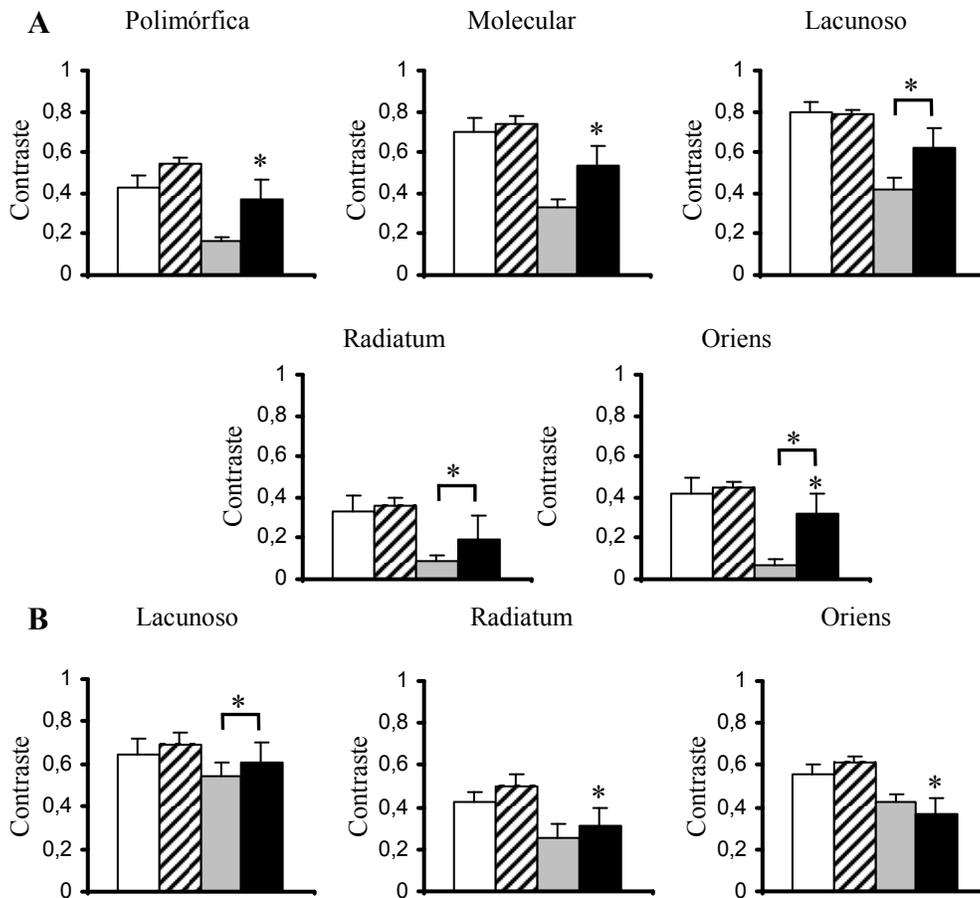


Figura 9. Representações gráficas das médias dos valores de contraste nas camadas hipocâmpais de CA1, CA3 e DG dos grupos *C* e *Sn* ao 58º dia pós-natal. □ - *CI*; ▨ - *CE*; ■ - *SnI*; ■ - *SnE*. **A.** Camadas de CA1 e DG; **B.** Camadas de CA3. ANOVA, teste *a priori* de Bonferroni, (**) $p < 0.01$; (*) $p < 0.05$. Barras de erro = +E.P.

As figuras 10 e 11 mostram fotomicrografias das camadas do giro denteado, CA1 e CA3 escolhidas para representar as médias dos valores de contraste de cada grupo experimental apresentado no presente estudo. Note que a subnutrição perinatal acarreta uma redução permanente da atividade nitrérgica na neurópila nas camadas molecular e polimórfica do giro denteado, a qual não foi completamente recuperada mesmo após o período de crescimento sob condições de atividade física voluntária associada à reabilitação nutricional.

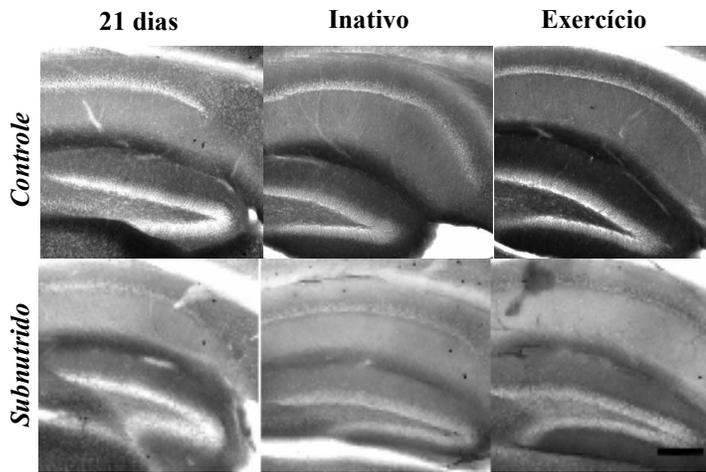


Figura 10. Fotomicrografias das camadas de CA1 e DG de secções seleccionadas para representar os valores médios de contraste de cada grupo experimental. Escala: 250 μ m.

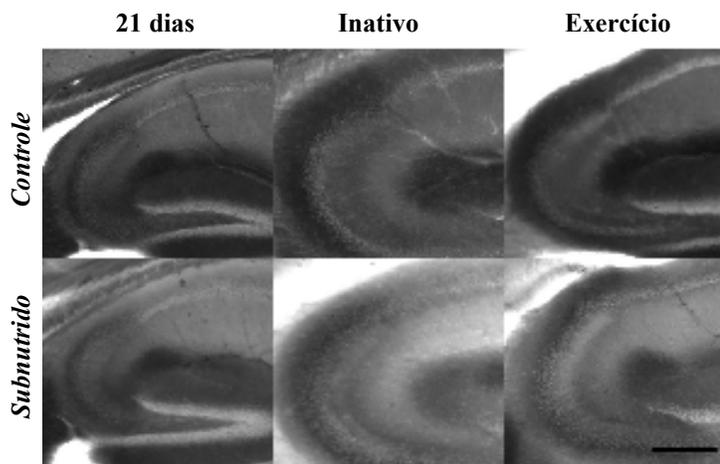


Figura 11. Fotomicrografias das camadas de CA3 de secções seleccionadas para ilustrar as médias dos valores de contraste para cada grupo experimental. Escala: 250 μ m.

4.6 – A atividade física voluntária associada à reabilitação nutricional apresenta-se insuficiente na recuperação da atividade histoquímica da NADPH-diaforase no estriado de animais submetidos à subnutrição perinatal .

Aos 21 dias de vida pós-natal, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na atividade nitrérgica no estriado entre os grupos experimentais (figura 7C). Aos 58 dias de vida pós-natal, a atividade histoquímica para a NADPH-diaforase no grupo controle (**CI**) aumentou significativamente quando comparado ao mesmo grupo aos 21 dias (**C₂₁**) [F (5, 18) = 5.05, $p < 0.01$], sugerindo que a atividade nitrérgica no estriado apresenta um desenvolvimento

tardio em relação ao hipocampo. Entretanto, a atividade nitrérgica do grupo subnutrido (*SnI*) não apresentou o aumento verificado no grupo controle, apresentando valores de contraste significativamente inferiores aos do referido grupo ao 58º dia pós-natal [F (5, 18) = 5.05, $p < 0.01$]. Após o período de exercício, o grupo subnutrido exercício (*SnE*) não apresentou recuperação da atividade nitrérgica, não alcançando os níveis observados no grupo controle (Figura 12A). A figura 12B mostra fotomicrografias de secções do estriado reagidas histoquimicamente para a NADPH-diaforase, que foram escolhidas para representar as médias dos valores de contraste de cada grupo experimental.

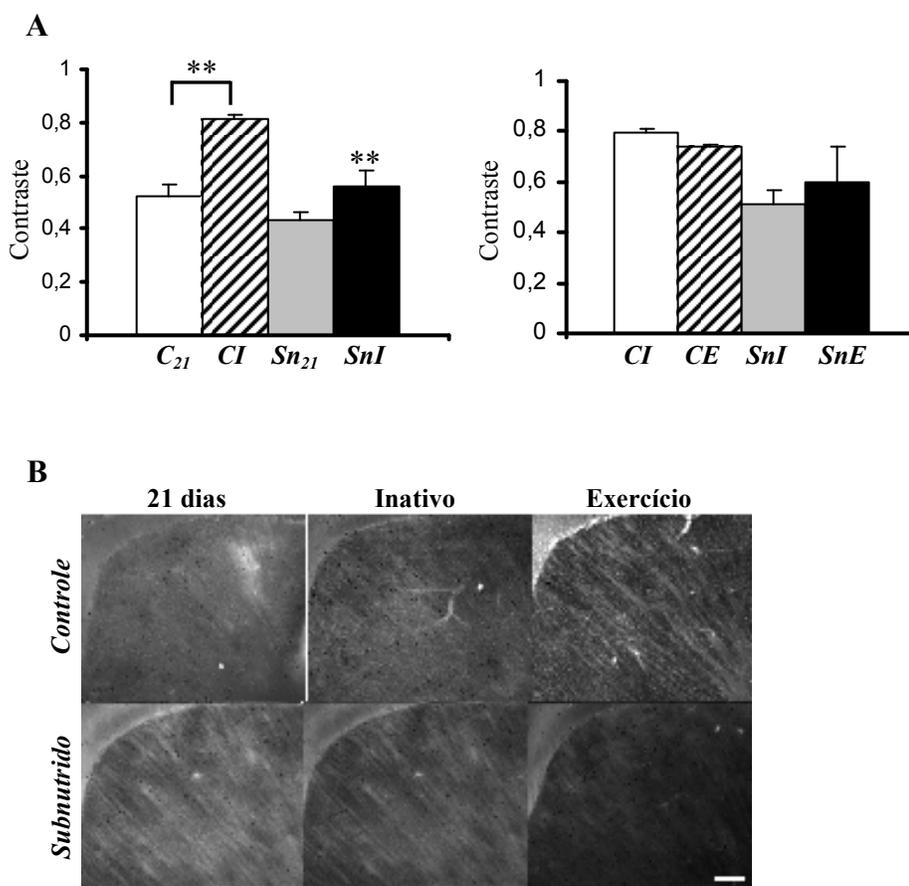


Figura 12. **A** – Representações gráficas dos valores médios de contraste no estriado para todos os grupos experimentais. Esquerda: Grupos *C* e *Sn* aos 21º e 58º dias pós-natais. Direita: Grupos *C* e *Sn* ao 58º dia pós-natal nas condições inativa e exercício. **B** – Fotomicrografias do estriado de secções selecionadas para representar a média dos valores de contraste para cada grupo experimental. Escala: 250µm.

4.7 – O desempenho dos animais no labirinto aquático de Morris não foi alterado pelas condições experimentais.

No presente estudo, o impacto das alterações nutricionais perinatais seguidas pela recuperação nutricional associada à atividade física voluntária no aprendizado espacial foi verificado através do cálculo dos índices de contraste entre as latências de escape apresentadas pelos animais experimentais entre o 1º e o 3º dias de teste. O índice de contraste foi utilizado a fim de otimizar a curva de aprendizado de cada animal experimental, utilizando-se um modelo de testes de curta duração no labirinto aquático (Torres et al, 2006). A utilização do índice de contraste permite que cada animal seja utilizado como seu próprio controle, independente das variações de desempenho observadas entre os animais no primeiro dia de testes. Sob as condições experimentais previamente descritas, as alterações nutricionais induzidas nas primeiras fases de vida associadas ou não à atividade física voluntária não afetaram o desempenho dos animais dos diferentes grupos experimentais no labirinto aquático. Como pode-se observar na figura 13, os valores de contraste apresentados pelos grupos experimentais não revelaram diferenças estatisticamente significativas, tendo-se obtido valores de contraste semelhantes para todos os grupos experimentais testados nas condições anteriormente descritas ($CI = 0.39 \pm 0.02$ S.E.; $CE = 0.31 \pm 0.14$ S.E.; $SnI = 0.46 \pm 0.04$ S.E.; $SnE = 0.46 \pm 0.15$ S.E.) [F (5, 18) = 0.53, $p = 0.75$].

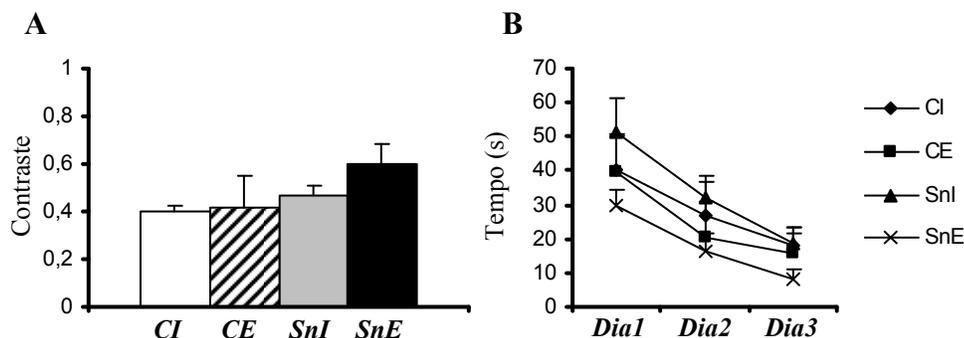


Figura 13. Gráficos representando a média dos índices de contraste de aprendizado (A) e as médias dos tempos de latência de escape (B) no teste do labirinto aquático para os grupos C e Sn. ANOVA, teste a priori de Bonferroni, $p < 0,05$.

Diferentemente de resultados previamente obtidos em estudos realizados em nosso laboratório por Torres e colaboradores (Torres *et al*, 2006), no presente estudo não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os desempenhos obtidos no teste do labirinto aquático nem na atividade nitrérgica entre os animais do grupo controle inativos e sob condição de exercício.

A figura 14 demonstra que a condição experimental de isolamento social exerce efeito prejudicial sobre a atividade nitrérgica tanto em condições inativas quanto de exercício voluntário, porém o exercício induz um aumento significativo na atividade nitrérgica no hipocampo de animais criados sob condição de isolamento social, efeito não observado nos animais criados em pares (Figura 14 A, B, C, D, E).

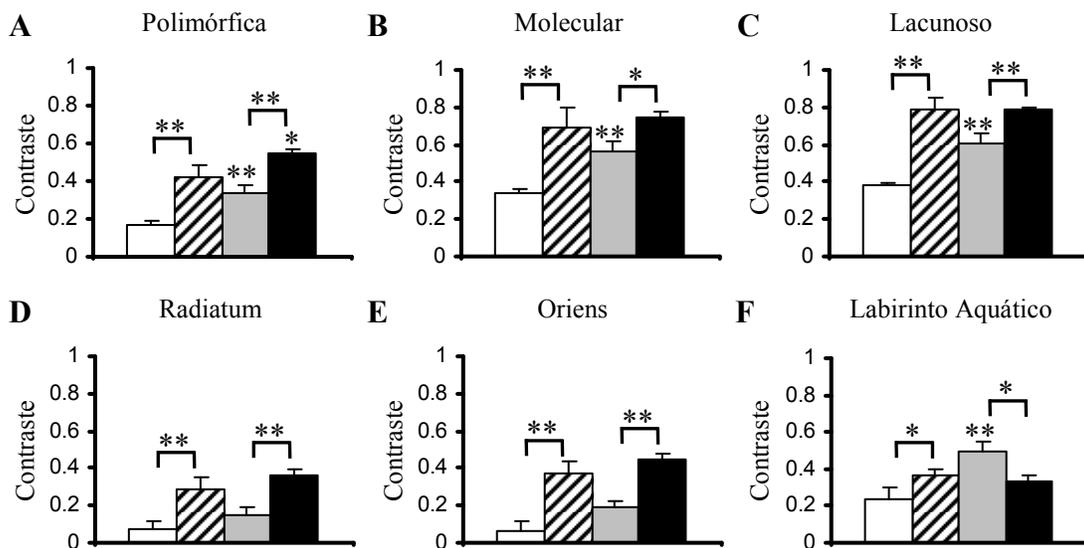


Figura 14. Comparações gráficas da atividade histoquímica e do desempenho no teste de labirinto aquático entre os grupos inativo e exercício voluntário de Torres *et al*, 2006 e os grupos controle inativo e exercício do presente estudo, que foram submetidos às mesmas condições experimentais. **A, B, C, D, E** – Médias dos valores de contraste das camadas de CA1 e DG. **F** – Média dos valores de contraste de aprendizado dos mesmos grupos. □ e ■ – grupos *IC* (*inativo controle*) e *VX* (*exercício voluntário*) do estudo de Torres *et al*, 2006; ▨ e ■ – grupos *CI* e *CE* do presente estudo. ANOVA, teste *a priori* de Bonferroni, (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$. Barras de erro = +E.P. As barras representam diferença significativa entre os grupos indicados pelas mesmas. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo marcado com o(s) asterisco(s) e o grupo controle correspondente.

As taxas de aprendizado mostradas na figura 14 F demonstram que os animais inativos isolados apresentaram desempenhos significativamente inferiores no labirinto aquático aos apresentados pelos animais inativos que foram criados em duplas. Sob condições de exercício voluntário, o grupo isolado mostra um desempenho no teste significativamente superior ao dos animais do grupo exercício que foram criados em duplas.

5 - DISCUSSÃO

No presente trabalho, investigamos os efeitos do exercício voluntário sobre o impacto causado pela subnutrição no período perinatal na atividade histoquímica da NADPH-diaforase na neurópila do hipocampo e estriado, bem como sobre a memória espacial. Os resultados obtidos revelaram inicialmente que nosso protocolo de indução de subnutrição por alteração do número de filhotes por nutriz foi eficiente no sentido de provocar alterações no estado nutricional dos animais, condizendo com os resultados obtidos anteriormente com a utilização do mesmo protocolo de subnutrição perinatal por Rocha-de-Melo e colaboradores (Rocha-de-Melo *et al*, 2004) e Maia e colaboradores (Maia *et al*, 2006). Aos 21 dias de vida pós-natal, a atividade nitrérgica do grupo **Sn** apresentou-se reduzida comparada ao grupo **C** no giro denteado, CA1 e CA3, porém esse resultado não foi observado no estriado nesse período. O livre acesso à água e ração no período seguinte ao desmame não foi suficiente para recuperar a atividade nitrérgica hipocampal do grupo **Sn** aos níveis encontrados no grupo controle. A atividade física voluntária nas rodinhas de correr induz uma recuperação parcial da atividade histoquímica da NADPH-diaforase no hipocampo dos animais subnutridos, alcançando os níveis observados nos animais do grupo controle em algumas regiões. No 58º dia de vida pó-natal, os animais do grupo controle apresentaram um aumento na atividade nitrérgica no estriado que não foi observada pelos animais do grupo subnutrido. O exercício não se apresentou suficiente na recuperação da atividade nitrérgica no estriado nos animais do grupo

subnutrido. O desempenho dos animais de ambos os grupos não foi afetado pelas condições experimentais descritas.

5.1 - Mudanças na histoquímica da NADPH-diaforase no giro denteado, hipocampo e estriado: conseqüências funcionais da produção alterada de óxido nítrico.

Os dados observados no presente estudo sugerem que fatores ambientais como desequilíbrios nutricionais, especialmente durante a fase de rápido crescimento cerebral, podem levar a danos neurais permanentes e/ou transitórios. No presente estudo, e de forma semelhante em outras investigações, ver (Morgane *et al*, 2002) para revisão, verificamos que mudanças precoces no tamanho da ninhada afetam a atividade nitrérgica diferentemente em cada região hipocampal.

5.1.1 - Alterações vasculares, atividade histoquímica da NADPH-diaforase e atividade física voluntária.

Como já foi previamente descrito por Picanço-Diniz e colaboradores (Picanço-Diniz *et al*, 2004), a forte marcação diaforásica próxima às artérias da fissura hipocampal sugere um papel do óxido nítrico nessas camadas na regulação do fluxo sanguíneo local do giro denteado, CA1 e CA3. Além disso, tem sido demonstrada a marcação para a NADH-diaforase nas células do endotélio vascular cerebral e na inervação das células musculares lisas da parede das artérias (Tsuchida *et al*, 2001). A maior densidade de microvasos, arteríolas e redes de fibras nervosas NADPH-diaforase positivas no hipocampo é observada no estrato lacunoso molecular de CA1 (Lovick *et al*, 1999).

Evidências semelhantes no estriado implicam no papel do óxido nítrico no controle do fluxo sanguíneo local no estriado, tanto no cérebro adulto quanto no cérebro em desenvolvimento. Durante o período de desenvolvimento, a produção de óxido nítrico pelo estriado aumenta significativamente e promove um aumento no fluxo sanguíneo cerebral local (rCBF – *regional Cerebral Blood Flow*) em

resposta à hipóxia induzida, que é atenuado por agentes inibidores das sintases do óxido nítrico (Ioroi *et al*, 1998).

Diferentemente, estudos utilizando microscopia eletrônica no intuito de observar a distribuição dos produtos da reação diaforásica a nível subcelular revelaram deposição predominante desses produtos nas mitocôndrias dos terminais dos astrócitos, aparentemente envolvidos na adaptação do fluxo sanguíneo local no estriado (Calka e Wolf, 2003). Ainda, o uso de inibidores da atividade das sintases do óxido nítrico, como a NG-Nitro-L-arginina metil éster apresentaram uma diminuição do fluxo sanguíneo no estriado, com aumento da pressão arterial sistêmica (Jansson *et al*, 1999).

Pelo fato de o óxido nítrico estar envolvido com o aumento do fluxo sanguíneo local no hipocampo e estriado, e como no presente estudo observamos uma diminuição significativa da atividade histoquímica da NADPH-diaforase nas camadas lacunoso molecular de CA1, na camada molecular do giro dentado e no estriado dos animais do grupo *SnI*, quando comparados aos animais do grupo controle no 58º dia de vida pós-natal, podemos sugerir que o fluxo sanguíneo hipocampal e estriatal do grupo subnutrido pode estar diminuído nessa janela temporal, e que essa mudança no fluxo sanguíneo pode estar associada às mudanças no tamanho da ninhada. Se essa diferença permanecerá em fases mais tardias de vida, é uma questão que merece futuras investigações.

Outros estudos têm descrito que o exercício aeróbico moderado (e.g. caminhada) induz o aumento do fluxo sanguíneo, mediado pelo óxido nítrico (Nakajima *et al*, 2003). Tem sido demonstrado também uma relação estreita entre exercício físico, atividade nitrérgica e fluxo sanguíneo estriatal (Santizo *et al*, 2000; Encinas *et al*, 2004; Gertz *et al*, 2006).

No presente estudo, a atividade física voluntária nas rodinhas de correr promoveu um aumento da atividade nitrérgica em todas as camadas de CA1 dos animais do grupo *SnE*. Estes resultados corroboram outros estudos acerca dos efeitos do exercício na atividade histoquímica da NADPH-diaforase no hipocampo e estriado (Torres *et al*, 2006).

Uma vez que a redução da atividade nitrérgica apresentada pelo grupo subnutrido no giro denteado, CA3 e estriado não foi completamente recuperada pela reabilitação nutricional associada à atividade física no presente estudo, podemos diante disso supor que a subnutrição perinatal precoce produz danos severos na atividade nitrérgica, e que esses danos apresentam-se de forma diferente, podendo ser permanentes ou transitórios em diferentes regiões cerebrais, de acordo com estudos previamente realizados que demonstram que as alterações nutricionais nas primeiras fases de vida afetam diferentemente as diferentes regiões cerebrais (Morgane *et al*, 2002).

Diante do exposto, é razoável sugerir que no presente estudo, o exercício pode ter contribuído para o aumento do fluxo sanguíneo local no hipocampo e estriado, mediado pela produção de óxido nítrico.

5.1.2 – Mudanças histoquímicas da NADPH-diaforase, plasticidade sináptica, neurogênese, desempenho no teste de aprendizado espacial e isolamento social.

Outra contribuição importante do óxido nítrico no sistema nervoso é a plasticidade sináptica. Tem sido bem descrito na literatura que o exercício físico promove um aumento na expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF- *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) (Berchtold *et al*, 2005; Huang *et al*, 2006), e dos níveis de proteínas sinápticas reguladas pelo BDNF (Vaynman *et al*, 2006). Tem sido descrita também uma alça de *feedback* positivo entre o óxido nítrico e o BDNF (Cheng *et al*, 2003; Chen *et al*, 2006), e que a produção de óxido nítrico é necessária para promover um aumento do BDNF induzido pelo exercício (Chen *et al*, 2006).

A atividade física voluntária nas rodinhas de correr aumenta a LTP na camada molecular do giro denteado, a neurogênese na camada granular do giro denteado, assim como apresenta resultados positivos em testes de aprendizado espacial (van Praag *et al*, 1999). Blokland e colaboradores demonstraram evidências de que a inibição local das sintases do óxido nítrico no hipocampo não

prejudica a latência de escape nos testes no labirinto aquático de Morris em ratos, concluindo que o óxido nítrico não está criticamente envolvido na memória espacial (Blokland *et al*, 1999). Em discordância a este dado, mais recentemente, Chien e colaboradores demonstraram que a via óxido nítrico-GMPc-PKG está envolvida nos mecanismos que sustentam o aprendizado espacial, através da utilização do YC1, um potente ativador da via óxido nítrico-guanilato ciclase, obtendo uma redução significativa das latências de escape no teste do labirinto aquático (Chien *et al*, 2005). No mesmo trabalho, Chien e colaboradores também relataram o efeito impactante do L-NAME, um inibidor das sintases do óxido nítrico, assim como de outros inibidores (KT5823 e Rp-8-Br-PET-cGMPS) sobre o aprendizado e a memória.

Observando-se as taxas de aprendizado mostradas na figura 14, é bastante notável que os animais inativos isolados apresentaram desempenhos inferiores no teste do labirinto aquático comparados aos desempenhos apresentados pelos animais inativos criados em duplas. Em consonância com esse dado, a atividade nitrérgica se apresenta mais baixa nos animais isolados em relação aos animais criados em duplas. O grupo exercício isolado, por sua vez, revelou uma taxa de aprendizado superior ao do grupo exercício criado em duplas. Entretanto, a atividade nitrérgica do grupo exercício criado em duplas se apresentou significativamente maior que a do grupo exercício isolado. Considerando-se esses dados, podemos supor que o exercício físico contribui de forma mais significativa na consolidação da memória espacial e da atividade nitrérgica sob condições desfavoráveis como desequilíbrios nutricionais e isolamento social, do que sob condições favoráveis.

No presente estudo, as mudanças na atividade nitrérgica não foram acompanhadas por um aumento na taxa de aprendizado espacial nos testes no modelo utilizado do labirinto aquático de Morris, previamente descrito (Torres *et al*, 2006). No estudo anterior, realizado em nosso laboratório por Torres e colaboradores, os animais foram criados isolados (um em cada gaiola) desde o 21º dia de vida pós-natal, enquanto que no presente estudo os animais foram criados em pares (dois por gaiola), pelo mesmo período. Em outras palavras, a atividade

histoquímica da NADPH-diaforase nas camadas hipocampais é significativamente mais alta nos animais criados em pares que nos animais criados isolados, em todas as camadas do giro dentado e CA1. A melhora do desempenho nos testes de aprendizado espacial relacionada ao exercício nos animais do grupo isolado correlaciona-se com o aumento da atividade nitrérgica promovido pelo exercício nesse grupo nas camadas polimórfica e molecular do giro dentado e na camada lacunoso molecular de CA1. Entretanto, o exercício não provocou alterações na atividade nitrérgica ou no desempenho nos testes de aprendizado espacial dos animais criados em condições de convívio social (pares) no presente estudo.

Uma vez que os grupos controle do presente estudo e os do estudo desenvolvido por Torres e colaboradores em nosso laboratório (Torres *et al*, 2006) foram manipulados sob condições experimentais idênticas, exceto pela presença ou ausência de oportunidade de interação social, podemos atribuir os resultados negativos acerca do papel do exercício na alteração da atividade nitrérgica e no desempenho em testes de aprendizado espacial observados no presente estudo à condição de interação social. É possível também que a memória espacial não tenha sido apreciavelmente afetada pelo modelo de alteração nutricional adotado no presente estudo, ou, alternativamente, que o possível dano que possa ter ocorrido em decorrência da subnutrição perinatal possa ter sido recuperado após o desmame, quando os animais obtiveram acesso à água e ração *ad libitum*.

Estudos anteriores investigando a memória espacial em ratos revelaram que a interação social nas primeiras fases de vida e o isolamento afetam o aprendizado no labirinto aquático de Morris de forma distinta. Na vida adulta, os animais que sofreram isolamento durante as primeiras fases de vida aprenderam a encontrar a plataforma escondida com menores latências de escape e mais rapidamente que os animais do grupo que foi criado sob condições de interação social (Wongwitdecha e Marsden, 1996; Frisone *et al*, 2002; Schrijver *et al*, 2002). Ainda, o estresse provocado pelo isolamento social apresenta um efeito no aprendizado espacial em ratos dependente da idade (Frisone *et al*, 2002).

Nos estudos que realizamos no presente trabalho, não foram encontradas diferenças significativas nos desempenhos dos grupos subnutrido e controle nos

testes de aprendizado espacial. Estudos anteriores acerca da consolidação da memória espacial e a influência realizada pela subnutrição nas primeiras fases de vida revelaram que o livre acesso à água e comida são suficientes para recuperar o desempenho de memória espacial (Lukoyanov e Andrade, 2000). Uma vez que os nossos dados no labirinto aquático foram obtidos após o período de recuperação nutricional, era esperado que os possíveis déficits no aprendizado espacial fossem recuperados antes do período de testes. Em contraste, Cordoba e colaboradores (Cordoba *et al*, 1994) relataram que a recuperação nutricional não foi suficiente para melhorar o desempenho de ratos adultos no labirinto aquático de Morris. Se essas conclusões opostas devem-se ou não a diferentes abordagens experimentais do modelo de labirinto aquático é uma questão que permanece em aberto.

Aparentemente, a subnutrição retarda o desenvolvimento da atividade nitrérgica no estriado, e o livre acesso à água e ração não é suficiente para recuperar a atividade nitrérgica dos animais subnutridos aos níveis encontrados no grupo controle, pelo menos até o 58º dia de vida pós-natal. É fato bem descrito na literatura que o óxido nítrico desempenha um importante papel na circuitaria estriatal (West e Galloway, 1998; Doreulee *et al*, 2003), estando envolvido no comportamento motor (Del Bel *et al*, 2005), e que os desequilíbrios nutricionais têm efeito prejudicial sobre o sistema estriatal de neurotransmissores (Alamy *et al*, 2005).

Araki e colaboradores (Araki *et al*, 2001) observaram que a inibição das sintases do óxido nítrico levam a déficits motores. Contudo, poderíamos esperar uma modulação da expressão das sintases do óxido nítrico no estriado induzida pelo exercício. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que o exercício físico induz o aumento na densidade de ramos nos neurônios NADPH-diaforase positivo tipo I no estriado (Torres *et al*, 2006).

Finalmente, existem relatos indicando que a má nutrição durante o período pré-natal reduz a neurogênese na camada granular do giro denteado (Debassio *et al*, 1996; King *et al*, 2004). Os níveis de produção do óxido nítrico parecem estar associados a um aumento da neurogênese, tanto *in vitro* (Covacu *et al*, 2006) quanto *in vivo* (Romero-Grimaldi *et al*, 2006).

A indução de estresse é outro fator que parece inibir a neurogênese (Pinnock *et al*, 2007), sendo importante investigar se os desequilíbrios nutricionais durante as primeiras fases de vida podem desencadear cascatas de sinalização relacionadas ao estresse, de modo a compreender como esses fatores interagem e afetam o desenvolvimento do hipocampo e estriado. Uma vez que no presente estudo não verificamos a taxa de neurogênese ou morte celular, a questão sobre como as alterações nutricionais nas primeiras fases de vida seguidas de reabilitação nutricional interagem e afetam a neurogênese no estriado e hipocampo em camundongos suíços albinos permanece em aberto.

5.2 – Considerações técnicas

Três diferentes isoformas da enzima sintase do óxido nítrico são reconhecidas: sintase do óxido nítrico neuronal (SONn), sintase do óxido nítrico induzida (SONi) e sintase do óxido nítrico endotelial (SONe), ver (Berdeaux, 1993; Paakkari e Lindsberg, 1995) para revisão. No presente trabalho, utilizamos a histoquímica da NADPH-diaforase, que reflete a atividade de todas as isoformas da enzima de síntese do óxido nítrico. Estudos anteriores utilizando dupla marcação para NADPH-diaforase e imunohistoquímica para SONn revelaram que a atividade diaforásica colocaliza com a imunomarcação para a SONn no estriado e na maioria das camadas hipocampais (Hope *et al*, 1991). Entretanto, a forte marcação diaforásica na camada lacunoso molecular não colocaliza com a imunopositividade para a SONn (Burette *et al*, 2002; Picanco-Diniz *et al*, 2004). É possível que a camada lacunoso molecular apresente outra isoforma da sintase do óxido nítrico que não a SONn, e hipotetizamos que a primeira candidata a ser investigada seja a SONe, por causa da proximidade dos vasos sanguíneos da fissura hipocampal.

Em lâminas de estriado de ratos, injeções intracelulares de biocitina seguidas de dupla marcação para a histoquímica da NADPH-diaforase e imunohistoquímica para SONn revelaram que os neurônios NADPH-diaforase positivos tipo I são interneurônios de circuito local (Kawaguchi, 1993).

Uma vez que observamos que o exercício aumenta a atividade nitrérgica, é importante enfatizar que a NADPH-diaforase é uma enzima dependente de atividade, tendo os *inputs* sinápticos um efeito maior na atividade da SONn do que na sua expressão protéica (Weruaga *et al*, 2000). O produto da sintase do óxido nítrico é de grande importância para o modelo de plasticidade sináptica dependente de atividade envolvendo o aumento permanente de neurotransmissão excitatória (von Bohlen und Halbach *et al*, 2002).

Diante do exposto, é razoável supor que no presente estudo a maior parte da atividade histoquímica da NADPH-diaforase revela a atividade da SONn tanto no hipocampo quanto no estriado.

Concluindo, as alterações nutricionais durante o período de rápido crescimento cerebral podem afetar a atividade nitrérgica de forma permanente e/ou transitória, afetando as áreas hipocampais e estriatais diferentemente.

Em CA1 e no giro denteado, a recuperação nutricional não associada ao exercício é insuficiente para recuperar a atividade nitrérgica dos animais subnutridos. O exercício contribui para a recuperação parcial da atividade nitrérgica hipocampal, sendo um fator-chave para o aumento da atividade nitrérgica aos níveis do grupo controle em CA1 no hipocampo.

O estriado exibe um desenvolvimento tardio da atividade nitrérgica, diferentemente do que foi observado no hipocampo.

Finalmente, parece que o exercício sob condições inadequadas de desenvolvimento age na regulação da atividade nitrérgica e na melhora da aprendizagem espacial de forma mais efetiva do que sob condições adequadas.

6 – Referências bibliográficas

Adlard, P. A., Perreau, V. M., Pop, V., Cotman, C. W. (2005). "Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* 25(17): 4217-21.

Akassoglou, K. (2005). "Nerve growth factor-independent neuronal survival: a role for NO donors." *Mol Pharmacol* 68(4): 952-5.

Alamy, M., Errami, M., Taghzouti, K., Saddiki-Traki, F. Bengelloun, W. A. (2005). "Effects of postweaning undernutrition on exploratory behavior, memory and sensory reactivity in rats: implication of the paminergic system." *Physiol Behav* 86(1-2): 195-202.

Anderson, B. J., Rapp, D. N., Baek, D. H., McCloskey, D. P., Coburn-Litvak, P. S. Robinson, J. K. (2000). "Exercise influences spatial learning in the radial arm maze." *Physiol Behav* 70(5): 425-9.

Ang, E. T., Wong, P. T., Moochhala, S. Ng, Y. K. (2003). "Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors?" *Neuroscience* 118(2): 335-45.

Araki, T., Mizutani, H., Matsubara, M., Imai, Y., Mizugaki, M. Itoyama, Y. (2001). "Nitric oxide synthase inhibitors cause motor deficits in mice." *Eur Neuropsychopharmacol* 11(2): 125-33.

Ayres, M. A. J. M. A. D. L. S. A. S. d. (2005). Bioestat: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas.

Beesley, J. E. (1995). "Histochemical methods for detecting nitric oxide synthase." *Histochem J* 27(10): 757-69.

Benitez-Bribiesca, L., De la Rosa-Alvarez, I. Mansilla-Olivares, A. (1999). "Dendritic spine pathology in infants with severe protein-calorie malnutrition." *Pediatrics* 104(2): e21.

Bennett, M. R. (2000). "The concept of long term potentiation of transmission at synapses." *Prog Neurobiol* 60(2): 109-37.

Berchtold, N. C., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J. P. Cotman, C. W. (2005). "Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus." *Neuroscience* 133(3): 853-61.

Berdeaux, A. (1993). "Nitric oxide: an ubiquitous messenger." *Fundam Clin Pharmacol* 7(8): 401-11.

Bishop, A. Anderson, J. E. (2005). "NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological." *Toxicology* 208(2): 193-205.

Black, J. E., Isaacs, K. R., Anderson, B. J., Alcantara, A. A. Greenough, W. T. (1990). "Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(14): 5568-72.

Blackshaw, S., Eliasson, M. J., Sawa, A., Watkins, C. C., Krug, D., Gupta, A., Arai, T., Ferrante, R. J. Snyder, S. H. (2003). "Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity." *Neuroscience* 119(4): 979-90.

Blokland, A., de Vente, J., Prickaerts, J., Honig, W., Markerink-van Ittersum, M. Steinbusch, H. (1999). "Local inhibition of hippocampal nitric oxide synthase does not impair place learning in the Morris water escape task in rats." *Eur J Neurosci* 11(1): 223-32.

Bon, C. L. Garthwaite, J. (2001). "Exogenous nitric oxide causes potentiation of hippocampal synaptic transmission during low-frequency stimulation via the endogenous nitric oxide-cGMP pathway." *Eur J Neurosci* 14(4): 585-94.

Bon, C. L. Garthwaite, J. (2003). "On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation." *J Neurosci* 23(5): 1941-8.

Bonthius, D. J. West, J. R. (1991). "Permanent neuronal deficits in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt." *Teratology* 44(2): 147-63.

Borba, J. M., Araujo, M. S., Picanco-Diniz, C. W., Manhaes-de-Castro, R. Guedes, R. C. (2000). "Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition." *Brain Res Bull* 53(2): 193-201.

Bronzino, J. D., Austin-LaFrance, R. J., Mokler, D. Morgane, P. J. (1997). "Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal long-term potentiation in freely moving rats." *Exp Neurol* 148(1): 317-23.

Bruel-Jungerman, E., Laroche, S. Rampon, C. (2005). "New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment." *Eur J Neurosci* 21(2): 513-21.

Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H. Valtschanoff, J. G. (2002). "Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus." *J Neurosci* 22(20): 8961-70.

Buwalda, B., Nyakas, C., Gast, J., Luiten, P. G. Schmidt, H. H. (1995). "Aldehyde fixation differentially affects distribution of diaphorase activity but not of nitric oxide synthase immunoreactivity in rat brain." *Brain Res Bull* 38(5): 467-73.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G. A. Bernardi, G. (1999). "Glutamate-triggered events inducing corticostriatal long-term depression." *J Neurosci* 19(14): 6102-10.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G. A., Pisani, A., Sancesario, G. Bernardi, G. (2000). "Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration." *Prog Neurobiol* 61(3): 231-65.

Calka, J. Wolf, G. (2003). "An ultrastructural demonstration of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase activity in the rat striatal astroglia." *Folia Morphol (Warsz)* 62(3): 251-3.

Chakraborty, S., Anderson, M. I., Chaudhry, A. M., Mumford, J. C. Jeffery, K. J. (2004). "Context-independent directional cue learning by hippocampal place cells." *Eur J Neurosci* 20(1): 281-92.

Chen, L., Gong, S., Shan, L. D., Xu, W. P., Zhang, Y. J., Guo, S. Y., Hisamitsu, T., Yin, Q. Z. Jiang, X. H. (2006). "Effects of exercise on neurogenesis in the dentate gyrus and ability of learning and memory after hippocampus lesion in adult rats." *Neurosci Bull* 22(1): 1-6.

Chen, M. J., Ivy, A. S. Russo-Neustadt, A. A. (2006). "Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression." *Brain Res Bull* 68(4): 257-68.

Chen, W. J., King, K. A., Lee, R. E., Sedtal, C. S. Smith, A. M. (2006). "Effects of nicotine exposure during prenatal or perinatal period on cell numbers in adult rat hippocampus and cerebellum: a stereology study." *Life Sci* 79(23): 2221-7.

Chen, Y. C., Chen, Q. S., Lei, J. L. Wang, S. L. (1998). "Physical training modifies the age-related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse." *Brain Res* 806(2): 238-45.

Cheng, A., Wang, S., Cai, J., Rao, M. S. Mattson, M. P. (2003). "Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain." *Dev Biol* 258(2): 319-33.

Chien, W. L., Liang, K. C., Teng, C. M., Kuo, S. C., Lee, F. Y. Fu, W. M. (2003). "Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole." *Mol Pharmacol* 63(6): 1322-8.

Chien, W. L., Liang, K. C., Teng, C. M., Kuo, S. C., Lee, F. Y. Fu, W. M. (2005). "Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxide-guanylate cyclase activator YC-1." *Eur J Neurosci* 21(6): 1679-88.

Chung, Y. H., Kim, Y. S. Lee, W. B. (2004). "Distribution of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the cerebral cortex and hippocampus during postnatal development." *J Mol Histol* 35(8-9): 765-70.

Colcombe, S. Kramer, A. F. (2003). "Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study." *Psychol Sci* 14(2): 125-30.

Comery, T. A., Stamoudis, C. X., Irwin, S. A. Greenough, W. T. (1996). "Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment." *Neurobiol Learn Mem* 66(2): 93-6.

Cordero, M. E., Valenzuela, C. Y., Rodriguez, A. Aboitiz, F. (2003). "Dendritic morphology and orientation of pyramidal cells of the neocortex in two groups of early postnatal undernourished-rehabilitated rats." *Brain Res Dev Brain Res* 142(1): 37-45.

Cordoba, N. E., Arolfo, M. P., Brioni, J. D. Orsingher, O. A. (1994). "Perinatal undernutrition impairs spatial learning in recovered adult rats." *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 44(3): 70-6.

Cotman, C. W. Berchtold, N. C. (2002). "Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity." *Trends Neurosci* 25(6): 295-301.

Covacu, R., Danilov, A. I., Rasmussen, B. S., Hallen, K., Moe, M. C., Lobell, A., Johansson, C. B., Svensson, M. A., Olsson, T. Brundin, L. (2006). "Nitric oxide exposure diverts neural stem cell fate from neurogenesis towards astroglialogenesis." *Stem Cells* 24(12): 2792-800.

Czeh, B., Hajnal, A. Seress, L. (2005). "NADPH-diaphorase positive neurons of the rat hippocampal formation: regional distribution, total number and colocalization with calcium binding proteins." *Prague Med Rep* 106(3): 261-74.

Czurko, A., Hirase, H., Csicsvari, J. Buzsaki, G. (1999). "Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel." *Eur J Neurosci* 11(1): 344-52.

Das, U. N. (2003). "Can memory be improved? A discussion on the role of ras, GABA, acetylcholine, NO, insulin, TNF-alpha, and long-chain polyunsaturated fatty acids in memory formation and consolidation." *Brain Dev* 25(4): 251-61.

Dawson, T. M., Bredt, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M. Snyder, S. H. (1991). "Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17): 7797-801.

Debassio, W. A., Kemper, T. L., Tonkiss, J. Galler, J. R. (1996). "Effect of prenatal protein deprivation on postnatal granule cell generation in the hippocampal dentate gyrus." *Brain Res Bull* 41(6): 379-83.

Del Bel, E. A., Guimaraes, F. S., Bermudez-Echeverry, M., Gomes, M. Z., Schiaveto-de-souza, A., Padovan-Neto, F. E., Tumas, V., Barion-Cavalcanti, A. P., Lazzarini, M., Nucci-da-Silva, L. P. de Paula-Souza, D. (2005). "Role of nitric oxide on motor behavior." *Cell Mol Neurobiol* 25(2): 371-92.

Derrick, B. E., York, A. D. Martinez, J. L., Jr. (2000). "Increased granule cell neurogenesis in the adult dentate gyrus following mossy fiber stimulation sufficient to induce long-term potentiation." *Brain Res* 857(1-2): 300-7.

DiCarlo, S. E., Zheng, H., Collins, H. L., Rodenbaugh, D. W. Patel, K. P. (2002). "Daily exercise normalizes the number of diaphorase (NOS) positive neurons in the hypothalamus of hypertensive rats." *Brain Res* 955(1-2): 153-60.

Ding, Y., Li, J., Luan, X., Ding, Y. H., Lai, Q., Rafols, J. A., Phillis, J. W., Clark, J. C. Diaz, F. G. (2004). "Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin." *Neuroscience* 124(3): 583-91.

Doreulee, N., Sergeeva, O. A., Yanovsky, Y., Chepkova, A. N., Selbach, O., Godecke, A., Schrader, J. Haas, H. L. (2003). "Cortico-striatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice." *Brain Res* 964(1): 159-63.

Dragoi, G., Harris, K. D. Buzsaki, G. (2003). "Place representation within hippocampal networks is modified by long-term potentiation." *Neuron* 39(5): 843-53.

East, S. J., Parry-Jones, A. Brotchie, J. M. (1996). "Ionotropic glutamate receptors and nitric oxide synthesis in the rat striatum." *Neuroreport* 8(1): 71-5.

Elfering, S. L., Sarkela, T. M. Giulivi, C. (2002). "Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* 277(41): 38079-86.

Encinas, J. M., Fernandez, A. P., Salas, E., Castro-Blanco, S., Munoz, P., Rodrigo, J. Serrano, J. (2004). "Nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase after acute hypobaric hypoxia in the rat caudate putamen." *Exp Neurol* 186(1): 33-45.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. Gage, F. H. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* 4(11): 1313-7.

Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H. Christie, B. R. (2004). "Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo." *Neuroscience* 124(1): 71-9.

Filho, M. Rissin, A. (2000). "A transicao nutricional no Brasil: tendencias regionais e temporais." *Cad Saude Publica* 19(1): 181-191.

Frisone, D. F., Frye, C. A. Zimmerberg, B. (2002). "Social isolation stress during the third week of life has age-dependent effects on spatial learning in rats." *Behav Brain Res* 128(2): 153-60.

Gengler, S., Mallot, H. A. Holscher, C. (2005). "Inactivation of the rat dorsal striatum impairs performance in spatial tasks and alters hippocampal theta in the freely moving rat." *Behav Brain Res* 164(1): 73-82.

Gertz, K., Priller, J., Kronenberg, G., Fink, K. B., Winter, B., Schrock, H., Ji, S., Milosevic, M., Harms, C., Bohm, M., Dirnagl, U., Laufs, U. Endres, M. (2006). "Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow." *Circ Res* 99(10): 1132-40.

Gordon, N. (1997). "Nutrition and cognitive function." *Brain Dev* 19(3): 165-70.

Gotti, S., Sica, M., Viglietti-Panzica, C. Panzica, G. (2005). "Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain." *Microsc Res Tech* 68(1): 13-35.

Grozdanic, Z., Nakos, G., Mayer, B. Gossrau, R. (1995). "A modified method allows for correlation between NADPH-diaphorase histochemistry and immunohistochemistry for the demonstration of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)." *Folia Histochem Cytobiol* 33(1): 11-8.

Guix, F. X., Uribesalgo, I., Coma, M. Munoz, F. J. (2005). "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." *Prog Neurobiol* 76(2): 126-52.

Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F. Barnes, C. A. (2000). "Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory." *J Neurosci* 20(11): 3993-4001.

Haley, J. E. (1998). "Gases as neurotransmitters." *Essays Biochem* 33: 79-91.

Hartley, M., Taylor, N. Taylor, J. (2005). "Subfield variations in hippocampal processing-components of a spatial navigation system." *Neural Netw* 18(5-6): 611-9.

Hartley, T. Burgess, N. (2005). "Complementary memory systems: competition, cooperation and compensation." *Trends Neurosci* 28(4): 169-70.

Hawkins, R. D., Son, H. Arancio, O. (1998). "Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus." *Prog Brain Res* 118: 155-72.

Holscher, C. (1997). "Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity." *Trends Neurosci* 20(7): 298-303.

Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M. Vincent, S. R. (1991). "Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2811-4.

Huang, A. M., Jen, C. J., Chen, H. F., Yu, L., Kuo, Y. M. Chen, H. I. (2006). "Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor." *J Neural Transm* 113(7): 803-11.

Huang, E. P. (1997). "Synaptic plasticity: a role for nitric oxide in LTP." *Curr Biol* 7(3): R141-3.

Huang, L. T., Lai, M. C., Wang, C. L., Wang, C. A., Yang, C. H., Hsieh, C. S., Liou, C. W. Yang, S. N. (2003). "Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB(Serine-133) phosphorylation." *Brain Res Dev Brain Res* 145(2): 213-8.

Ioroi, T., Yonetani, M. Nakamura, H. (1998). "Effects of hypoxia and reoxygenation on nitric oxide production and cerebral blood flow in developing rat striatum." *Pediatr Res* 43(6): 733-7.

Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A. Barros, D. M. (1999). "Separate mechanisms for short- and long-term memory." *Behav Brain Res* 103(1): 1-11.

Jansson, A., Mazel, T., Andbjør, B., Rosen, L., Guidolin, D., Zoli, M., Sykova, E., Agnati, L. F. Fuxe, K. (1999). "Effects of nitric oxide inhibition on the spread of biotinylated dextran and on extracellular space parameters in the neostriatum of the male rat." *Neuroscience* 91(1): 69-80.

Johnson, R. A. Mitchell, G. S. (2003). "Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain." *Brain Res* 983(1-2): 108-14.

Johnson, R. A., Rhodes, J. S., Jeffrey, S. L., Garland, T., Jr. Mitchell, G. S. (2003). "Hippocampal brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 increases more in mice selected for increased voluntary wheel running." *Neuroscience* 121(1): 1-7.

Jorgenson, L. A., Wobken, J. D. Georgieff, M. K. (2003). "Perinatal iron deficiency alters apical dendritic growth in hippocampal CA1 pyramidal neurons." *Dev Neurosci* 25(6): 412-20.

Karten, Y. J., Olariu, A. Cameron, H. A. (2005). "Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood." *Trends Neurosci* 28(4): 171-2.

Katayama, T., Imaizumi, K., Manabe, T., Hitomi, J., Kudo, T. Tohyama, M. (2004). "Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease." *J Chem Neuroanat* 28(1-2): 67-78.

Katz, H. B. Davies, C. A. (1982). "The effects of early-life undernutrition and subsequent environment on morphological parameters of the rat brain." *Behav Brain Res* 5(1): 53-64.

Kawaguchi, Y. (1993). "Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum." *J Neurosci* 13(11): 4908-23.

Kehoe, P., Mallinson, K., Bronzino, J. McCormick, C. M. (2001). "Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness." *Brain Res Dev Brain Res* 132(1): 23-31.

Keller, E. A. Murua, S. V. (1997). "Effect of perinatal malnutrition on the inactive behavior induced by long-term shock and conditioned analgesia." *Physiol Behav* 62(6): 1231-4.

Kimura, A., Okada, K., Sato, A. Suzuki, H. (1994). "Regional cerebral blood flow in the frontal, parietal and occipital cortices increases independently of systemic arterial pressure during slow walking in conscious rats." *Neurosci Res* 20(4): 309-15.

King, R. S., DeBassio, W. A., Kemper, T. L., Rosene, D. L., Tonkiss, J., Galler, J. R. Blatt, G. J. (2004). "Effects of prenatal protein malnutrition and acute postnatal stress on granule cell genesis in the fascia dentata of neonatal and juvenile rats." *Brain Res Dev Brain Res* 150(1): 9-15.

Kleim, J. A., Cooper, N. R. VandenBerg, P. M. (2002). "Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex." *Brain Res* 934(1): 1-6.

Kleim, J. A., Swain, R. A., Czerlanis, C. M., Kelly, J. L., Pipitone, M. A. Greenough, W. T. (1997). "Learning-dependent dendritic hypertrophy of cerebellar stellate cells: plasticity of local circuit neurons." *Neurobiol Learn Mem* 67(1): 29-33.

Koo, J. W., Park, C. H., Choi, S. H., Kim, N. J., Kim, H. S., Choe, J. C. Suh, Y. H. (2003). "The postnatal environment can counteract prenatal effects on cognitive ability, cell proliferation, and synaptic protein expression." *FASEB J* 17(11): 1556-8.

Kramer, A. F., Colcombe, S. J., McAuley, E., Eriksen, K. I., Scalf, P., Jerome, G. J., Marquez, D. X., Elavsky, S. Webb, A. G. (2003). "Enhancing brain and cognitive function of older adults through fitness training." *J Mol Neurosci* 20(3): 213-21.

Kramer, A. F., Hahn, S., Cohen, N. J., Banich, M. T., McAuley, E., Harrison, C. R., Chason, J., Vakil, E., Bardell, L., Boileau, R. A. Colcombe, A. (1999). "Ageing, fitness and neurocognitive function." *Nature* 400(6743): 418-9.

Larkman, A. U. Jack, J. J. (1995). "Synaptic plasticity: hippocampal LTP." *Curr Opin Neurobiol* 5(3): 324-34.

Law, A., O'Donnell, J., Gauthier, S. Quirion, R. (2002). "Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats." *Neuroscience* 112(2): 267-75.

Lee, H. H., Kim, H., Lee, M. H., Chang, H. K., Lee, T. H., Jang, M. H., Shin, M. C., Lim, B. V., Shin, M. S., Kim, Y. P., Yoon, J. H., Jeong, I. G. Kim, C. J. (2003). "Treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats." *Neurosci Lett* 352(1): 33-6.

Lee, M. H., Shin, M. S., Sim, Y. J., Kim, H., Lee, H. H., Kim, C. J., Park, C., Hong, S. P. Cho, S. (2005). "Treadmill exercise enhances nitric oxide synthase expression in the hippocampus of food-deprived rats." *Nutrition Research* 25: 771-779.

Leuner, B., Gould, E. Shors, T. J. (2006). "Is there a link between adult neurogenesis and learning?" *Hippocampus* 16(3): 216-24.

Li, H. Poulos, T. L. (2005). "Structure-function studies on nitric oxide synthases." *J Inorg Biochem* 99(1): 293-305.

Lister, J. P., Blatt, G. J., DeBassio, W. A., Kemper, T. L., Tonkiss, J., Galler, J. R. Rosene, D. L. (2005). "Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation." *Hippocampus* 15(3): 393-403.

Lomo, T. (2003). "The discovery of long-term potentiation." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1432): 617-20.

Lovick, T. A., Brown, L. A. Key, B. J. (1999). "Neurovascular relationships in hippocampal slices: physiological and anatomical studies of mechanisms underlying

flow-metabolism coupling in intraparenchymal microvessels." *Neuroscience* 92(1): 47-60.

Lukoyanov, N. V. Andrade, J. P. (2000). "Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation." *Behav Brain Res* 112(1-2): 85-97.

Lynch, M. A. (2004). "Long-term potentiation and memory." *Physiol Rev* 84(1): 87-136.

Madsen, T. M., Kristjansen, P. E., Bolwig, T. G. Wortwein, G. (2003). "Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat." *Neuroscience* 119(3): 635-42.

Maia, L. M., Frazao, M. F., Souza, T. K., Silva, M. B., Rocha-de-Melo, A. P., Picanco-Diniz, C. W., Amancio-dos-Santos, A. Guedes, R. C. (2006). "L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats." *Brain Res* 1072(1): 19-25.

Makrides, M., Neumann, M., Simmer, K., Pater, J. Gibson, R. (1995). "Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy?" *Lancet* 345(8963): 1463-8.

McCloskey, D. P., Adamo, D. S. Anderson, B. J. (2001). "Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus." *Brain Res* 891(1-2): 168-75.

McLellan, M. E., Kajdasz, S. T., Hyman, B. T. Bacskai, B. J. (2003). "In vivo imaging of reactive oxygen species specifically associated with thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy." *J Neurosci* 23(6): 2212-7.

Medina, J. H. Izquierdo, I. (1995). "Retrograde messengers, long-term potentiation and memory." *Brain Res Brain Res Rev* 21(2): 185-94.

Mizumori, S. J. (2006). "Hippocampal place fields: a neural code for episodic memory?" *Hippocampus* 16(9): 685-90.

Mogensen, J., Wortwein, G., Gustafson, B. Ermens, P. (1995). "L-nitroarginine reduces hippocampal mediation of place learning in the rat." *Neurobiol Learn Mem* 64(1): 17-24.

Mogensen, J., Wortwein, G., Hasman, A., Nielsen, P. Wang, Q. (1995). "Functional and neurochemical profile of place learning after L-nitro-arginine in the rat." *Neurobiol Learn Mem* 63(1): 54-65.

Molteni, R., Ying, Z. Gomez-Pinilla, F. (2002). "Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray." *Eur J Neurosci* 16(6): 1107-16.

Morgane, P. J., Mokler, D. J. Galler, J. R. (2002). "Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation." *Neurosci Biobehav Rev* 26(4): 471-83.

Moritz, G. C., Tenorio, F., Allodi, S. Mendez-Otero, R. (1999). "Expression of nitric oxide synthase in the developing rat hippocampus." *Neurosci Lett* 263(2-3): 89-92.

Morys, J. M., Kowianski, P. Morys, J. (2002). "Distribution of nitric oxide synthase and neuropeptide Y neurones during the development of the hippocampal formation in the rat." *Folia Morphol (Warsz)* 61(4): 221-32.

Murata, Y. Masuko, S. (2003). "Developing patterns of nitric oxide synthesizing neurons in the rat striatum: histochemical analysis." *Brain Res Dev Brain Res* 141(1-2): 91-9.

Nakajima, K., Uchida, S., Suzuki, A., Hotta, H. Aikawa, Y. (2003). "The effect of walking on regional blood flow and acetylcholine in the hippocampus in conscious rats." *Auton Neurosci* 103(1-2): 83-92.

Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A. Tonegawa, S. (2004). "NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory." *Nat Rev Neurosci* 5(5): 361-72.

Neeper, S. A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J. Cotman, C. (1995). "Exercise and brain neurotrophins." *Nature* 373(6510): 109.

Oermann, E., Bidmon, H. J., Mayer, B. Zilles, K. (1999). "Differential maturational patterns of nitric oxide synthase-I and NADPH diaphorase in functionally distinct cortical areas of the mouse cerebral cortex." *Anat Embryol (Berl)* 200(1): 27-41.

Paakkari, I. Lindsberg, P. (1995). "Nitric oxide in the central nervous system." *Ann Med* 27(3): 369-77.

Packard, M. G. (1999). "Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12881-6.

Packard, M. G. Knowlton, B. J. (2002). "Learning and memory functions of the Basal Ganglia." *Annu Rev Neurosci* 25: 563-93.

Picanço-Diniz, C. W., Araújo, M. S., Borba, J. M. C. Guedes, R. C. A. (1998). "NADPH-Diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the

visual cortex of adult rats malnourished during development." *Nutritional Neuroscience* 1: 35-48.

Picanco-Diniz, C. W., Boche, D., Gomes-Leal, W., Perry, V. H. Cunningham, C. (2004). "Neuropil and neuronal changes in hippocampal NADPH-diaphorase histochemistry in the ME7 model of murine prion disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* 30(3): 292-303.

Pietropaolo, S., Branchi, I., Cirulli, F., Chiarotti, F., Aloe, L. Alleva, E. (2004). "Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: social versus physical enrichment." *Physiol Behav* 81(3): 443-53.

Pinnock, S. B., Balendra, R., Chan, M., Hunt, L. T., Turner-Stokes, T. Herbert, J. (2007). "Interactions between nitric oxide and corticosterone in the regulation of progenitor cell proliferation in the dentate gyrus of the adult rat." *Neuropsychopharmacology* 32(2): 493-504.

Poucet, B., Lenck-Santini, P. P., Paz-Villagran, V. Save, E. (2003). "Place cells, neocortex and spatial navigation: a short review." *J Physiol Paris* 97(4-6): 537-46.

Purves, D. (2001). *Neuroscience*. USA, Sinauer Associates.

Quirk, G. J., Mejia, W. R., Hesse, H. Su, H. (1995). "Early malnutrition followed by nutritional restoration lowers the conduction velocity and excitability of the corticospinal tract." *Brain Res* 670(2): 277-82.

Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., Nyakas, C. Goto, S. (1999). "The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes." *Free Radic Biol Med* 27(1-2): 69-74.

Radak, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Kaneko, T., Tahara, S., Ohno, H. Goto, S. (2001). "Single bout of exercise eliminates the immobilization-induced oxidative stress in rat brain." *Neurochem Int* 39(1): 33-8.

Ragozzino, K. E., Leutgeb, S. Mizumori, S. J. (2001). "Dorsal striatal head direction and hippocampal place representations during spatial navigation." *Exp Brain Res* 139(3): 372-6.

Ragozzino, M. E. Choi, D. (2004). "Dynamic changes in acetylcholine output in the medial striatum during place reversal learning." *Learn Mem* 11(1): 70-7.

Ramsden, M., Berchtold, N. C., Patrick Kesslak, J., Cotman, C. W. Pike, C. J. (2003). "Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion." *Brain Res* 971(2): 239-44.

Rhodes, J. S., van Praag, H., Jeffrey, S., Girard, I., Mitchell, G. S., Garland, T., Jr. Gage, F. H. (2003). "Exercise increases hippocampal neurogenesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running." *Behav Neurosci* 117(5): 1006-16.

Rocha-de-Melo, A. P., Picanco-Diniz, C. W., Borba, J. M., Santos-Monteiro, J. Guedes, R. C. (2004). "NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes." *Nutr Neurosci* 7(4): 207-16.

Romero-Grimaldi, C., Gheusi, G., Lledo, P. M. Estrada, C. (2006). "Chronic inhibition of nitric oxide synthesis enhances both subventricular zone neurogenesis and olfactory learning in adult mice." *Eur J Neurosci* 24(9): 2461-70.

Rotta, L. N., Nogueira, C. W., da Silva, L., Soares, F. A., Perry, M. L. Souza, D. O. (2002). "Effect of undernutrition on GMP-PNP binding and adenylate cyclase activity from rat brain." *Cell Mol Neurobiol* 22(3): 365-72.

Roullet, P., Sargolini, F., Oliverio, A. Mele, A. (2001). "NMDA and AMPA antagonist infusions into the ventral striatum impair different steps of spatial information processing in a nonassociative task in mice." *J Neurosci* 21(6): 2143-9.

Sander, S. E., Hamann, M. Richter, A. (2006). "Age-related changes in striatal nitric oxide synthase-immunoreactive interneurons in the dystonic dtsz mutant hamster." *Neuropathol Appl Neurobiol* 32(1): 74-82.

Santizo, R., Baughman, V. L. Pelligrino, D. A. (2000). "Relative contributions from neuronal and endothelial nitric oxide synthases to regional cerebral blood flow changes during forebrain ischemia in rats." *Neuroreport* 11(7): 1549-53.

Scherer-Singler, U., Vincent, S. R., Kimura, H. McGeer, E. G. (1983). "Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry." *J Neurosci Methods* 9(3): 229-34.

Schmitzer-Torbert, N. Redish, A. D. (2004). "Neuronal activity in the rodent dorsal striatum in sequential navigation: separation of spatial and reward responses on the multiple T task." *J Neurophysiol* 91(5): 2259-72.

Schrijver, N. C., Bahr, N. I., Weiss, I. C. Wurbel, H. (2002). "Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats." *Pharmacol Biochem Behav* 73(1): 209-24.

Shepherd, G. M. (1990). The Synaptic Organization of the Brain. New York, Oxford University Press.

Shin, C. M., Chung, Y. H., Kim, M. J., Lee, E. Y., Kim, E. G. Cha, C. I. (2002). "Age-related changes in the distribution of nitrotyrosine in the cerebral cortex and hippocampus of rats." *Brain Res* 931(2): 194-9.

Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J. Wojtowicz, J. M. (2005). "A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory." *Neuroscience* 130(4): 843-52.

Snyder, J. S., Kee, N. Wojtowicz, J. M. (2001). "Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus." *J Neurophysiol* 85(6): 2423-31.

Son, H., Hawkins, R. D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P. L., Fishman, M. C. Kandel, E. R. (1996). "Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase." *Cell* 87(6): 1015-23.

Steffenach, H. A., Witter, M., Moser, M. B. Moser, E. I. (2005). "Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex." *Neuron* 45(2): 301-13.

Susswein, A. J., Katzoff, A., Miller, N. Hurwitz, I. (2004). "Nitric oxide and memory." *Neuroscientist* 10(2): 153-62.

Swain, R. A., Harris, A. B., Wiener, E. C., Dutka, M. V., Morris, H. D., Theien, B. E., Konda, S., Engberg, K., Lauterbur, P. C. Greenough, W. T. (2003). "Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat." *Neuroscience* 117(4): 1037-46.

Sweatt, J. D. (2004). "Hippocampal function in cognition." *Psychopharmacology (Berl)* 174(1): 99-110.

Teather, L. A., Packard, M. G., Smith, D. E., Ellis-Behnke, R. G. Bazan, N. G. (2005). "Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks." *Neurobiol Learn Mem* 84(2): 75-84.

Tomporowski, P. D. (2003). "Effects of acute bouts of exercise on cognition." *Acta Psychol (Amst)* 112(3): 297-324.

Tong, L., Shen, H., Perreau, V. M., Balazs, R. Cotman, C. W. (2001). "Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus." *Neurobiol Dis* 8(6): 1046-56.

Torres, J. B., Assuncao, J., Farias, J. A., Kahwage, R., Lins, N., Passos, A., Quinteiros, A., Trevia, N. Diniz, C. W. (2006). "NADPH-diaphorase histochemical changes in the hippocampus, cerebellum and striatum are correlated with different modalities of exercise and watermaze performances." *Exp Brain Res*.

Tsuchida, A., Handa, Y., Nojyo, Y. Kubota, T. (2001). "Ultrastructure of NADPH diaphorase-positive nerve fibers and their terminals in the rat cerebral arterial system." *J Chem Neuroanat* 21(4): 267-75.

Uysal, N., Tugyan, K., Kayatekin, B. M., Acikgoz, O., Bagriyanik, H. A., Gonenc, S., Ozdemir, D., Aksu, I., Topcu, A. Semin, I. (2005). "The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory." *Neurosci Lett* 383(3): 241-5.

Vaid, R. R., Yee, B. K., Rawlins, J. N. Totterdell, S. (1996). "NADPH-diaphorase reactive pyramidal neurons in Ammon's horn and the subiculum of the rat hippocampal formation." *Brain Res* 733(1): 31-40.

van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J. Gage, F. H. (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13427-31.

van Praag, H., Kempermann, G. Gage, F. H. (1999). "Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus." *Nat Neurosci* 2(3): 266-70.

Vaynman, S., Ying, Z. Gomez-Pinilla, F. (2003). "Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity." *Neuroscience* 122(3): 647-57.

Vaynman, S., Ying, Z. Gomez-Pinilla, F. (2004). "Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition." *Eur J Neurosci* 20(10): 2580-90.

Vaynman, S. S., Ying, Z., Yin, D. Gomez-Pinilla, F. (2006). "Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF." *Brain Res* 1070(1): 124-30.

Vincent, S. R. Hope, B. T. (1992). "Neurons that say NO." *Trends Neurosci* 15(3): 108-13.

Voermans, N. C., Petersson, K. M., Daudey, L., Weber, B., Van Spaendonck, K. P., Kremer, H. P. Fernandez, G. (2004). "Interaction between the human hippocampus and the caudate nucleus during route recognition." *Neuron* 43(3): 427-35.

von Bohlen und Halbach, O., Albrecht, D., Heinemann, U. Schuchmann, S. (2002). "Spatial nitric oxide imaging using 1,2-diaminoanthraquinone to investigate the involvement of nitric oxide in long-term potentiation in rat brain slices." *Neuroimage* 15(3): 633-9.

Wang, H., Hitron, I. M., Iadecola, C. Pickel, V. M. (2005). "Synaptic and vascular associations of neurons containing cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase in rat somatosensory cortex." *Cereb Cortex* 15(8): 1250-60.

Wang, H. G., Lu, F. M., Jin, I., Udo, H., Kandel, E. R., de Vente, J., Walter, U., Lohmann, S. M., Hawkins, R. D. Antonova, I. (2005). "Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins." *Neuron* 45(3): 389-403.

Wendland, B., Schweizer, F. E., Ryan, T. A., Nakane, M., Murad, F., Scheller, R. H. Tsien, R. W. (1994). "Existence of nitric oxide synthase in rat hippocampal pyramidal cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 2151-5.

Weruaga, E., Brinon, J. G., Porteros, A., Arevalo, R., Aijon, J. Alonso, J. R. (2000). "Expression of neuronal nitric oxide synthase/NADPH-diaphorase during olfactory deafferentation and regeneration." *Eur J Neurosci* 12(4): 1177-93.

West, A. R. Galloway, M. P. (1998). "Nitric oxide and potassium chloride-facilitated striatal dopamine efflux in vivo: role of calcium-dependent release mechanisms." *Neurochem Int* 33(6): 493-501.

Wheal, H. V., Chen, Y., Mitchell, J., Schachner, M., Maerz, W., Wieland, H., Van Rossum, D. Kirsch, J. (1998). "Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity." *Prog Neurobiol* 55(6): 611-40.

Wichmann, T. DeLong, M. R. (1996). "Functional and pathophysiological models of the basal ganglia." *Curr Opin Neurobiol* 6(6): 751-8.

Will, B., Galani, R., Kelche, C. Rosenzweig, M. R. (2004). "Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002)." *Prog Neurobiol* 72(3): 167-82.

Wongwitdecha, N. Marsden, C. A. (1996). "Effects of social isolation rearing on learning in the Morris water maze." *Brain Res* 715(1-2): 119-24.

Xiaojuan, X., Boshoven, W., Lombardo, B. Spranger, J. (1998). "Comparison of the amnesic effects of NMDA receptor antagonist MK-801 and nitric oxide synthase inhibitors: L-NAME and L_NOARG in goldfish." *Behavioral Neuroscience* 112(4): 892-899.

Xu, W. P., Shan, L. D., Gong, S., Chen, L., Zhang, Y. J., Yin, Q. Z., Hisamitsu, T., Jiang, X. H. Guo, S. Y. (2006). "Forced running enhances neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult rats and improves learning ability." *Sheng Li Xue Bao* 58(5): 415-20.

Yamada, K. (1998). "[Role of nitric oxide in learning and memory processes]." *Nippon Yakurigaku Zasshi* 111(2): 87-96.

Zhang, S., Chen, J. Wang, S. (1998). "Spatial learning and memory induce up-regulation of nitric oxide-producing neurons in rat brain." *Brain Res* 801(1-2): 101-6.

Zorumski, C. F. Izumi, Y. (1998). "Modulation of LTP induction by NMDA receptor activation and nitric oxide release." *Prog Brain Res* 118: 173-82.

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](#)