

Livia Clemente Motta Teixeira

Exercício físico, neurogênese e memória

Exercise, neurogenesis and memory

São Paulo

2013

Lívia Clemente Motta Teixeira

Exercício físico, neurogênese e memória

Exercise, neurogenesis and memory

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador: Gilberto Fernando
Xavier

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Motta-Teixeira, Livia Clemente

Exercício físico, neurogênese e memória /Livia Clemente Motta-Teixeira; orientador Gilberto Fernando Xavier.- - São Paulo,2013
125f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.2013

1. Exercício físico espontâneo 2. Memória espacial 3. Neurogênese
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Candidato(a): Livia Clemente Motta Teixeira

Título da Dissertação: Exercício Físico, neurogênese e Memória

Orientador: Gilberto Fernando Xavier

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

Dedico esta dissertação a todos os professores que tiveram influência em minha formação e , em especial, aos meus maiores mestres, Sérgio e Lourdes, meus amados pais, não pelos ensinamentos científicos, mas sim pelo exemplo de vida, perseverança, moral e humildade, e por serem fontes infindáveis de apoio, amor, e maiores incentivadores a todos os passos dessa caminhada. Aos meus amados irmãos, Sofia e Felipe, por serem meus melhores amigos e leais escudeiros. A Vovó Zélia por seu constante afeto e presença. Nino minha felicidade constante. Não existirá conquista profissional que se compare ao amor e a união que continuamos construindo durante nossas vidas. Amo vocês, muito obrigada por tudo.

Voici mon secret. Il est très simple: on ne voit bien qu'avec le cœur.
L'essentiel est invisible pour les yeux.

- L'essentiel est invisible pour les yeux, répéta le petit prince, afin de se souvenir.

- C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante.

- C'est le temps que j'ai perdu pour ma rose... fit le petit prince, afin de se souvenir.

- Les hommes ont oublié cette vérité, dit le renard. Mais tu ne dois pas l'oublier. Tu deviens responsable pour toujours de ce que tu as apprivoisé. Tu es responsable de ta rose..

Le Petit Prince -Antoine de Saint-Exupéry



Agradecimentos

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, por ter oferecido os recursos necessários para realização desse projeto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro (Processo FAPESP: 2011/03960-0).

A meu orientador Gilberto Xavier pela oportunidade e confiança depositadas. Por partilhar sua experiência profissional e pessoal ao longo destes anos, pelo muito que aprendi, pelas inúmeras oportunidades que me proporcionou, direta ou indiretamente, de crescimento pessoal e profissional. Pelos seus exemplos de criatividade, dinamismo, integridade e autenticidade. Por ter sempre uma solução “mágica” para todos os problemas técnicos enfrentados ou por tirar de sua mente brilhante um novo equipamento para solucioná-los. Por estimular a independência intelectual e ser um grande e verdadeiro cientista.. Não posso deixar de agradecer sua preocupação com meu bem-estar durante toda minha estada em seu laboratório e seu apoio em tempos difíceis de minha vida pessoal. Minha eterna gratidão por tudo.

A Prof^a Maria Inês Nogueira pela valiosa oportunidade de colaboração, por toda confiança e liberdade sempre oferecidas. Por acreditar na potencialidade de seus alunos e por me adotar como um dos seus “filhotes”, pelo generoso empréstimo de equipamentos e reagentes que possibilitaram a realização desse trabalho. Por ter acreditado e incentivado meu trabalho nas infindáveis horas em seu laboratório, pela excelente convivência e enormes ensinamentos científicos e de vida.

Ao Prof. Luiz Fernando Takase meu muito obrigada por participar da minha banca de qualificação, por suas contribuições, pela oportunidade de colaboração, pela disponibilidade, atenção e discussões científicas. Agradeço também aos professores André Frazão e Hamilton Haddad pelas valiosas contribuições na banca de qualificação.

Ao Prof. Jackson Bittencourt por generosamente permitir a utilização do sistema de estereologia e por abrir as portas do seu laboratório para o que fosse necessário. A todos do Laboratório de Neuroanatomia Química, em especial Giovanna Baroni pela disponibilidade, atenção e ajuda no uso do sistema e a amiga Daniella Batagello.

A todos os colegas do Laboratório de Neurociências e Comportamento: Arnaldo, Bárbara, Camile, Cyrus, Diego, Felipe, Ilton, Leopoldo e Renata por terem guiado meus primeiros passos quando entrei no laboratório, por todo conhecimento, companheirismo, ajuda e bons momentos de descontração vividos. Aos “novos” integrantes que foram se juntando ao time: André, Carol, Katia e Antônio. As minhas ICs queridas e amigas de coração: Yasmin e Karen. Adoro vocês! Um agradecimento especial as amigas Elisa e Aline, pelo convívio carinhoso, companheirismo, discussões teóricas e apoio constante. E claro não podia faltar o agradecimento ao Manoel, nosso super técnico e MacGyver brasileiro, meu muito obrigada por cuidar tão bem dos animais, por todos os quebra-galhos e pela sincera amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Neurociências por terem me recebido de braços abertos, por terem me auxiliado em todos os momentos e por toda torcida. Agradecimento especial as meus queridos Aline, Vitor e Silvia, por terem me ensinado técnicas que precisei, pelo suporte constante, pelas diversas perfusões, montagens, contagens e tantos outros procedimentos que fizeram comigo e por mim. Obrigada pelos incentivos na parte experimental seja durante o dia ou noite, com chuva, neblina ou sol. Por acreditarem que tudo daria certo no final, mesmo quando a esperança era quase nula. Pelo ouvido que escutou tantas reclamações e pelas risadas que amenizavam o stress diário. Vocês me mostraram que trabalhar em equipe é fortalecedor! E muito mais que isso promove boas risadas, grandes alegrias e verdadeiras amizades. A execução desse projeto só foi possível pela colaboração e apoio de vocês!

Um enorme agradecimento a Silvia Honda, minha GRANDE parceira de experimento (minha et al preferida) e uma irmã que encontrei perdida nessa cidade de São Paulo. Sil, é difícil escrever em poucas linhas tudo que tenho a agradecer a você. Só você conhece os caminhos de pedras que tivemos de passar. Obrigada por nunca me deixar só e sempre confiar em mim. Seu apoio incondicional foi essencial para realização desse trabalho. Você mora no meu coração.

A todos os amigos com os quais convivi durante esse tempo de IB e Departamento de Anatomia e que estão distribuídos pelos diversos laboratórios. Agradeço pelo espírito de colaboração e pela amizade. Possuir amigos que pensam de formas tão distintas, enriqueceu significativamente a minha formação.

A todos funcionários do Departamento de Fisiologia: em especial Érika, Gisele, Helder e Roseli, por terem me auxiliado no que precisei, por estarem sempre acessíveis e pela competência!

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

“Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores perguntas”

(João Guimarães Rosa-Grande Sertão: Veredas)

Escrever uma dissertação de Mestrado é uma experiência enriquecedora e de plena superação. Nos modificamos a cada tentativa de buscar respostas às nossas aflições de 'pesquisador'. Para aqueles que compartilham conosco desse momento, parece uma tarefa interminável e enigmática que só se torna realizável graças a muitas pessoas que participam, direta ou indiretamente, mesmo sem saber realmente o que e para que nos envolvemos em pesquisa. E é a essas pessoas que gostaria de agradecer:

Gostaria de agradecer a minha família grande incentivadora desse sonho. Aos meus pais Sérgio e Maria de Lourdes pelo maravilhoso apoio, encorajamento e grandioso amor. Muito obrigada por acreditarem na minha constante dedicação a este projeto. Por não terem medido esforços para que meus sonhos se realizassem. Pelo amor incondicional, constante incentivo, e exemplo de luta, humildade, coragem e honestidade. Por terem me apoiado em todas as decisões, pela dedicação, paciência e cuidados. Por terem me alojado em um "ambiente enriquecido" e por terem me aturado durante os períodos de altos níveis de cortisol, de muitas reclamações, por dividirem comigo todas as angustias, renúncias e obstáculos que enfrentei para chegar a essa conquista. Por suportar a distância e esperar pacientemente por este momento. Pelas intensas orações que, indiscutivelmente, foram recebidas por Deus. Amo vocês! Recebam esta vitória como prova da minha eterna gratidão. Aos meus irmãos Felipe e Sofia pelo imenso carinho e constante incentivo. Vocês são muito especiais.. Obrigada por me manterem sempre firme! A todos os meus familiares, em especial, meus avós, Tia Lena, Tio Zé e Paulinho, por todo afeto e pela torcida em todos os momentos.

Preciso também agradecer a todas as pessoas com quem tive o privilégio de morar em São Paulo e me acompanharam nessa trajetória, em especial a Cláudia Emanuele (Clau), Máisa (Meisi) e Elizabeth (Nortinha) que tornaram mais fácil a vida longe da família, obrigada por todo companheirismo e amizade. Obrigada por agüentarem meu mau humor matinal, minhas reclamações e a bagunça dos meus livros e resumos que se espalharam pela casa toda. Vocês me deram força em tudo que precisei.

Não poderia deixar de agradecer a minha confidente e melhor amiga Clau, por ser tão importante na minha vida. Te agradeço por ter sido meu maior apoio, sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Pelos inúmeros puxões de orelha, que sempre soaram como incentivo, as conversas sobre trabalho e vida, e inclusive pelas inúmeras revisões de texto. Pela paciência nos momentos de inquietação e cansaço. Seu companheirismo, amizade, compreensão, e alegria, foram essenciais para que esse sonho fosse concretizado. Obrigada por tudo! Essa vitória também é sua!

E existem aquelas pessoas que por mais distantes que estejam, ainda continuam perto. Aquelas que, passe o tempo que passar, serão sempre lembradas por algo que fizeram, falaram, mostraram, pelo que nos fizeram sentir. As pessoas são lembradas pelos sentimentos que despertaram em nós... E quanto maior o sentimento, maior se torna a pessoa....meu agradecimentos as amigas de longa data Ana Letícia, Camila, Luciana, Ludimila, Mariana, Nina, Rafaela e Natali, por assegurarem que não existe distância que possa afetar amizades verdadeiras! Obrigado pelas conversas, pela atenção, pelos conselhos "infalíveis", pelo elogio que só vem de quem ama e, principalmente, por fazerem questão dessa amiga desanaturada. Obrigada por tudo meninas, amo vocês. Sem esquecer de agradecer aos amigos de faculdade, de Juiz de Fora, de BH, de Lafa e das Minas e do Mundo!! Amo a todos! Obrigada a todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para meu crescimento como pessoa e cujos nomes não foram citados, o meu muito obrigada! Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida, por ter me dado uma família maravilhosa que me ensinou que dependo de ti a cada momento, por me dar a vida e a força necessária para concluir esse trabalho, por estar comigo a cada momento e a cada passo que dava, por transformar o difícil em fácil, a escuridão em luz e também por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado. Obrigada por me cobrir de bênçãos e de seus anjos que vieram em forma de amigos.

"Para os crentes, Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão."

Max Planck

Lista de Figuras

FIGURA 1:	Desenho esquemático dos nichos neurogênicos e circuitaria trissinática.....	6
FIGURA 2:	Desenho esquemático de regiões cerebrais onde ocorre o processo de neurogênese.....	7
FIGURA 3:	Representação esquemática da neurogênese adulta hipocampal.....	11
FIGURA 4:	Efeito da atividade física na neurogênese adulta hipocampal.....	15
FIGURA 5:	Representação esquemática do processo de formação de memórias.....	25
FIGURA 6:	Esquema representativo do labirinto aquático de Morris.....	31
FIGURA 7:	Efeitos da atividade física no encéfalo	34
FIGURA 8:	Desenho experimental.....	40
FIGURA 9:	Animais nas rodas de atividade.....	41
FIGURA 10:	Estimativa estereológica.....	48
FIGURA 11:	Distancia (em metros) percorrida a cada 24 horas (média-E.P.M.) pelos sujeitos dos grupos EXE ao longo dos 7 dias de exposição a roda de atividade.....	49
FIGURA 12:	Médias (-E.P.M.) das latências e comprimento de trajeto ao longo das 4 tentativas no teste de memória operacional (versão dependente do hipocampo) do labirinto aquático de Morris em função do ITI, e grupos (EXE vs Ñ-EXE) incluindo intervalo (1, 3 e 6 semanas).....	52
FIGURA 13:	Médias (-E.P.M.) do tempo gasto no contador do dia crítico, percentagem relativa de tempo no contador do dia anterior em relação a 3 outras áreas simetricamente localizadas e frequência de entradas no contador crítico do dia anterior,	

	ao longo de 4 tentativas no teste de memória operacional (versão dependente do hipocampo) do labirinto aquático de Morris em função do ITI, e grupos (EXE vs Ñ-EXE) incluindo intervalo (1, 3 e 6 semanas).....	53
FIGURA 14:	Médias (-E.P.M.) das latências , comprimento de trajeto e velocidade média de natação, ao longo das 4 tentativas no teste de memória operacional (versão INdependente do hipocampo) do labirinto aquático de Morris em função do ITI, e grupos (EXE vs Ñ-EXE) incluindo intervalo (1, 3 e 6 semanas).....	55
FIGURA 15:	Desenho esquemático refletindo o ciclo celular e os estágios em que ocorre expressão de BrdU e Ki-67	56
FIGURA 16:	Efeito de 7 dias de atividade física voluntária na proliferação celular.....	58
FIGURA 17:	Células imunorreativas para Doublecortina(DCX) expressas em neurônios imaturos no hipocampo de animais exercitados.....	60
FIGURA 18:	Fotomicrografias representativas evidenciando a imufluorescência para BrdU, NeuN e co- localização de BrdU + NeuN e número estimado de células duplamente marcadas para BrdU e NeuN nos grupos (EXE vs Ñ-EXE) incluindo intervalo (1, 3 e 6 semanas).....	63
FIGURA 19:	Efeito do treinamento da tarefa do labirinto aquático de Morris nas versões dependente e independente do hipocampo no número de novos neurônios.....	64

Lista de tabelas

Tabela 1:	Alguns fatores que modulam a neurogênese hipocampal.....	13
Tabela 2:	Tarefas comportamentais utilizadas para avaliar os efeitos do aprendizado na neurogênese.....	16
Tabela 3:	Estudos de ablação da neurogênese e seus efeitos no comportamento.....	21
Tabela 4:	Quantificação de neurônios imaturos positivos para doublecortina (DCX) no giro dentado do hipocampo.....	59
Tabela 5:	Quantificação das células que se diferenciaram em neurônios (neurogênese) no giro dentado do hipocampo.....	62

Lista de Abreviaturas

ABC	Ccomplexo avidina-biotina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BrdU	5-bromo-3'-deoxiuridina
CA 1-3	Cornu Ammonis 1-3, regiões do hipocampo, que os primeiros anatomistas julgaram ter formato de chifre presente em algumas representações de Amon, rei dos deuses da cidade de Tebas, na mitologia do Antigo Egito
CM	Camada molecular
CG	Camada granular
DAB	3, 3'-diaminobenzidine
DCX	Doublecortina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GABA	Ácido gama aminobutírico
GD	Giro denteado
GFAP	Proteína Glial ácida
IEG	Genes de expressão imediata (<i>Immediate early genes</i>)
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina
KI-67	Proteína ki-67expresso por células proliferantes durante todas as fases do ciclo celular, exceto a fase G-o (repouso)
LAM	Labirinto Aquático de Morris
LTP	Potencial de longa duração
MAM	Acetato de metilazoximetanol
NSC	<i>Neural stem cell</i>
NeuN	Proteína neuronal específica
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
PNA	Progenitor amplificador neural
PNQ	Progenitor quiescente neural
RMS	Via de migração rostral (<i>rostral migratory stream</i>)
SGZ	Zona subgranular
SVZ	Zona sub ventricular
VEGF	Fator de crescimento derivado do endotélio

Índice

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Neurogênese adulta.....	1
1.1.1. Uma perspectiva histórica.....	1
1.2. Nichos neurogênicos.....	4
1.3. Estágios da Neurogênese.....	8
1.3.1. Proliferação.....	8
1.3.2. Diferenciação e migração.....	9
1.3.3. Maturação Neuronal.....	10
1.4. Regulação da neurogênese.....	12
1.4.1. Atividade física.....	14
1.4.2. Aprendizado.....	16
1.5. Possíveis funções da neurogênese hipocampal.....	18
2. Memória	23
2.1. Memória espacial.....	26
2.2. Labirinto aquático de Morris como instrumento de avaliação da memória espacial.	27
2.3. Atividade física, neurogênese e memória espacial.....	32
3. OBJETIVO.....	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. Sujeitos.....	38

4.1.1. Grupos experimentais.....	38
4.2. Atividade física.....	41
4.3. Administração de BrdU.....	41
4.4. Labirinto aquático de Morris.....	42
4.5. Histologia.....	44
Imunohistoquímica	44
Ki-67.....	44
BrdU.....	45
BrdU/ NeuN.....	45
DCX.....	46
4.7. Análise histológica.....	46
Proliferação celular neuronal.....	46
Diferenciação neuronal.....	47
Neurônios imaturos.....	47
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Atividade física.....	49
5.2 Labirinto Aquático de Morris: Memória Operacional.....	50
Versão dependente do hipocampo.....	50
Versão INdependente do hipocampo.....	54
5.3 Resultados histológicos.....	56
Proliferação - BrdU e Ki-67.....	56
Neurônios imaturos DCX.....	59
Diferenciação Neuronal BrdU/NeuN.....	61
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSOES	70
8. RESUMO	71
9. ABSTRACT.....	72

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
11. BIOGRAFIA	104
12. ANEXOS	110

1. INTRODUÇÃO

A contínua geração e integração de novos neurônios no giro dentado, estrutura que corresponde à principal via de entrada de informações no hipocampo e que regula o fluxo de informações nesta estrutura nervosa, leva à ideia de uma relação entre neurogênese e memória. Embora essa relação venha sendo extensivamente investigada, os resultados são ainda controversos, requerendo estudos adicionais para se avaliar a contribuição desses novos neurônios para funções cognitivas.

Neste trabalho, buscamos compreender a relação temporal entre neurogênese estimulada por atividade física e o aprendizado de tarefas dependentes do hipocampo, após o término do exercício. Essa abordagem permitirá avaliar os benefícios gerados pelo exercício físico regular nas funções cognitivas e como os mecanismos de plasticidade ativados pelo exercício evoluem após o final do mesmo.

1.1 Neurogênese adulta

1.1.1 Uma perspectiva histórica

“In the adult centres, the nerve paths are something fixed, ended and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated.” Santiago Ramon y Cajal, 1928 pag. 750

No final do século XIX, utilizando técnicas de coloração desenvolvidas por Camilo Golgi, Ramón y Cajal (1928) estudou as diferentes fases de desenvolvimento dos neurônios em mamíferos, concluindo que não havia surgimento de novas células no encéfalo adulto, além daquelas já estabelecidas no período pré-natal. Entretanto, no final do século XIX, alguns grupos relatavam figuras mitóticas no encéfalo adulto (e.g., SCHAPER, 1897; LEVI 1898 apud MENINI, 2010). Em 1912, Ezra Allen propôs a primeira evidência de que novos neurônios poderiam ser gerados no encéfalo de ratos adultos, mostrando figuras mitóticas na parede dos ventrículos laterais de ratos albinos com mais de 120 dias de vida (ALLEN, 1912). Esses relatos, contrários às ideias preponderantes na época, não tiveram notoriedade uma vez que as técnicas

disponíveis na época não eram capazes de demonstrar com precisão que essas células eram neurônios propriamente ditos.

Desde então, a suposta “incapacidade” do cérebro adulto gerar novos neurônios tornou-se um dos principais dogmas da neurociência por quase um século. No final dos anos 50, com o desenvolvimento do método da timidina tritiada ($[H^3]$ -Timidina), que é incorporada ao DNA durante a fase S do ciclo celular, foi possível marcar células em divisão e detectá-las com a técnica de autorradiografia. O primeiro relato de geração de novos neurônios utilizando essa técnica foi feito em ratos neonatos com 3 dias de idade (SMART, 1961). Posteriormente, Joseph Altman e colaboradores publicaram uma série de artigos relatando a ocorrência de neurogênese em várias estruturas cerebrais de ratos jovens e adultos, incluindo giro denteado do hipocampo, bulbo olfatório e neocórtex (ALTMAN e DAS, 1965; ALTMAN, 1966; ALTMAN, 1969). Esse grupo foi o primeiro a descrever de geração de células na zona subventricular (ALTMAN e DAS, 1965a) e a descrever com detalhes o caminho de migração para o bulbo olfatório, onde essas células se diferenciam em neurônios (ALTMAN, 1969). Entretanto, nessa época, esses resultados não reconhecidos; alegava-se que não havia evidências suficientes de que as células marcadas eram neurônios.

A questão da neurogênese em idade adulta foi revista no final da década de 70 por Michael Kaplan e colaboradores que por meio de técnicas de microscopia mostraram que as células marcadas com $[H^3]$ -Timidina incorporadas no giro denteado e bulbo olfatório de ratos possuíam características ultra-estruturais de neurônios, tais como dendritos e sinapses, o que não é observado em astrócitos e oligodendrócitos (KAPLAN e HINDS, 1977; KAPLAN e BELL 1984; KAPLAN, 1985). Considerando que o fenótipo celular foi baseado apenas em critérios puramente morfológicos e que marcadores imunohistoquímicos específicos para neurônios ainda não existiam, a maioria da comunidade em neurociência não aceitou os resultados do grupo de Kaplan.

Fernando Nottebohn (NOTTEBOHN, 1981) demonstrou que um número substancial de novos neurônios era gerado no cérebro de canários adultos (*Serinus canaria*), sendo esse número dependente da sazonalidade: no período reprodutivo, em que os animais aumentam e diferenciam suas vocalizações para atração de parceiros, ocorrem as maiores taxas de neurogênese (SADANANDA, 2004)

Heather Cameron e Elizabeth Gould fizeram a terceira redescoberta da neurogênese em ratos adultos (GOULD e col., 1992; CAMERON e col., 1993). O campo de pesquisa sobre neurogênese acelerou-se no início dos anos 1990 com a introdução da 5-bromo-3'-deoxiuridina (BrdU), um análogo sintético de timina, que é captado pelas células durante a fase S da mitose, sendo desta forma, um marcador de células em proliferação. As células marcadas com BrdU podem ser visualizadas por técnicas de imunohistoquímica, e podem ser combinadas com marcadores neuronais ou gliais para análise fenotípica. Com o uso da técnica do BrdU diversos estudos em mamíferos confirmaram a neurogênese hipocampal adulta em roedores (CAMERON e col., 1993; SEKI e ARAI, 1993; KUHN e col., 1996; GOULD e col., 1998), e primatas não-humanos e humanos (ERIKSSON e col., 1998; KORNACK e RADIC, 1999). Presentemente, existem relatos de formação de novos neurônios em quase todos os grupos de vertebrados, e em alguns grupos de invertebrados (e.g., LINDSEY e TROPEPE, 2006).

Cerca de 9000 novos neurônios são gerados por dia no giro denteado de roedores, contribuindo para aproximadamente 3,3% por mês ou 0,1% por dia da população de células granulares (CAMERON e MCKAY, 2001). A taxa de neurogênese hipocampal em macacos é aproximadamente 10 vezes menor (KORNACK e RAKIC, 1999). Além disso, a taxa de neurogênese é menor em macacos idosos e há um decréscimo linear com a idade (LEUNER e col., 2007). Esse declínio ocorre na meia-idade e é comparável ao declínio encontrado em ratos e camundongos (LEUNER e col., 2007). A neurogênese adulta hipocampal em humanos foi mensurada post-mortem usando BrdU (ERICKSSON e col., 1998; SPALDING e col., 2013) e Ki-67 (marcador endógeno de proliferação) (REIF e col., 2006).

Louis Manganas e colaboradores (2007) identificaram, por meio de técnicas de imageamento *in vivo*, um biomarcador metabólico para células progenitoras no encéfalo de humanos. Esse biomarcador permitiu a detecção e quantificação de células precursoras neurais, e mostrou que há um declínio relacionado à idade de pré-adolescentes (8-10 anos) até a fase adulta (30-35 anos). Esse declínio na atividade proliferativa relacionado à idade é contundentemente paralelo ao declínio observado em roedores e primatas.

Recentemente, Spalding e colaboradores (2013) quantificaram a geração post-mortem de novas células hipocâmpais em humanos com idade entre 19 e 92 anos (N=55), por meio de uma técnica de datação de carbono 14. Esses autores mostraram que cerca de 700 neurônios são adicionados a cada hipocampo por dia em seres humanos adultos, correspondendo a um volume anual de 1,75% de neurônios numa fração de renovação, com declínio modesto durante o envelhecimento. As taxas de neurogênese hipocâmpal de humanos são comparáveis com aquelas encontradas em roedores. Uma vez que o hipocampo é uma região reconhecidamente associada aos processos de memória, tem havido sugestões de que a adição de novos neurônios possa contribuir para o aperfeiçoamento dessas funções (GOULD e col., 1999; KEMPERMANN e col., 2010).

1.2. Nichos neurogênicos

Para que um nicho neurogênico seja caracterizado é necessário que além da presença de células precursoras imaturas haja um microambiente propício para a produção de novos neurônios. Em mamíferos adultos, pelo menos duas regiões nervosas são reconhecidamente classificadas como nichos neurogênicos, o sistema olfatório e o hipocampo (GAGE, 2002; 2004).

No **sistema olfatório**, as células precursoras localizam-se na porção anterior da zona subventricular na parede dos ventrículos laterais (ZSV), de onde migram pela via de migração rostral (do inglês- *rostral migratory stream* ou RMS-Figura 1A) até o bulbo olfatório, onde se diferenciam em interneurônios inibitórios granulares ou periglomerulares (LOIS & ALVAREZ-BUYLLA, 1993; DOESTCH e col., 1999).

O **hipocampo** é uma estrutura do sistema nervoso central, localizado no lobo temporal de cada hemisfério encefálico, com alto grau de plasticidade, que está diretamente relacionado a funções de aprendizagem e memória, com base na morfologia celular e projeções de fibras, o hipocampo é subdividido em regiões CA (*cornu ammonis*), organizadas em subregiões denominadas CA1, CA2, CA3, e CA4 (Figura 1 A e B, painel direito) e Giro Denteado (GD).

O giro denteado é uma estrutura trilaminar dividido em a camada molecular (relativamente livre de células e ocupada basicamente pelos dendritos das células granulares em cesto e polimórficas), a camada granular (camada principal de células

que têm corpos celulares pequenos e esféricos (8-12 μm de diâmetro) e tem sua disposição próxima) e a camada polimórfica (também chamada de hilo ou região hilar e onde se encontram as células musgosas).

Na região hipocampal, as células progenitoras encontram-se na **zona subgranular do giro denteado** (ZSG) (Figura 1 painel B- painel esquerdo), local em que iniciam sua diferenciação e de onde, ao longo da primeira semana, migram para a camada granular onde passam pelo processo de maturação dando origem a células granulares propriamente ditas, com sinapses funcionais (GAGE, 2002; KEMPERMANN e col., 2004; SERI e col., 2004; DUAN e col., 2008; DENG e col., 2010).

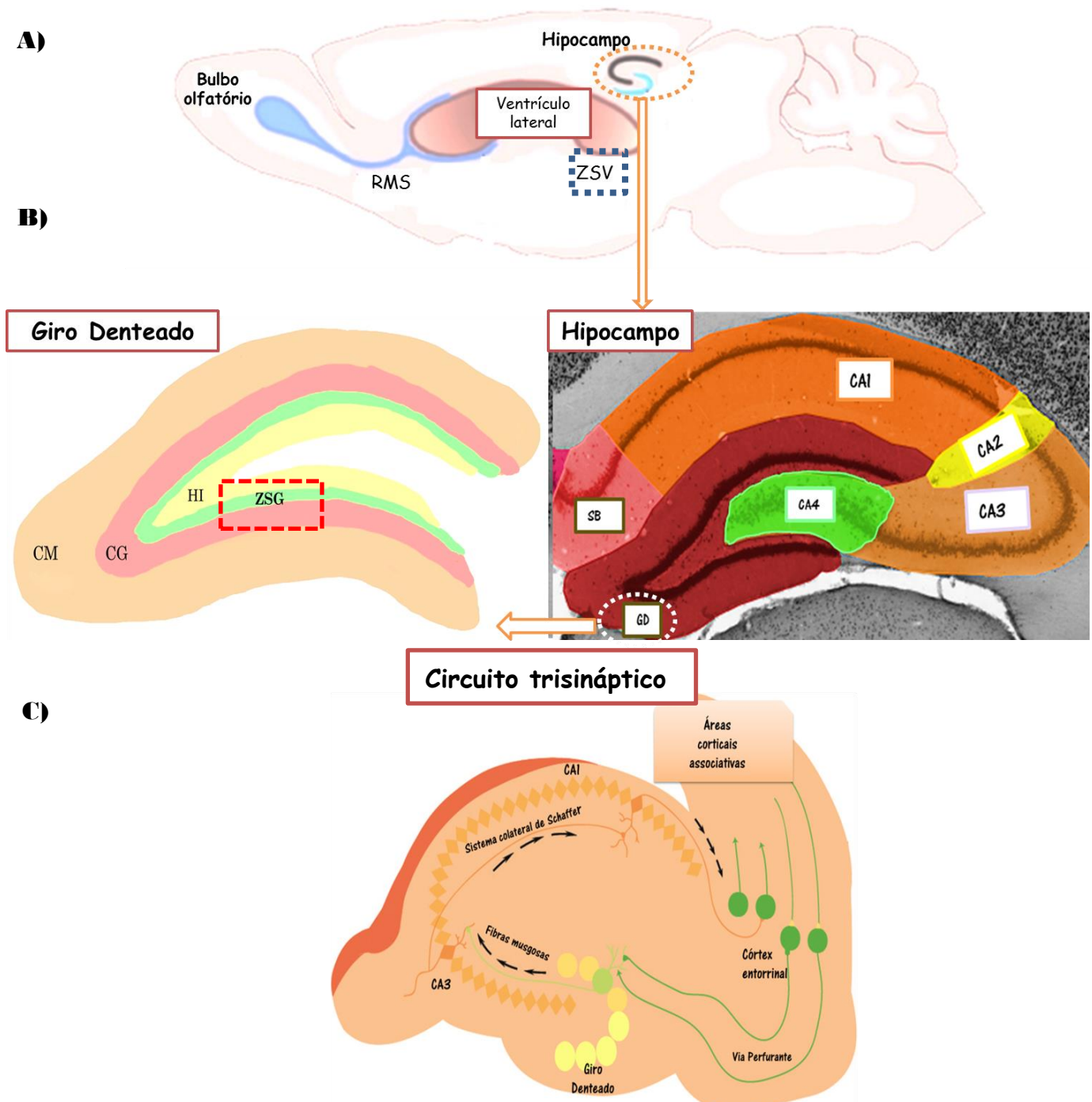


FIGURA 1- Nichos neurogênicos e circuitaria trissináptica. A) Desenho ilustrativo dos dois principais nichos neurogênicos conhecidos no cérebro: a zona subventricular (ZSV) e o hipocampo. B) Representação das divisões do hipocampo e camadas do giro denteado. C) Circuitaria trissináptica. Representação esquemática da circuitaria trissináptica, que conecta o córtex entorrinal (CE) ao hipocampo (GD, CA3 e CA1). A via de projeção excitatória origina-se no CE e chega a CA1 passando por GD e CA3 em série. De CA1 estas projeções chegam novamente ao CE, principalmente através de relé no subículo (não representado em C). Legenda: ZSG - zona subgranular do giro denteado; cg - camada granular; cm - camada molecular; hi-hilo ZSV-zona subventricular RSM- via de migração rostral CE - Córtex Entorrinal. GD - Giro Denteado. Subículo (SB). CA4-Área CA4 do corno de Ammon. CA3 - Área CA3 do corno de Ammon. CA2 - Área CA2 do corno de Ammon. CA1 - Área CA1 do corno de Ammon.

Em adição a essas duas regiões, existem evidências de produção de novos neurônios em outras regiões do encéfalo adulto (Figura 2), incluindo neocórtex (GOULD e col., 1999a; GOULD e col., 2001; DAYER e col., 2005), córtex entorrinal (SHAPIRO e col., 2009), córtex piriforme (BERNIER e col., 2002); substância negra (BEDARD e col., 2006; LUZZATI e col., 2006), amígdala (BERNIER e col., 2002; FOWLER e col., 2002; AKBARI e col., 2007; OKUDA e col., 2009), área pré-ótica medial (MPOA) (AKBARI e col., 2007) e hipotálamo (HUANG e col., 1998; FOWLER e col., 2002; KOKOEVA e col., 2005; LEE e col., 2012; CHENG, 2013), apesar de existirem relatos conflitantes (BENRAISS e col., 2001; KORNACK & RAKIC, 2001; EHNINGER & KEMPERMANN, 2003; CHMIELNICKI e col., 2004).

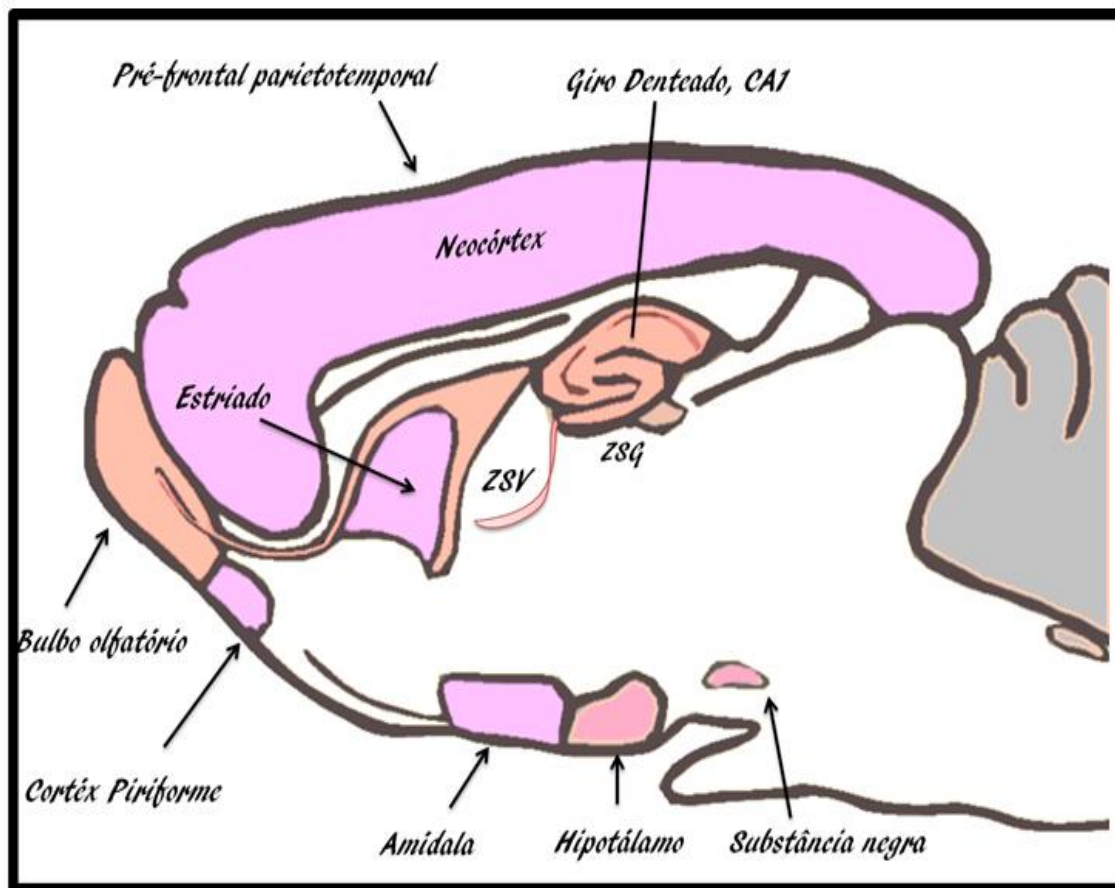


FIGURA 2. Desenho esquemático de regiões encefálicas onde ocorre o processo de neurogênese. Em vermelho - regiões canônicas de ocorrência de neurogênese no encéfalo de roedores adultos, a zona subgranular do giro denteado (ZSG) e a zona subventricular (ZSV) onde são encontradas células precursoras que migram para o bulbo olfatório. Em rosa - áreas sobre as quais há relatos esparsos de neurogênese, havendo, porém, controvérsias. Adaptado de Gould, 2008.

1.3 Estágios da Neurogênese

A neurogênese adulta envolve a produção de novos neurônios no encéfalo adulto. O termo neurogênese refere-se a um processo complexo que se inicia com a proliferação de células progenitoras, seguido pela diferenciação, i.e., determinação do fenótipo neuronal, maturação morfológica e fisiológica para o desenvolvimento das características de funcionamento neuronal, e finaliza-se com a existência de um novo neurônio funcional e integrado a redes já existentes (ver Figura 3). Os experimentos da presente dissertação estão focados na neurogênese hipocampal que ocorre na zona subgranular do giro denteado. Portanto, não será descrito em detalhes a neurogênese que ocorre na zona subventricular, embora boas revisões estejam disponíveis (MENINI, 2010; ALVAREZ-BUYLLA & GARCIA-VERDUGO, 2002; MING & SONG, 2005).

Proliferação

As células tronco-neurais (*Neural stem cells* ou NSC's) do sistema nervoso central (SNC) são um tipo especial de células somáticas que possuem capacidade de auto renovação, ou seja, capacidade de originar outra NSC com características idênticas, potencial para se diferenciar em mais de uma linhagem celular, e capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (SOHUEER e col., 2006). Esses tipo celular é classificados de maneira geral como precursoras. Entretanto, a definição de uma “verdadeira” célula tronco neural ainda é incerta (ENCINAS & SIERRA, 2012).

No hipocampo adulto, as células precursoras do giro denteado têm o seu corpo celular localizado na zona subgranular (ZSG) região localizada entre o hilo e a camada granular caracterizada por uma frouxa matriz extracelular. O primeiro precursor celular foi descrito como um tipo de astrócito radial (SERI e col., 2001), sendo atualmente conhecido como progenitor neural quiescente (PNQ) (ENCINAS & SIERRA, 2012).

Evidências genéticas, bioquímicas e farmacológicas sugerem que essas células PNQ's seriam tipos especiais de astrócitos que expressam proteína glial fibrilar ácida (GFAP- do inglês- *glial fibrillary acidic protein*) e nestina (Duan et al., 2008). E

possuem como principal característica funcional baixa taxa de divisão. Pensa-se que devido à sua morfologia ramificada e à extensa penetração por entre vasos sanguíneos, estas se dividam apenas raramente (KRONENBERG e col., 2003) e, que quando o fazem, fazem-no assimetricamente, dando origem a outra célula semelhante a si e ao segundo tipo de células, as células do tipo II ou C.

Diferenciação e migração

As células do tipo II ou C expressam nestina (filamento intermediário tipo IV) e SOX2 (DUAN e col., 2008), e não mais expressam GFAP (KEMPERMANN e col., 2004). Essas células são mitoticamente ativas e atuam como progenitores neurais amplificadoras (PNA) nome pelo qual são identificadas (ENCINAS e col., 2006). Menos de uma semana após seu nascimento, as PNA's param suas divisões e começam a expressar marcadores de neurônios imaturos e estender neuritos (futuros axônios e dendritos), sendo nessa etapa denominados de neuroblastos (ENCINAS & SIERRA, 2012). É durante essa etapa de transição entre PNA e neuroblastos, que mais de 60% das novas células morrem por apoptose e são fagocitadas por microglia (Figura 3) (SIERRA e col., 2010).

Esses neuroblastos pós-mitóticos possuem soma grande, redondo ou ovoide com curtas extensões citoplasmáticas orientadas tangencialmente e um complexo padrão eletrofisiológico com características claramente diferentes de astrócitos (FILIPPOV e col., 2003). Eles já não expressam nestina ou SOX2, mas começam a expressar molécula de adesão neuronal polissialica (PSA-NCAM) (SERI e col., 2004). Esses neuroblastos são subdivididos em duas subclasses, 3A e 3B, e ambas expressam a proteína associada de microtúbulos, a doublecortina (DCX) (ENCINAS & ENIKOLOPOV, 2008). Os neuroblastos do tipo 3A têm prolongamentos apicais curtos e finos, enquanto neuroblastos do tipo 3B já possuem características de um neurônio granular imaturo, incluindo processo radial ramificado e proeminente que se estende através da camada granular e um fino prolongamento para o hilo (SERI e col., 2004). Existem evidências que as células progenitoras amplificadoras dividem-se dando origem a neuroblastos pós-mitóticos tipo 3A que maturam dando origem ao estágio 3B para a formação de um novo neurônio granular (SERI e col., 2004).

Maturação Neuronal

A diferenciação pós-mitótica é caracterizada pela expressão transitória de DCX e da proteína ligante de cálcio Calretinina, e a expressão de Proteína Nuclear Neuronal (NeuN), um marcador neuronal, e Calbindina (KEMPERMANN, 2005). A maior parte a formação axonal e dendrítica ocorre durante esse período (BRANDT e col., 2003; AMBROGINI e col., 2004), incluindo o aparecimento transitório de dendritos basais (RIBAK e col., 2004). O alongamento do axônio dá-se imediatamente no período pós-mitótico (HASTINGS & GOULD, 1999) e suas conexões para o *Cornu Ammonis* (CA), particularmente a região CA₃, ocorre nos 4^º. a 10^º. dias seguintes (MARKAKIS & GAGE, 1999).

Para conclusão da diferenciação e maturação neuronal completa, é condição *sine qua non* a integração sináptica dos novos neuroblastos (TOZUKA e col., 2005). Os novos neurônios passam por um processo estereotipado para integração sináptica na circuitaria existente (revisado por GE e col., 2008). Durante os estágios iniciais de maturação os neuroblastos são tonicamente ativados pelo neurotransmissor ácido gama aminobutírico (GABA) liberado por interneurônios locais (BHATTACHARYYA e col., 2008; GE e col., 2006), que é seguido pelo estabelecimento de conexões sinápticas gabaérgicas e posteriormente glutamatérgicas (ESPOSITO e col., 2005; GE e col., 2006; OVERSTREET-WADICHE e col., 2006b) e sinapses eferentes projetando-se para a região CA₃ (Figura 1) (FAULKNER e col., 2008; TONI e col., 2008).

Comparados a células granulares maduras, os novos neurônios exibem alta plasticidade sináptica durante estágios específicos do desenvolvimento (GE e col., 2008; SCHMIDT-HIEBER e col., 2004). Sete semanas após a divisão, os novos neurônios exibem propriedades eletrofisiológicas de neurônios maduros, como disparo de potenciais de ação (revisado por MONGIANT & SCHINDER, 2011), podendo ser finalmente integrados à circuitaria hipocampal. As células não recrutadas para maturação são eliminadas por apoptose (ZHAO e col., 2006; DAYER e col., 2003).

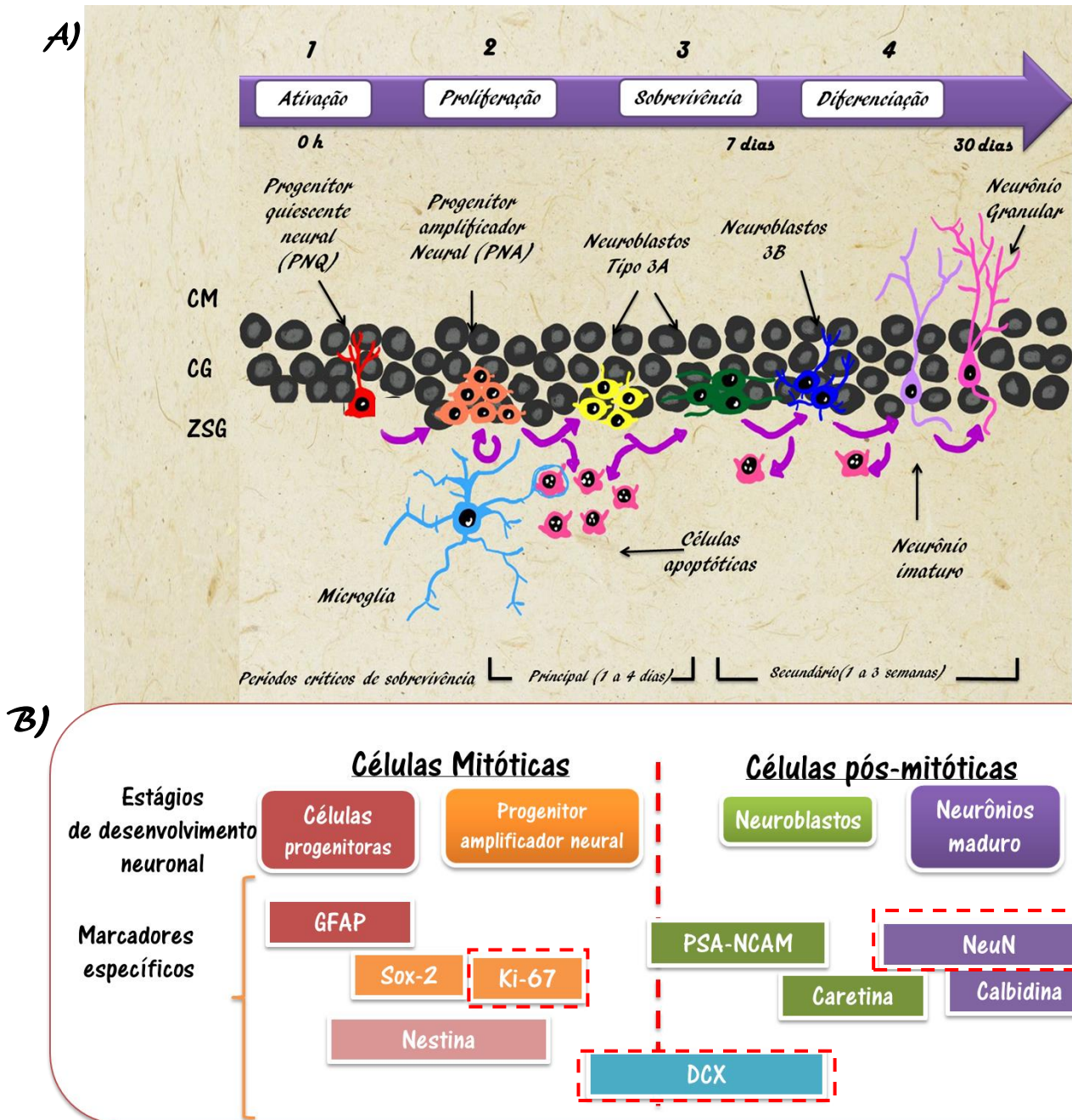


FIGURA 3. Representação esquemática da neurogênese adulta hipocampal: **A)** Estágios do processo de neurogênese. Progenitores neurais quiescentes (PNQ) atuam como células-tronco dividindo-se assimetricamente e dando origem a progenitores neurais amplificadores (PNA) que proliferam rapidamente antes de entrar no processo de apoptose ou diferenciar-se em neuroblastos. Esses neuroblastos passam por um estágio de neurônios imaturos antes de se integrarem à circuitaria hipocampal como um neurônio granular maduro. **B)** Resumo dos principais marcadores de desenvolvimento neuronal expressos durante a neurogênese pós-natal, os marcadores sinalizados em vermelho foram utilizados nesse trabalho. Abreviações: ZSG – zona subgranular do giro dentado; cg - camada granular; cm - camada molecular.

1.4.Regulação da neurogênese

A neurogênese no encéfalo adulto pode ser regulada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Há na literatura um crescente número de estudos mostrando o impacto desses fatores na neurogênese (Tabela 1).

O processo de neurogênese é dinamicamente regulado por muitos estímulos fisiológicos. Por exemplo, o envelhecimento leva a uma redução drástica da proliferação celular na ZSG e ZSV (revisado por ROSSI e col., 2008); outro importante regulador negativo neurogênese adulta é a inflamação induzida por lesões, doenças neurodegenerativas e irradiação (revisado por CARPENTIER & PALMER, 2009).

Fatores dinâmicos podem afetar diferentes estágios do processo de neurogênese, incluindo expansão (proliferação), diferenciação (i.e. neuronal *vs.* glial), e sobrevivência. Cada estágio da neurogênese adulta pode ser regulado por estímulos diferentes e cada estímulo pode atuar em múltiplos alvos. Além disso, o impacto na rede de neurogênese quase sempre resulta diferentes combinações de efeitos nos estágios individuais do desenvolvimento neuronal e da interação de diferentes fatores. Em geral, a regulação da neurogênese adulta por estímulos externos é complexa e o efeito depende do tempo, da dose / duração, paradigmas específicos, modelos animais (idade, sexo, linhagem), e métodos de análise.

Nesse tópico será enfatizada a ação modulatória do aprendizado e atividade física na neurogênese hipocampal.

Tabela 1. Alguns fatores que modulam a neurogênese hipocampal

Fator		Efeito	Referências
Enriquecimento ambiental		+	Kempermann e col., 1997
Fatores de crescimento	BDNF	+	Pencea e col., 2001
	EGF	+	Kunh e col., 1997
	FGF-2	+	Kunh e col., 1997
	IGF-1	+	Alberg e col., 2000
	VEGF	+	Jin e col., 2002
Hormônios	Corticosterona	+	Cameron e col., 1994
	Estrogênio	+	Tanapat e col., 1999
	Testosterona	+	Brannvall e col., 2005
Isquemia	Isquemia	+	Takagi e col., 1999
Atividade física	Corrida em esteira voluntária	+	Van Praag e col., 1999
	Corrida em esteira forçada	+	Uda e col., 2006
Stress	Odor de predador	-	Tanapat e col., 2001
	Psicosocial	-	Gould e col., 1997
	Restrição	-	Pham e col., 2003
	Isolamento social	-	Lu e col., 2003
	Restrição calórica	+	Kumar e col., 2009
Dieta	Dieta hipercalórica	-	Lindqvist e col., 2006

Atividade física

Roedores expostos a uma roda de atividade em sua gaiola usam essa oportunidade para se exercitar durante seu período ativo. Camundongos e ratos chegam a correr de um a oito quilômetros por noite, sendo esse montante de atividade estimado como um reflexo da atividade física natural (KEMPERMAN, 2010).

Diversos estudos demonstram que atividade física é um indutor robusto do aumento da neurogênese no giro denteado em animais jovens, adultos e idosos (KEMPERMAN e col., 1998; VAN PRAAG e col., 1999a, 1999b; TREJO e col., 2001; RA e col., 2002; KIM e col., 2007; NAYLOR e col., 2005; WOLF e col., 2006; KRONENBERG e col., 2003; 2006; BICK-SANDER e col., 2006; STEINER e col., 2008; WU e col., 2008; FABEL & KEMPERMAN, 2008; KANNANGARA e col., 2010; KOHMAN e col., 2012). Supreendentemente, a atividade física voluntária não exerce qualquer tipo de influência na neurogênese do sistema olfatório (BROWN e col., 2003).

A atividade física tem um efeito pro-proliferativo agindo primeiramente sobre os progenitores neurais amplificadores (células tipo II) do hipocampo (Figura 4) (KRONENBERG e col., 2003; STEINER E COL., 2008). Existe um efeito não-independente presumível nos estágios subsequentes do desenvolvimento neuronal, envolvendo a promoção de sobrevivência. Mesmo quando o efeito da proliferação retorna a níveis basais, a população de células positivas para DCX continua a aumentar (KRONENBERG e col., 2003).

O efeito da atividade física na fase de proliferação não é necessariamente refletido na neurogênese; i.e., na ausência de um estímulo apropriado para a sobrevivência, presumivelmente esse potencial não será traduzido em aumento de neurogênese (KEMPPERMAN, 2010).

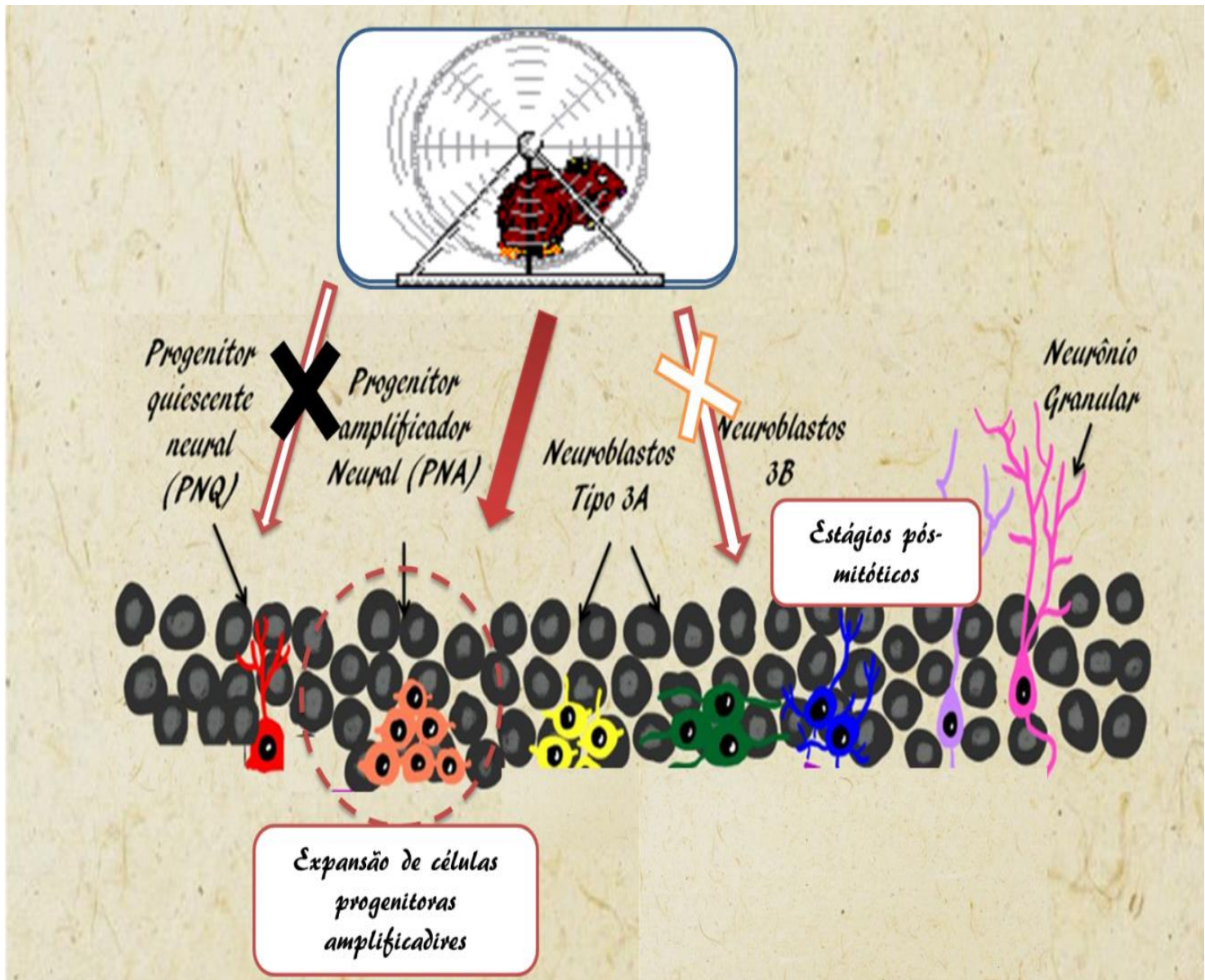


Figura 4. Efeito da atividade física na neurogênese adulta hipocampal. A atividade física não induz alterações nos progenitores neurais quiescentes (PNQ), mas leva a uma expansão dos progenitores neurais amplificadores (PNA) e pode ter efeito em neuroblastos que expressam doublecortina.

Aprendizado

O aprendizado é o processo de aquisição de informações provenientes do ambiente e de representações endógenas, enquanto memória é o processo pelo qual essas informações são codificadas e armazenadas, sendo posteriormente, conforme a necessidade, decodificadas e utilizadas.

O hipocampo exerce papel fundamental para a consolidação de memórias declarativas em todas as espécies de mamíferos (Squire & Zola, 1996). Diversas tarefas comportamentais que são utilizadas para análise do efeito modulatório do aprendizado no processo de neurogênese são hipocampo-dependentes (Tabela 2).

Tabela 2. Tarefas comportamentais utilizadas para avaliar os efeitos do aprendizado na neurogênese (KEMPERMANN, 2010).

Função alvo		Tarefas
Dependentes da função hipocampal	Espaciais	Labirinto Aquático de Morris (plataforma submersa)
		Labirinto de Barnes
		Labirinto Radial
		Reconhecimento de objetos
	Não espaciais	Condicionamento de medo ao contexto
Independentes da função hipocampal		Labirinto Aquático de Morris (Plataforma visível)
		Esquiva ativa

O primeiro relato de modulação do processo de neurogênese pelo aprendizado foi feito por Elizabeth Gould e colaboradores, em 1999. Nesse estudo, BrdU foi utilizado para marcar células em divisão uma semana antes do início dos testes comportamentais. Ratos treinados no labirinto aquático de Morris, uma tarefa de memória espacial dependente da função hipocampal, exibiram maior número de novos neurônios no giro denteado. Em ratos jovens a taxa de proliferação celular é

maior em relação ao número de neurônios imaturos que sobrevivem até a maturidade. Uma grande quantidade de novos neurônios imaturos morre durante as duas primeiras semanas pós-mitose (CAMERON e col., 1993). Entretanto, Elizabeth Gould e colaboradores (1999) demonstram que o aprendizado de tarefas dependentes do hipocampo é capaz de “resgatar” essas células do processo de apoptose, promovendo aumento da sobrevivência e incorporação dessas na circuitaria do giro denteado.

Esse estudo pioneiro proporcionou evidências convincentes da interação entre o aprendizado e a neurogênese adulta, dando suporte à idéia de um possível papel funcional dos novos neurônios na memória (ver adiante). Diversos estudos posteriores mostraram que o aprendizado de diferentes tarefas dependentes do hipocampo leva ao aumento da neurogênese e da sobrevivência dos novos neurônios (LEMAIRE e col., 2000; AMBROGINI e col., 2000; SHORS e col., 2001; DÖBRÖSSY e col., 2003; HAIRSTON e col., 2005; OLARIU e col., 2005; LEUNER e col., 2006; DUPRET e col., 2007), ao passo que a aprendizagem de tarefas independentes do hipocampo não alteraria o número de novos neurônios na mesma região (GOULD e col., 1999; SHORS e col., 2001; VAN DER BORGHT e col., 2005; revisado por DENG e col., 2010).

Existem controvérsias sobre o efeito do aprendizado na regulação da neurogênese, notadamente a respeito da aprendizagem espacial. Enquanto alguns estudos apontam que o aprendizado espacial possui efeito na sobrevivência de novos neurônios (AMBROGINI e col., 2000; HAIRSTON e col., 2005; EPP e col., 2007, 2010, 2011), outros estudos referem-se a uma redução do número de novos neurônios no giro denteado (DOBROSSY e col., 2003; AMBROGINI e col., 2004; MOHAPEL e col., 2006; EPP e col., 2011). Existem ainda relatos de que o aprendizado não teria qualquer efeito na sobrevivência desses novos neurônios (DÖBRÖSSY e col., 2003; EHNINGER & KEMPERMANN, 2006; MOHAPEL e col., 2006; VAN DER BORGHT e col., 2006; DUPRET e col., 2007).

A falta de resultados consistentes nos estudos descritos acima sugere que embora a aprendizagem espacial possa influenciar positivamente a sobrevivência dos novos neurônios, esse efeito não deve ser considerado universal. É possível que existam condições em que a sobrevivência de novos neurônios seja maior, ao passo que em outras condições esse efeito de sobrevivência é reduzido ou não é afetado.

Uma análise desses estudos revela uma variedade de diferenças metodológicas que poderiam explicar os resultados diferentes, entre eles, a idade dos neurônios imaturos no momento de exposição à aprendizagem espacial, a espécie / linhagem de animal empregado, os protocolos de injeção de BrdU , as diferenças de gênero e tipo de paradigma de aprendizado empregado, entre outros (EPP e col., 2007; 2010; 2011; GARTHE e col., 2009; CHOW e col., 2012).

Um aspecto importante a ser considerado nesse tipo de estudo é o curso temporal envolvido na produção de células e sua relação com mudanças na capacidade de adquirir novas informações. Por exemplo, novos neurônios podem ser críticos para o aprendizado apenas quando são maduros e integrados em uma rede neural pré-existente. Muitos estudos têm investigado a incorporação funcional de neurônios imaturos no hipocampo por meio da expressão de genes de expressão imediata (IEG), usados como marcadores da atividade neuronal (RAMIREZ-AMAYA e col., 2006; KEE e col., 2007; TASHIRO e col., 2007). O processo de integração e ativação envolvendo uma tarefa espacial parece levar entre 4 e 8 semanas para ser completado (KEE e col., 2007; OVERSTREET e col., 2004; VAN PRAAG e col., 2002 SNYDER e col., 2009), sendo este tempo de maturação variável para diferentes espécies de roedores (SNYDER e col., 2009).

1.5. Possíveis funções da neurogênese hipocampal

Imediatamente após a descoberta da neurogênese hipocampal adulta, foi proposto que ela pode determinar mudanças comportamentais, tanto no que tange ao aprendizado e memória, quanto em relação a funções emocionais (ALTMAN & DAS, 1965; CAMERON e col., 1994; GOULD e col., 1999). Considerando que mudanças permanentes na expressão dos genes codificam memórias de longo prazo, e que a aquisição destas memórias são em última instância uma etapa final e irreversível da diferenciação celular, então o neurônio inteiro, não apenas a sinapse, pode ser considerado uma unidade de aprendizagem e o número de neurônios disponíveis para o armazenamento de novas memórias de longo prazo seria inversamente relacionado com o número de memórias previamente adquiridas (BARNEA, 2009). Esse mecanismo remete a uma função importante da neurogênese

sobre o aumento da capacidade de aprendizado e armazenamento de novas informações.

Embora ainda em fase de intenso debate, análises envolvendo os níveis celular, de circuitos, sistemas e de comportamento têm gerado, ao longo dos últimos anos, evidências de contribuições críticas dos novos neurônios para as funções hipocampais (DENG e col., 2010; LAZARINI & LLEDO, 2011; AIMONE e col., 2011; SAHAY e col., 2011).

No nível celular, os novos neurônios apresentam propriedades especiais que são distintas dos neurônios maduros. Quando sinapticamente conectados os novos neurônios exibem hiperexcitabilidade e aumento da plasticidade sináptica de suas aferências glutamatérgicos durante um período crítico de maturação, o que pode permitir que os novos neurônios recentemente integrados contribuam para o processamento de informações. No nível de circuitos, esses novos neurônios são responsáveis por determinadas propriedades especiais do circuito local (SNYDER; 2001; SCHMIDT-HIEBER e col., 2004; GE e col., 2008;). Impedimento da neurogênese leva a diminuição da amplitude da resposta evocada pela via perfurante (LACEFIELD e col., 2010).

No nível de sistemas, uma série de modelos computacionais da neurogênese adulta tem fornecido pistas de como a adição de novos neurônios pode alterar propriedades de redes neurais e têm sugerido papéis distintos para os novos neurônios em diferentes estágios de maturação neuronal (AIMONE & GAGE, 2011).

No nível comportamental, várias condições que diminuem a neurogênese no giro denteado em roedores são associadas com déficits de aprendizado. Isso inclui estresse, níveis elevados de glicocorticóides, e envelhecimento (DRAPEAU e col., 2003; MONTARON e col., 2006;). Reciprocamente, condições que aumentam a neurogênese, como enriquecimento ambiental e atividade física, tendem a aumentar o desempenho de tarefas dependentes do hipocampo (KEMPERMANN e col., 1997; VAN PRAAG e col., 1999; 2005). Há também inúmeros estudos que não encontram correlação ou encontram correlação negativa entre neurogênese e aprendizado (LEUNER e col., 2006). Entretanto, é importante ressaltar que a correlação positiva entre o número de neurônios e o desempenho de aprendizado não implica necessariamente numa relação causal.

Uma questão a ser considerada é que a linha de tempo para a alteração na produção de células pode não corresponder diretamente a mudanças nas habilidades de aprendizado. Por exemplo, parece improvável que a produção de novos neurônios possa ter um efeito imediato no processo de aprendizado, porque as células provavelmente requerem certo nível de diferenciação para ter impacto no comportamento. Além disso, deve-se considerar também o fato que muitos fatores que afetam a neurogênese alteram outros aspectos da estrutura cerebral, como a arquitetura dendrítica e o número de sinapses. Essas alterações também estão relacionadas com o aprendizado dependente do hipocampo, assim torna-se difícil interpretar a correlação entre novos neurônios e aprendizagem.

Uma metodologia direta para avaliar as implicações funcionais dos novos neurônios para função hipocampal é através da ablação seletiva da neurogênese (Tabela 3). A ablação de progenitores neurais tem sido atingida farmacologicamente pela administração sistêmica de agentes anti-mitóticos como acetato de metilazoximetanol (MAM; BRUEL-JUNGERMAN e col., 2005; SHORS e col., 2001). A irradiação ionizante aplicada focalmente é outro método bastante utilizado para ablação da neurogênese (BAYER & ALTMAN, 1975; MOREIRA, MOREIRA, BUENO e XAVIER, 1997; SANTARELLI e col., 2003; SAXE e col., 2006; WINOCUR e col., 2006; CLELLAND e col., 2009).

Ambos os métodos podem induzir efeitos não específicos no desempenho da função cerebral aumentando as chances de resultados falsos positivos. A presença desses vieses levou ao desenvolvimento de novos modelos de ablação genética, que podem ser utilizados para eliminar células progenitoras ou novos neurônios ou torná-los disfuncionais (SAXE e col., 2006; BERGAMI e col., 2008; DUPRET e col., 2008; IMAYOSHI e col., 2008; JESSESBERG e col., 2009; KITAMURA e col., 2009). Além disso, há poucos casos de animais *knockout* (ex: Ciclina D2, Preinilina.1) que expressam reduzida neurogênese e tem sido utilizados para elucidar aspectos funcionais dos novos neurônios (KEMPERMANN, 2010).

A Tabela 3 resume os resultados de uma longa lista estudos de ablação que tem variadas metodologias de redução ou bloqueio da neurogênese e seus resultados funcionais.

Tabela 3. Estudos de ablação da neurogênese e seus efeitos no comportamento

Teste comportamental	Método de Ablação	Espécie	Resultado	Referências
Labirinto aquático de Morris	Irradiação	Camundongo	Déficit	Rola e col., 2004 Raber e col., 2004
	Irradiação	Camundongo	Sem Déficit	Meshi e col., 2006
	Irradiação e Ablação genética	Camundongo	Sem Déficit	Saxe e col., 2006
	Ablação genética	Camundongo	Déficit	Zhang e col., 2008; Deng e col., 2009; Dupret e col., 2008 Imayoshi e col., 2008
	Droga anti-mitótica	Camundongo Rato	Déficit Sem déficit	Garthe e col., 2009 Shors e col., 2002
	Irradiação	Rato	Déficit Sem déficit	Snyder e col., 2005 Madsen e col., 2003 Hernandez-Rabaza e col., 2009
	Knockdown	Rato	Déficit	Jessberger e col., 2009
Medo Condicionado ao contexto	Irradiação	Camundongo	Déficit	Saxe e col., 2006 Ko e col., 2009
	Ablação genética	Camundongo	Déficit	Imayoshi e col., 2008
	Ablação genética	Camundongo	Sem déficit	Zhang e col., 2008
	Drogas anti-mitóticas	Rato	Sem déficit	Shors e col., 2002
	Irradiação	Rato	Déficit	Winocur e col., 2006 Wojtowicz e col., 2008
Reconhecimento de objetos	Irradiação	Camundongo	Sem déficit	Rola e col., 2004
	Irradiação	Camundongo	Déficit	Kim e col., 2007
	Irradicação	Rato	Sem déficit	Madsen e col., 2003
	Drogas anti-mitóticas Knockout	Rato Rato	Déficit	Bruel-Jungerman e col., 2005 Jessberger e col., 2009

A principal crítica aos modelos de ablação refere-se a questionável especificidade de seu efeito. Outros aspectos a serem considerados são o tempo e a extensão da ablação dos novos neurônios sendo esses fatores críticos na detecção de

déficits de aprendizagem. Novos neurônios podem participar no aprendizado apenas por um período discreto depois de sua produção e a detecção de déficits de aprendizado pode requerer ablação de forma mais extensa para que possam ser percebidas alterações comportamentais. Falsos negativos podem ocorrer se a ablação é insuficiente em extensão ou se o intervalo entre ablação e treinamento for inadequado. Além disso, mecanismos compensatórios podem entrar em ação dependendo do tempo em que a ablação ocorre, gerando resultados controversos.

Coletivamente, esses estudos têm sugerido significativa contribuição da neurogênese adulta para o aprendizado e a retenção da memória espacial de longo prazo, discriminação de padrões espaciais, medo condicionado ao contexto (revisado por DENG e col., 2010; AIMONE e col., 2011; MARÍN-BURGIN & SCHINDER, 2012).

Modelos computacionais (AIMONE e col., 2009) e experimentais (CLELLAND e col., 2009) sugerem que neurônios imaturos podem ser críticos para criar associações entre memórias aprendidas próximas no tempo (AIMONE e col., 2009) e podem ajudar a distinguir memórias relacionadas no espaço (CLELLAND e col., 2009).

Assim, existem fortes evidências de correlação entre neurogênese e função hipocampal. No entanto, existem controvérsias sugerindo ser necessário o desenvolvimento de abordagens experimentais que combinem análises em níveis celulares, de circuitos, sistemas e de comportamento, que controlem mais robustamente o curso temporal desses diferentes aspectos, almejando esclarecer como a neurogênese adulta pode contribuir para a aprendizagem, memória e regulação do humor.

2. Memória

Memória é a habilidade dos seres vivos de adquirir, reter e utilizar informações. O termo **aprendizado** é utilizado para designar um primeiro estágio da memória que é a **aquisição** de novas informações provenientes do ambiente, enquanto o termo memória diz respeito ao processo de consolidação, a curto ou longo prazo, de conhecimentos ou eventos, associados à capacidade de evocar e utilizados quando necessário (TULVIN, 1987). Sua importância reside no fato que o indivíduo pode alterar seu comportamento ou decisões, baseado em experiências prévias, que lhe conferem uma vantagem adaptativa frente a diversos fatores que a sobrevivência impõe, facilitando, por exemplo, o forrageio de alimentos, reconhecimento de padrões de um predador (ex: odor) entre outros (HELENE & XAVIER, 2007).

A formação de memórias é dependente da capacidade do sistema nervoso de modificar-se frente a experiências. Acredita-se que o arquivamento de informações no sistema nervoso seja decorrente de alterações transitórias na atividade eletrofisiológica de populações de neurônios distribuídos no sistema nervoso, para o armazenamento de informações por curtos períodos de tempo; processos de facilitação de transmissão sináptica, para o arquivamento de informações por períodos intermediários de tempo e de modificações estruturais permanentes na conectividade neuronal, para o arquivamento de informações por períodos prolongados de tempo (HELENE & XAVIER, 2007). O processo de formação da memória é subdividido em nas seguintes etapas: aquisição, consolidação e evocação (Figura 5).

A **aquisição** ou aprendizado corresponde ao momento em que informações são detectadas pelos sistemas sensoriais, ou seja, a exposição à experiência. Durante a aquisição ocorre uma seleção das informações que são mais significantes (LENT, 2010).

A **consolidação** das informações adquiridas é o passo seguinte na formação da memória, após um período de tempo variável (minutos ou horas) posterior ao contato com o estímulo/experiência a ser memorizado, as informações recém-adquiridas tornam-se estáveis por meio de uma série de processos que envolvem

síntese proteica e modificações sinápticas resultando na consolidação. Essa é uma fase instável e sujeita a modulações (IZQUIERDO, 2002; SQUIRE & KANDEL, 2003). Muller e Pilzecker (1900) apresentaram o termo consolidação para indicar que após a aprendizagem, a memória está inicialmente em um estado lábil, mas que ao longo do tempo ela torna-se estável e resistente (MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO, 2002; DUBAI, 2004; ALBERINI, 2011).

Timothy Bliss e Terje LØmo (1973) mostraram que neurônios hipocampais de coelhos exibem um aumento na magnitude da resposta pós-sináptica depois da estimulação elétrica de alta frequência num axônio pré-sináptico durante alguns segundos. Esse potencial pós-sináptico é muito maior do que o observado a um estímulo anterior de mesma intensidade. Esse aumento da resposta pode durar horas, dias ou meses. Esse padrão de respostas neuronais reforçadas e persistentes ficou conhecido como potenciação de longa duração ou *long-term potentiation* (LTP). A LTP corresponde a um processo de facilitação, dependente da duração e frequência do estímulo repetitivo; em condições naturais, esses estímulos repetitivos seriam desencadeados pelo processo de aprendizagem (IZQUIERDO, 2002; BLUNDON & ZAKHARENKO, 2008).

A **evocação** corresponde ao momento em que as informações aprendidas podem ser recuperadas e utilizadas.

O comportamento é a expressão mais notória do funcionamento do sistema nervoso. Por meio do comportamento é possível deduzir que há evocação de memórias em animais. Exemplos disso ocorrem na supressão de um comportamento inato (como deixar de explorar um ambiente devido à presença de um estímulo aversivo nesse ambiente) ou aquisição de um comportamento “não natural” (como acionar uma alavanca diversas vezes mediante estímulos apetitivos). Durante a fase de evocação, as memórias podem se tornar instáveis por um período de tempo limitado, podendo ser novamente estabilizadas, num processo conhecido como **reconsolidação** da memória (SARA, 2000; MONFILS e col., 2009) ou extintas (HERRY e col., 2010).

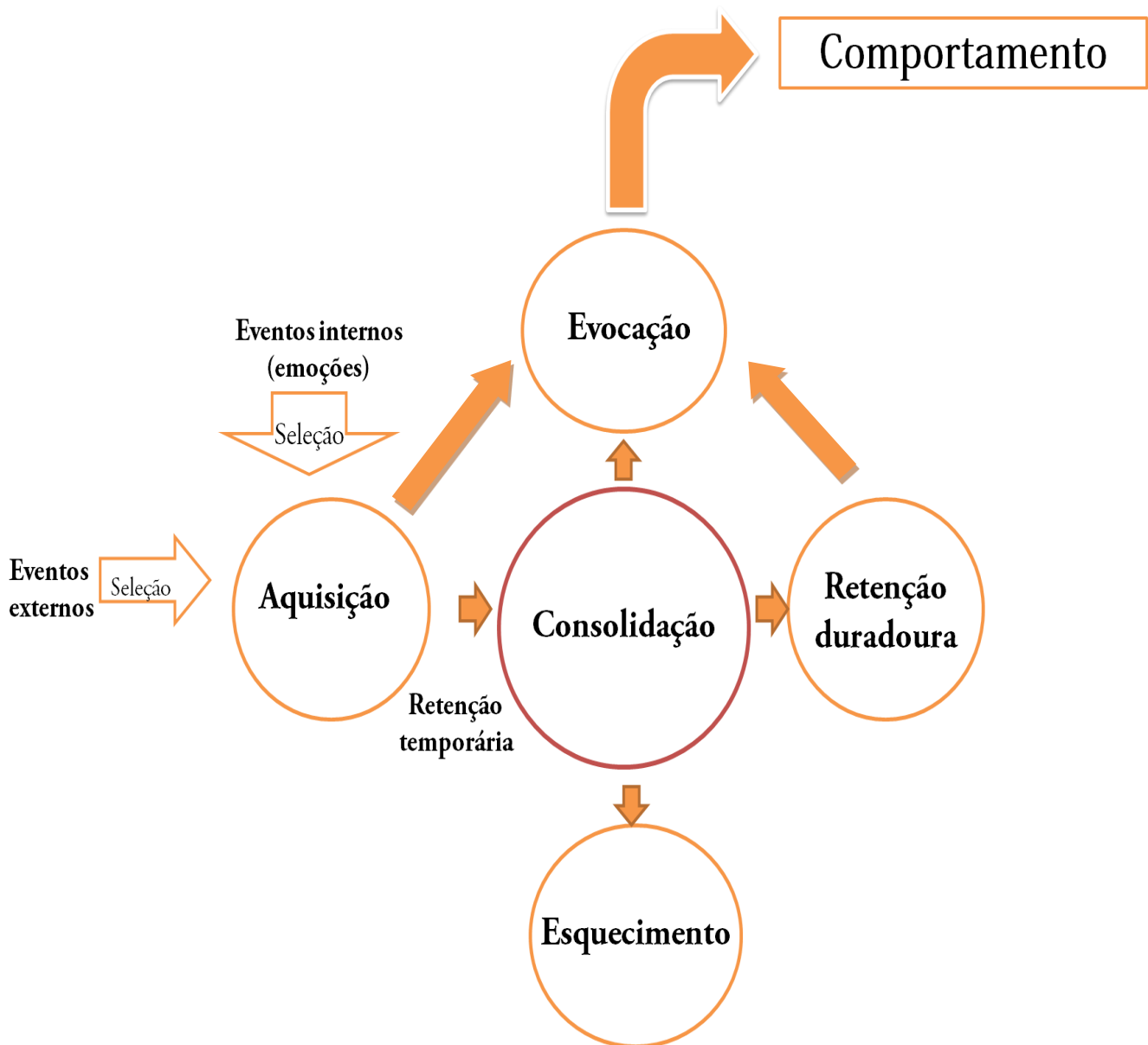


FIGURA 5. Formação de memórias.

Cabe ressaltar que as memórias são moduladas pelas emoções, pelo nível de alerta e pelo estado de ânimo, em todas as suas etapas, incluindo a evocação (CAHILL & MCGAUGH, 1998; IZQUIERDO, 2002; MCGAUGH 2004, 2005).

2.1 Memória espacial

A memória espacial é crucial para a sobrevivência, pois está relacionada com a habilidade para codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações espaciais. Essas informações permitem ao indivíduo localizar sua toca, além de alimento e água em determinado hábitat, lembrar locais já forrageados, onde ocorreram experiências que trouxeram riscos, e recordar se há a presença de coespecífico ou predadores na área (BEST e col., 2001).

O'Keefe e Nadel (1978) postularam a existência de pelo menos dois tipos de navegação espacial: o sistema de mapeamento e o sistema de Táxon.

Sistema Hipocampal de Mapeamento

Esse sistema trata do uso de estratégias aloclétricas em que o indivíduo constrói um mapa cognitivo do ambiente, através de múltiplas triangulações de estímulos presentes no espaço físico, itens (ou eventos) pertencentes aquele ambiente, incluindo seus valores atribuídos (vantagem *vs* prejuízo, e.g., local A contém fonte de alimento, local B contém risco de injúria ou predador) e estímulos do próprio corpo. Assim, independente da posição que o animal esteja nesse ambiente, ele é capaz de se localizar por meio das múltiplas triangulações entre estímulos ambientais e ele próprio, estabelecidos em explorações anteriores desse ambiente, e mesmo identificar atalhos ou novas possibilidades de trajetos nunca antes percorridos, mas dedutíveis a partir do mapa espacial estabelecido.

Sistema de Táxon

Nesse sistema o animal utiliza estratégias de guiamento envolvendo uma pista preponderante do ambiente ou rotas. Estas estratégias subdividem-se em dois grupos: orientação e guiamento.

A estratégia de **orientação egocêntrica** tem como base a sinalização proprioceptiva e rotações do corpo, em relação a um estímulo externo marcante. Os animais aprendem uma sequência de movimentos corporais através de informações

egocêntricas e aprendem uma sequência de comportamentos para atingir o local ou pista alvo (ex: virar 45° à direita).

A estratégia de **guiamento** baseia-se na movimentação (aproximação ou distanciamento) em relação a um objeto ou pista específica, sem a necessidade de estabelecer triangulações entre objetos e eventos do ambiente (ex: ir em direção ao prédio azul).

Segundo O'Keefe e Nadel (1978), a navegação baseada em mapas cognitivos proporciona uma maior flexibilidade e adaptação a mudanças ambientais, pois mesmo após a remoção de diversos estímulos ou objetos de um ambiente o animal ainda será capaz de orientar-se se alguns objetos ou pistas inicialmente presentes ainda estiverem disponíveis. Já a navegação baseada em estratégias de orientação/guiamento é pouco flexível, uma vez que essa é dependente de um estímulo preponderante.

Além disso, os autores sugerem que as informações espaciais ficariam armazenadas em algum sistema de memória adaptado para reter e codificar informações espaciais, sendo proposto que a formação hipocampal corresponderia a esse sistema. A orientação baseada em estratégias de guiamento (sistema de Táxon) seria independente da integridade hipocampal.

A proposta de O'Keefe e Nadel (1978) de que integridade da formação hipocampal é essencial para a formação de mapas cognitivos é corroborada por diversas evidências experimentais. Entre elas, estudos de neurofisiologia que mostram que o disparo de células piramidais hipocampais está associado a localização do animal no ambiente. Essas células foram denominadas células de lugar (do inglês *place cells*) e sugeridas como substrato inicial das habilidades espaciais inerentes à navegação espacial (O'KEEFE & DOSTROVSKY, 1971; SHAPIRO, 1997; MORRIS, 2000; D'HOOGE E DE DEYEN, 2001; MOSER e col., 2008; LANGSTON e col., 2010) e estudos envolvendo lesões ou danos ao hipocampo que resultam em marcados prejuízos de orientação espacial, particularmente em tarefas que dependem do sistema de mapeamento espacial (ver adiante).

2.2 Labirinto aquático de Morris como instrumento de avaliação da memória espacial

Os estudos sobre o envolvimento da formação hipocampal no sistema de navegação por mapeamento cognitivo foram impulsionados com a descrição da tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM) introduzido por Richard Morris (1982) há mais de que 30 anos atrás, que se tornou uma das tarefas mais amplamente utilizadas na neurociência comportamental para avaliar o processamento de memórias espaciais (MORRIS e col., 1982; GARTHE & KEMPERMANN, 2013).

O labirinto aquático consiste de uma piscina circular preenchida com a água (opaca pela adição de um pigmento branco - leite ou tinta não tóxica), em uma sala com pistas evidentes nas paredes e uma câmera de registro acoplada a um software de análise (Figura 6). Essa piscina contém uma plataforma submersa, 1-2 cm abaixo do nível de água, que é utilizada pelos animais como forma de escapar da água, mantida a 26°C.

Nesta tarefa, o animal deve navegar pela piscina para encontrar a plataforma submersa que não é visível. Esse arranjo permite que pistas intra-labirinto sejam minimizadas; ademais, os animais não podem utilizar seu olfato para encontrar a plataforma, sendo sua localização estabelecida com base nas pistas distais da sala, i.e., as pistas ou pontos de referencia do ambiente externo ao labirinto (piscina). A cada tentativa o animal inicia a tarefa em diferentes pontos de partida da borda da piscina, o que estimula a adoção de uma estratégia de orientação aloccêntrica para a execução da tarefa. Ademais, essa manipulação minimiza o uso de estratégias de guiamento (MORRIS, 1983; WISHAW e MITTLEMAN, 1986; SANTOS, 1999; XAVIER, 1999).

Uma grande variedade de protocolos tem sido desenvolvida com esta tarefa, mas eles podem ser agrupados em duas categorias principais, uma que envolve a versão para avaliar memória de referência e outra que envolve a versão para avaliar memória operacional (XAVIER e col., 1999; SANTOS, 1999; ANDERSON e col., 2006).

Para avaliar a **memória de referência espacial**, a plataforma é mantida na mesma localização ao longo dos dias de treino, e a cada tentativa o animal parte de um ponto distinto da borda da piscina. Assim, o animal formula uma memória sobre a localização da plataforma que é aplicável a vários dias diferentes, sendo portanto relevante armazenar esta informação ao longo dos dias de treino. Admite-se que haja a formação de um mapa cognitivo que contém não só informações sobre a

distribuição espacial das diferentes regiões da piscina como dos estímulos da sala, permitindo reconhecer locais específicos que podem ser lembrados como parte de uma rota e, portanto, mais utilizado em tentativas subseqüentes. Essa versão está relacionada com a formação de uma memória de “longo prazo” ou memória de referência (OLTON, 1983).

Diferentemente para avaliar a **memória operacional espacial**, a localização da plataforma é modificada a cada dia, permanecendo fixa nas tentativas de um mesmo dia. O ponto de partida varia de tentativa para tentativa, estimulando a adoção de estratégias de mapeamento cognitivo. Esse tipo de protocolo permite avaliar um tipo de memória temporária em que o animal deve, a cada dia, procurar pela plataforma em um local diferente em relação ao dia anterior. Porém, como a localização da plataforma é mantida constante ao longo das tentativas de um mesmo dia, os animais devem reter a informação sobre a localização da plataforma de modo a encontrá-la mais prontamente na segunda e demais tentativas de um dia. Como a localização da plataforma a cada dia é variada aleatoriamente, a informação sobre sua localização num dado dia é irrelevante para os dias subseqüentes. Portanto, trata-se de uma informação útil para facilitar o desempenho da tarefa na segunda e demais tentativas de um dia, sendo irrelevante para os demais dias. Portanto, esse tipo de memória está associada a um contexto temporal específico e válido para aquele dia e pode ser “apagado” após seu uso. Em outras palavras, este teste permite avaliar se o animal se vale da informação adquirida na primeira tentativa para encontrar a plataforma mais rapidamente, na segunda e demais tentativas do dia para melhorar seu desempenho, sendo que a informação da localização da plataforma deixa de ser útil quando as tentativas daquele dia são concluídas. Ademais, como o intervalo de tempo entre as tentativas pode ser variado, pode-se avaliar a duração da memória operacional, pela variação do intervalo entre as tentativas (OLTON, 1983; SANTOS, 1999).

Diversos estudos mostram que lesões ou danos ao hipocampo e/ou suas conexões resultam em um profundo déficit de memória espacial, sem prejuízo no desempenho de tarefas de natureza não espacial (MORRIS e col., 1992; EICHENBAUM, 1999; XAVIER e col., 1999; BEST e col., 2004; BROADBENT e col., 2004;).

XAVIER e col. (1999) testaram ratos com perda seletiva de células granulares do giro denteado, lesados pela aplicação múltipla e tópica de colchicina, nas versões de memória de referencia e operacional do labirinto aquático de Morris. Os animais lesados exibiram prejuízos notórios em ambas as versões da tarefa, sinalizando desorganização do sistema de orientação aloentríca; no entanto, na versão de referência os animais foram capazes de adquirir, por meio do sistema de orientação/guiamento, informações relevantes para o desempenho da tarefa, ao passo que na versão envolvendo memória operacional, os ratos não exibiram qualquer melhora em seu desempenho mesmo quanto o intervalo entre tentativas foi virtualmente zero. Outros estudos com resultados similares sugerem que o hipocampo e estruturas relacionadas parecem necessários para o desempenho de tarefas de memória operacional (para uma completa revisão sobre a importância do giro denteado para a orientação espacial ver XAVIER & COSTA, 2009).

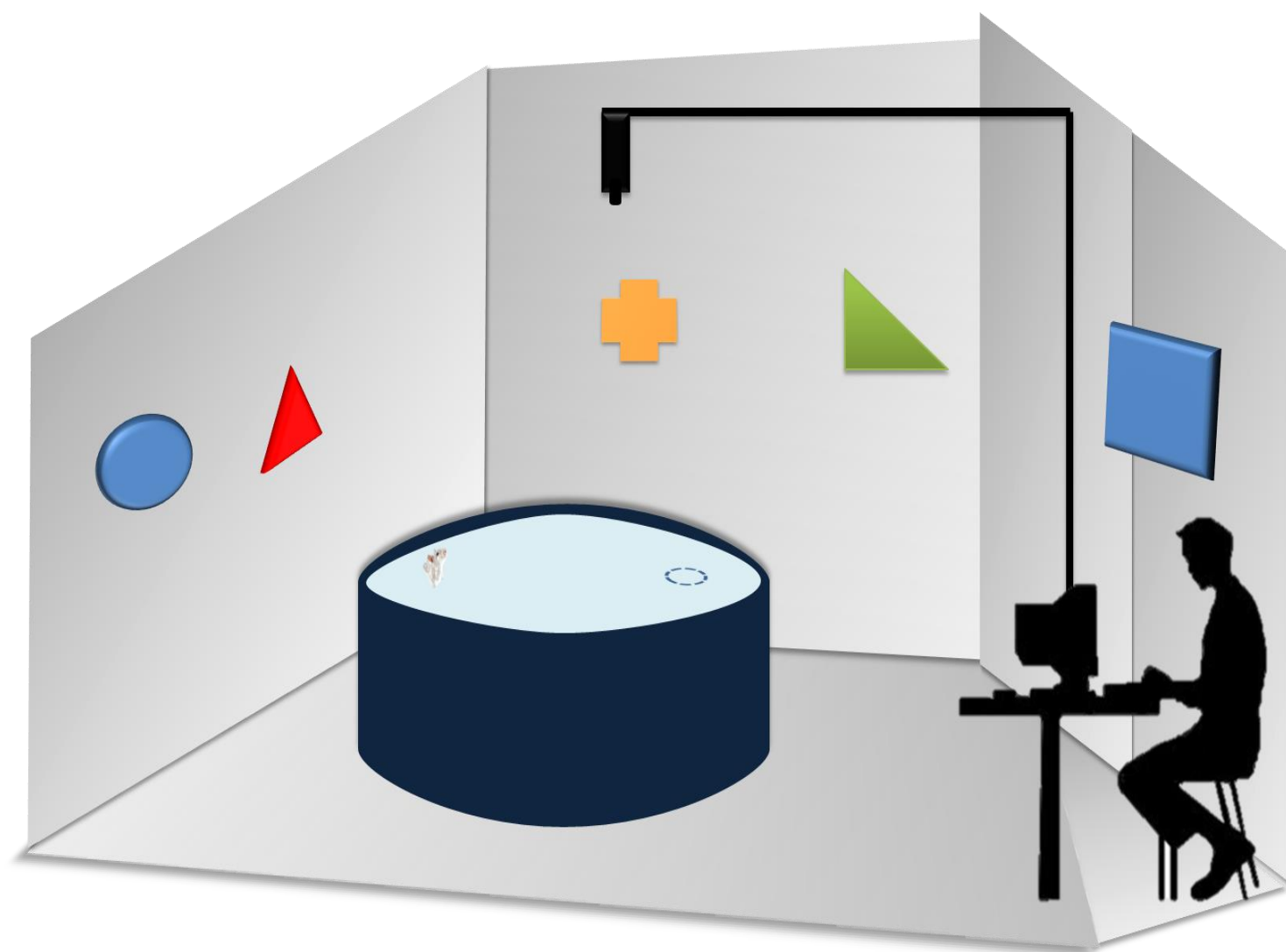


FIGURA 6- Esquema representativo do labirinto aquático de Morris.

2.3 Atividade física, neurogênese e memória espacial

Sabe-se que a prática regular de atividades físicas resulta em adaptações orgânicas, decorrentes de alterações metabólicas, endócrinas e neuro-humorais, capazes de melhorar a saúde física e mental (MATTSON, 2000; COTMAN & BERCHTOLD, 2002; WINTER e col., 2007; VAYNMAN & GOMEZ-PINILLA, 2006; COTMAN e col., 2007).

A atividade física, independente da modalidade, traz diversos benefícios para o sistema nervoso de animais em estado saudável, patológico e em diferentes faixas etárias (DUSTMAN e col., 1990; KRAMER e col., 1999; GOMEZ-PINILLA e col., 2002; MARIN e col., 2003; VAYNMAN e col., 2004; HUANG e col., 2006; KIM e col., 2007; LOU e col., 2008; BERCHTOLD e col., 2010).

A visão em torno da importância da atividade física mudou significativamente quando foi demonstrado que o exercício físico é um fator indutor da neurogênese hipocampal em mamíferos adultos (VAN PRAAG e col., 1999). Surpreendentemente o exercício não somente atuava na melhora de funções metabólicas, mas também no aprimoramento de funções cognitivas (FABEL e KEMPERMANN, 2008).

Em humanos, exercícios aeróbicos regulares têm sido associados à melhora de desempenho em tarefas que requerem funções executivas, memória operacional e memória espacial (COLCOMBRE & KRAMER, 2003; COTMAN e col., 2007; BERCHTOLD e col., 2010; RUSCHWEYH e col., 2011). Estudos em roedores comprovam melhoras no aprendizado, na memória, e na plasticidade do sistema nervoso como resposta ao exercício físico (LAMBERT e col., 2005; MOLTENI e col., 2002; 2004; NEPPER e col., 1995; VAN PRAAG e col., 2005; VAYNMAN e col., 2004).

O consenso atual de que o exercício promove melhoras no aprendizado e memória de roedores é baseada em dois regimes principais de atividade física, o **exercício voluntário** [e.g., atividade voluntária na roda de atividade - o animal tem livre acesso à roda e exibe atividade voluntária que é também intermitente (COTMAN e col., 2005), influenciada pelo ritmo circadiano, tem velocidade auto-determinada e predominância do metabolismo aeróbico], e **atividade forçada** [corrida em esteira ou natação (o animal é obrigado a realizar exercício físico em intensidade e duração determinados pelo experimentador, impondo maior demanda energética -

esse tipo de atividade ativa respostas neuroendócrinas de estresse, em função das configurações de treinamento (SHERWIN, 1998; ARIDA e col., 2004)].

Os efeitos benéficos da atividade física sobre a plasticidade cerebral e função cognitiva podem ser mediados em parte por um incremento na vasculatura do cérebro (angiogênese), bem como do fluxo sanguíneo neste tecido (BLACK e col., 1990; VAN DER BORGHT e col., 2009; RHYU e col., 2010), que levam a otimização do transporte de nutrientes, oxigênio e neurotrofinas (CLARK e col., 2009).

Dentre as neurotrofinas, é importante destacar o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que está envolvido na regulação da sobrevivência neuronal e neurogênese (BERCHTOLD e col., 2005; COTMAN e BERCHTOLD, 2002) e pode estar diretamente envolvido nos efeitos benéficos proporcionados pelo exercício físico (GOMEZ-PINILLA e col., 2008; LISTA e SORRENTINO, 2010). Sabe-se que a administração de BDNF exógeno é capaz de reverter déficits no processo de aprendizagem e memória, indicando que esta neurotrofina possui papel importante nos processos cognitivos (COTMAN e BERCHTOLD, 2007). Contudo, outros fatores neurotróficos também atuam nesses processos, dentre eles vale destacar o fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e *Nerve growth factor* (NGF) que promovem crescimento e reparo celular (NEEPER e col., 1995; BERCHTOLD e col., 2005; VAYNMAN e col., 2006; HUANG e col., 2006; BLACKMORE e col., 2009; LAFENETRE e col., 2010).

Faz-se importante também destacar que a atividade física induz a uma cascata de alterações funcionais e estruturais parcialmente interdependentes no sistema nervoso (Figura 7). Essas alterações incluem: aumento da densidade de espinhas dendríticas (STRANAHAN e col., 2007), aumento da eficácia de LTP (VAN PRAAG e col., 1999) e redução das variáveis relacionadas ao estresse oxidativo (OGONOVSKY e col., 2005; RADAK e col., 2006). Além disso, o exercício físico afeta os sistemas de neurotransmissão, por exemplo, aumento crescente dos níveis de serotonina, noradrenalina e de acetilcolina (LISTA & SORRENTINO, 2010) e aumento da densidade de receptores de dopamina (FORDYCE & FARRAR, 1991). Todos esses fatores desempenham papéis importantes na indução da neuroplasticidade.

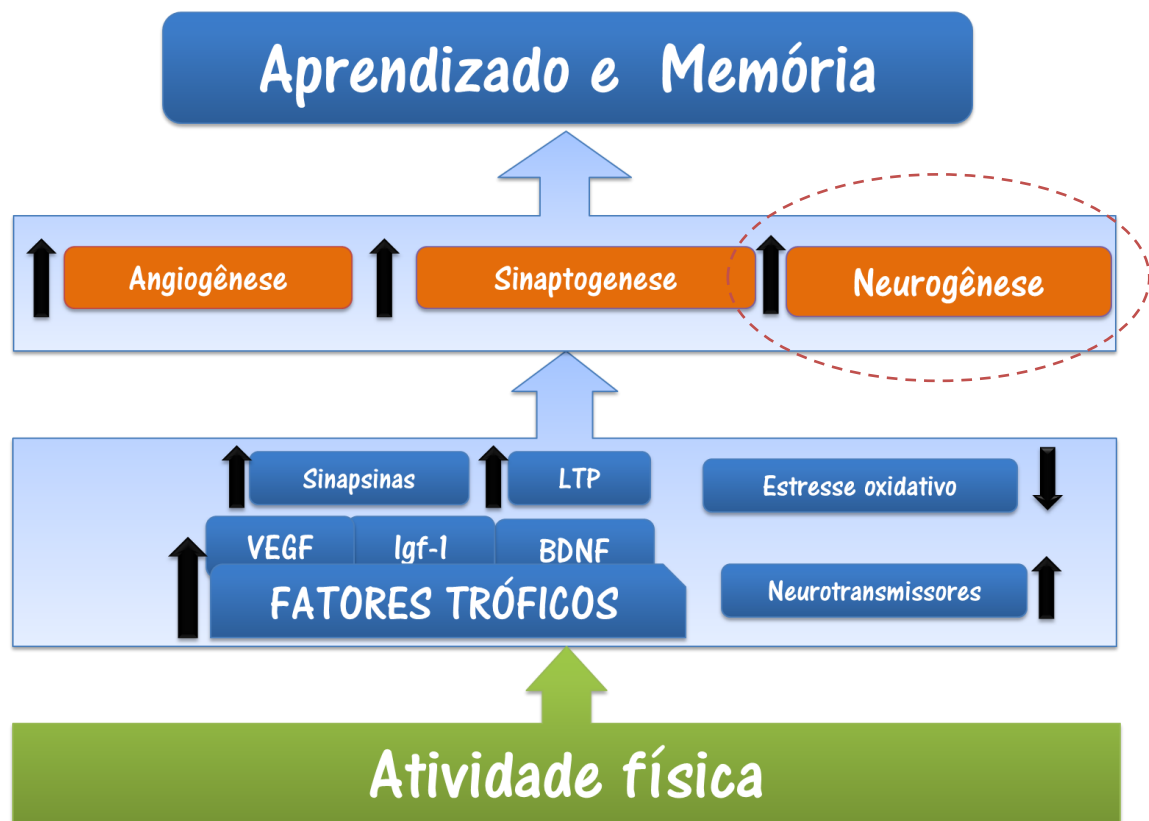


Figura 7: Efeitos da atividade física no encéfalo. A atividade física regula a aprendizagem, através de cascatas de fatores de crescimento, que modulam os processos de neurogênese, angiogênese e sinaptogenese.

No presente estudo, entretanto, avaliaremos apenas os efeitos da atividade física na neurogênese hipocampal adulta.

Os efeitos decorrentes do exercício físico sobre o giro denteado de roedores podem ser observados 24 horas após a primeira sessão de treinamento, entretanto, a detecção dos efeitos mais pronunciados se dá após 3 dias de atividade física (VAN PRAAG e col., 1999). Estudos que investigam a indução da neurogênese pela atividade física espontânea utilizam diferentes períodos de exercício, variando de 3 dias a 6 meses. Com relação à duração que a atividade física espontânea deve ser praticada para que seja obtidos maiores taxa de indução da neurogênese, foi observado que corrida por períodos curtos (3-9 dias) provocam um aumento de proliferação celular de até 5 vezes nos valores encontrados em animais controles, em

contrapartida, corrida por períodos prolongados (24- 32 dias) faz com que a taxa de proliferação retorne ao seu nível de basal (NAYLOR e col., 2005; KRONENBERG e col., 2006).

O aumento na taxa de neurogênese pós-exercício é acompanhado por melhor desempenho em tarefas de memória espacial (UYSALET e col., 2005; VAN PRAAG e col., 2005; ALBECK e col., 2006; UDA e col., 2006; BARRIENTOS e col., 2011; AQUÍAR e col., 2011), assim como uma melhor consolidação de memórias associadas ao contexto (KOHMAN e col., 2012). Estudos com roedores demonstram que o exercício facilita a aquisição e/ou retenção em tarefas dependentes do hipocampo incluindo o labirinto aquático de Morris (VAYNMAN e col., 2004; VAN PRAAG e col., 2005; RHODES e col., 2008; MARLLAT e col., 2012), labirinto radial (NICHOL e col., 2007), labirinto aquático radial (KHABOUR e col., 2010, 2012; BERCHTOLD e col., 2010; ALOMARI e col., 2013) e reconhecimento de objetos (O'CALLAGHAN e col., 2007). Diante dessas evidências, o exercício físico parece mobilizar uma cascata de eventos moleculares que culmina na formação de novos neurônios no hipocampo, com consequente aumento da plasticidade sináptica e melhora nos processos de aprendizagem e memória.

Embora esteja bem estabelecido que o exercício aumenta a aquisição e/ou retenção de uma tarefa cognitiva, não se sabe por quanto tempo os benefícios trazidos pelo exercício se mantêm após o término da atividade física. Os relatos que abordam essa questão temporal ainda são escassos na literatura. Por exemplo, Radak e colaboradores (2006) mostraram que os benefícios da atividade física na memória de esQUIVA passiva são perdidos após 6 semanas do final do treinamento. Kitamura e colaboradores (2003) mostraram que a neurogênese dependente de exercício cessa após 3 semanas de sua interrupção, o curso temporal dos benefícios após o término da atividade física parece ser importante para a melhora cognitiva subsequente. A atividade física por curtos períodos de tempo mantém a proliferação de células precursoras elevadas. Presumivelmente, na presença de estímulo apropriado para a sobrevivência, essas células são incorporadas às redes neurais (ver KRONENBERG e col., 2003). Em outras palavras, considerando que o aprendizado de tarefas dependentes do hipocampo modula a neurogênese, é possível que o exercício físico associado à exposição a tarefas dependentes da função hipocampal, promovam não apenas a neurogênese, mas também a sobrevivência e o recrutamento desses novos

neurônios e sua integração a circuitos hipocampais. Esse processo, porém, pode ser dependente do intervalo temporal entre a neurogênese estimulada por exercício físico e a incorporação dessas novas células aos circuitos hipocampais, estimulada pelo desempenho de tarefas dependentes da função hipocampal.

Neste estudo investigamos a relação temporal entre os efeitos benéficos da atividade física associado ao aprendizado de tarefa dependente da função hipocampal, e sua relação com a neurogênese, levando em consideração também o tempo decorrido desde o término da atividade física.

Neste trabalho utilizamos a atividade física voluntária como um fator indutor de neurogênese e como forma de mobilizar esses novos neurônios utilizaremos duas versões do labirinto aquático de Morris, uma dependente da função hipocampal e outra independente, e avaliaremos como o aprendizado modula sua sobrevivência. A introdução de diferentes intervalos de tempo entre o nascimento desses novos neurônios e seu engajamento na tarefa, permitiu avaliar se a idade dos neurônios imaturos pode influenciar o aprendizado e determinar sua sobrevivência.

3.OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo central do presente estudo é investigar os efeitos da atividade física espontânea no aprendizado de tarefa dependente da função hipocampal, e sua relação com a neurogênese, levando em consideração o tempo decorrido desde o término da atividade física regular e o engajamento no desempenho dessas tarefas.

3.2 Objetivos específicos

- i. Determinar o curso temporal do término dos efeitos benéficos do exercício físico regular sobre o desempenho de tarefa sensível à função hipocampal, particularmente, a versão que envolve memória operacional no labirinto aquático de Morris.
- ii. Avaliar o efeito do aprendizado espacial sobre a sobrevivência de novos neurônios induzido pela atividade física.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sujeitos

Foram utilizadas ratos machos, adultos (2-3 meses), da linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia do IB-USP. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Neurociências e Comportamento, e alojados em grupos, 3 por gaiola (exceto quando foram alojados nas rodas de atividade em que o alojamento foi individual – ver adiante) e mantidos em ciclo de claro-escuro de 12h (luzes ligadas as 7h). A temperatura foi mantida em $23^{\circ}\text{C} \pm 2$. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum*. Os procedimentos adotados estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do Instituto de Biociências-USP (143/2011).

4.1.1. Grupos experimentais

O desenho experimental adotado envolveu um arranjo $2 \times 2 \times 3$, incluindo os fatores GRUPO (com 2 níveis), TAREFA (com 2 níveis) e INTERVALO (com 3 níveis). Isto é, o fator GRUPO, incluiu animais expostos a uma roda de atividade onde podiam realizar o exercício de correr espontaneamente (EXE). Animais controle não-exercitados (ÑEXE) também foram expostos à roda de atividade, porém travada, servindo assim de controle em relação à exposição ao ambiente da roda, porém sem a possibilidade de se exercitarem. O fator TAREFA envolveu animais expostos ao treinamento numa tarefa que requer memória operacional espacial no labirinto aquático de Morris, cujo desempenho é dependente da integridade do giro denteado hipocampal (H) (ver Xavier e col., 1999). Nesta tarefa uma plataforma submersa é apresentada numa nova localização a cada novo dia de treino, mantendo a mesma localização ao longo das tentativas do dia; o intervalo entre as tentativas pode variar. Ademais, em cada tentativa o animal parte de diferentes pontos da borda da piscina, estimulando o uso de orientação espacial baseada em mapas cognitivos, o que requer a integridade da função hipocampal. Como grupo controle ao engajamento da função hipocampal, um outro grupo de

animais foi exposto à tarefa da plataforma visível no labirinto aquático de Morris, em que a plataforma visível é apresentada numa localização diferente a cada tentativa, e o animal inicia cada tentativa a partir de pontos diferentes da borda da piscina. Sabe-se que esse tipo de tarefa INdepende da função hipocampal (ÑH), por não exigir mapeamento espacial, envolvendo apenas nadar em direção à plataforma visível. Por outro lado, esses animais são expostos ao mesmo ambiente, imersão na água e esforço de natação em relação aos animais expostos à tarefa espacial, mesmo não havendo demanda da função hipocampal. Finalmente, o fator INTERVALO refere-se ao número de semanas (1, 3 ou 6) decorridos entre o final da fase envolvendo exposição à roda de atividade e o início do treinamento no labirinto aquático. Portanto, foram incluídos 12 grupos:

- EXE-H-1. Exercitados, expostos à tarefa dependente do hipocampo 1 semana após o final do exercício,
- EXE-H-3. Exercitados, expostos à tarefa dependente do hipocampo 3 semanas após o final do exercício,
- EXE-H-6. Exercitados, expostos à tarefa dependente do hipocampo 6 semanas após o final do exercício,
- EXE-ÑH-1. Exercitados, expostos à tarefa **in**dependente do hipocampo 1 semana após o final do exercício,
- EXE-ÑH-3. Exercitados, expostos à tarefa **in**dependente do hipocampo 3 semanas após o final do exercício,
- EXE-ÑH-6. Exercitados, expostos à tarefa **in**dependente do hipocampo 6 semanas após o final do exercício,
- ÑEXE-H-1. **Não** exercitados, expostos à tarefa dependente do hipocampo 1 semana após exposição a roda travada,
- ÑEXE-H-3. **Não** exercitados, expostos à tarefa dependente do hipocampo 3 semanas após exposição a roda travada,
- ÑEXE-H-6. **Não** exercitados, expostos à tarefa dependente do hipocampo 6 semana após exposição a roda travada,
- ÑEXE-ÑH-1. **Não** exercitados, expostos à tarefa **in**dependente do hipocampo 1 semana após exposição a roda travada,
- ÑEXE-ÑH-3. **Não** exercitados, expostos à tarefa **in**dependente do hipocampo 3 semanas após exposição a roda travada, e
- ÑEXE-ÑH-6. **Não** exercitados, expostos à tarefa **in**dependente do hipocampo 6 semanas após exposição a roda travada.

Cada um desses grupos experimentais contou com 6 animais.

A Figura 8 ilustra o desenho experimental básico adotado no projeto.

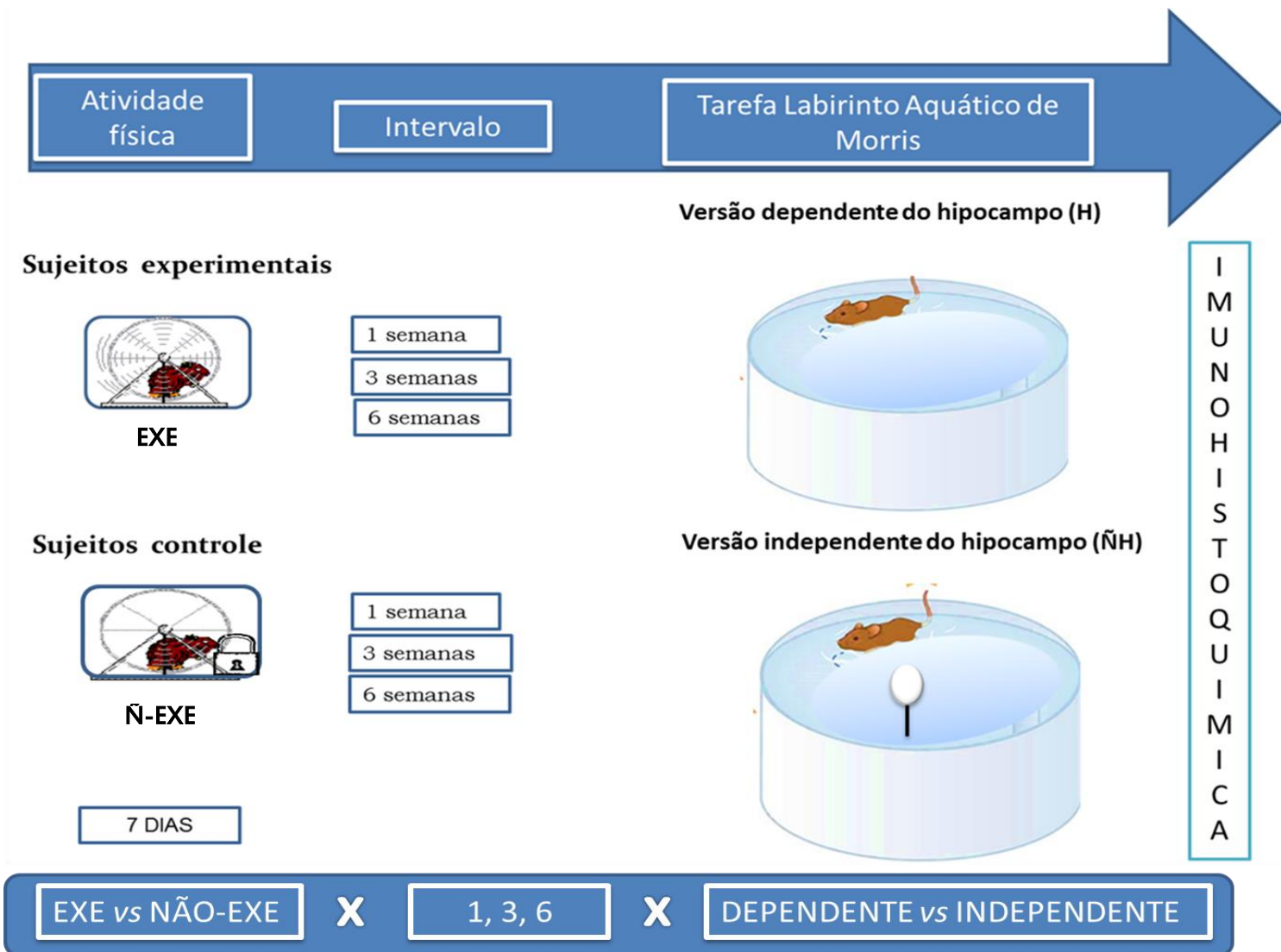


FIGURA 8. Desenho experimental básico. Os animais EXE tiveram acesso a roda de atividade ao longo de 7 dias. Animais ÑEXE foram expostos a roda de atividade travada, pelo mesmo período. Decorrido um INTERVALO de 1, 3 ou 6 semanas após o final da exposição a roda de atividade, os animais foram testados no labirinto aquático de Morris, sendo uma parte deles expostos a tarefa de memória operacional espacial, dependente da função hipocampal (H), e outra parte a uma tarefa de busca por uma plataforma visível, independente da função hipocampal (ÑH). Em ambos os casos, o intervalo entre as tentativas (ITI) foi de 10 minutos durante as sessões 1-6 e (virtualmente) zero minutos durante as sessões 7-10. Concluída a tarefa os cérebros foram processados para imuno-histoquímica.

4.2. Atividade física

Durante a fase de exposição a roda (livre ou travada), os animais foram alojados individualmente em gaiolas de acrílico medindo 25 x 46 x 38 cm, tendo livre acesso a uma roda de atividade com 30 cm de diâmetro, 10 cm de largura e 0,5 cm de espaço entre as barras (Figura 9), sendo as rotações automaticamente registradas por um microprocessador. O grupo ÑEXE foi exposto às mesmas condições experimentais; no entanto, não houve rotações na roda, pois a mesma encontrava-se travada. Os animais permaneceram nessas condições por 7 dias; após esse período foram alojados em gaiolas padrão.



FIGURA 9. Animais nas gaiolas que contém a roda de atividade que permite realizar, quando livre, espontaneamente, exercício físico (condição EXE). Para os animais na condição ÑEXE a roda de atividades foi mantida travada.

4.3. Administração de BrdU

Todos os animais receberam uma injeção intraperitoneal de BrdU (5-bromo-3'-deoxiuridina, Sigma) em solução de NaCl 0,9%, na dose de 210 mg/kg (70 mg/ml)

durante os 3 últimos dias do protocolo de atividade física. Essa dose foi selecionada por marcar o número máximo de células do giro denteado (Cameron & McKay, 2001).

4.4.Labirinto aquático de Morris

Aparelho

Foi utilizada uma piscina circular de 200 cm de diâmetro e 50 cm de altura, cuja parede foi pintada com tinta preta, preenchida até 25 cm com água tornada opaca pela adição de leite. Uma plataforma móvel de acrílico transparente medindo 9 cm de diâmetro, colocada a 2 cm abaixo da superfície da água, possibilitava sair da água, servindo de escape para os animais. Todo o experimento foi registrado por uma câmera de vídeo (VP112, HVS Image Ltd., Hampton, UK) conectada a um computador programado para analisar conjuntos de coordenadas que definem a posição do animal, coletados a cada 0,1 s.

Para fins descritivos a piscina foi dividida por duas linhas imaginárias perpendiculares que se cruzam ao centro, formando quatro quadrantes de mesmo tamanho. O quadrante que continha a plataforma foi denominado quadrante crítico. Além disso, havia uma área (imaginária), concêntrica à plataforma medindo três vezes seu diâmetro, denominada contador crítico. O tempo de permanência dos animais nestas áreas críticas reflete a precisão da busca pela plataforma. Três anéis medindo 33 cm de largura, concêntricos ao centro da piscina permitiram avaliar a distribuição da busca espacial dos animais em relação ao anel que continha a plataforma. O anel interno, que contém o centro da piscina, mede 33 centímetros de raio. O anel intermediário inicia-se a partir do limite do anterior e estende-se até 66 centímetros do centro da piscina. Por fim, o anel externo inicia-se a partir do limite do anterior e estende-se até o limite da piscina que mede 100 cm de raio. Em etapas iniciais de treinamento, espera-se que os animais permaneçam a maior parte do tempo no anel externo (zona próxima à parede da piscina); ao longo das sessões o rato passa a investigar as regiões intermediárias e centrais do labirinto, focalizando sua busca no anel intermediário, pois este contém a plataforma.

Na versão da tarefa que depende de memória operacional espacial no labirinto aquático, a plataforma teve sua localização alterada a cada dia de experimento. Assim, na primeira tentativa, o animal desconhecia a localização da plataforma

devendo procurá-la pela piscina. Ao final dos 120 segundos, caso a plataforma não fosse encontrada, os animais eram conduzidos até a sua localização, permanecendo na plataforma por um período aproximado de 20 segundos. Nas demais tentativas do mesmo dia, os animais deveriam utilizar as informações adquiridas na primeira tentativa para localizarem a plataforma. O intervalo entre as tentativas (“intertrial interval”, ou ITI) pode ser variado em função dos objetivos experimentais. No presente conjunto de experimentos o ITI foi de 10 minutos nas sessões 1 a 6 e 0 minutos nas sessões 7 a 10. A melhora de desempenho observada entre a primeira e a segunda tentativas caracteriza a aquisição da informação sobre a localização da plataforma naquele dia específico na primeira tentativa e a capacidade de reter-na na memória durante o ITI, resultando na melhora de desempenho na segunda tentativa.

Foram analisados para cada tentativa e ITI os parâmetros latência, comprimento do trajeto, porcentagem de tempo no quadrante crítico do dia anterior e frequência no contador do dia anterior.

Os parâmetros que melhor caracterizam as diferenças no desempenho determinadas pela aprendizagem entre as tentativas são o comprimento médio do trajeto e a latência. A latência refere-se ao tempo que o animal gasta desde sua colocação na água até alcançar a plataforma e o comprimento médio do trajeto representa o caminho percorrido pelos animais para chegarem à plataforma. Os parâmetros que refletem o tempo de permanência nos locais onde se achava a plataforma no dia anterior são medidas para avaliação da lembrança do animal sobre a localização da plataforma 24 horas antes do teste corrente.

A velocidade média de natação, calculada com base no trajeto total do animal dividido pelo tempo de permanência na piscina permite avaliar se os animais possuem algum comprometimento motor relacionado à execução da tarefa bem como reflete a motivação dos animais.

Foram realizadas duas fases no teste de memória operacional, variando-se o ITI. A primeira fase consistiu de 7 dias (ou sessões) com ITI igual a 10 minutos. A segunda fase envolveu 4 dias (ou sessões) com ITI virtualmente zero. Estes dados foram sintetizados calculando-se a média de cada uma das tentativas incluindo-se os dados das sessões de cada fase.

Concomitantemente para o grupo exposto à tarefa independente do hipocampo, realizou-se teste similar, porém envolvendo uma plataforma visível. Isto

é, colocou-se uma esfera de isopor branco com 9 cm de diâmetro 15 cm acima do local em que a plataforma submersa se encontrava, indicando sua localização. Este teste envolveu 4 tentativas por dia, variando-se a localização da plataforma a cada tentativa.

4.5. Histologia

Processamento dos encéfalos

Concluídos os testes comportamentais, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 33% na proporção de 0,4 ml/100 g (dose letal). Foram então perfundidos transcardiacamente com solução salina (0,9%, pH 7,4, a 4°C) seguida de solução fixadora de formaldeído (4% em tampão fosfato, pH 7,4, a 4°C). Os encéfalos foram removidos da caixa craniana, pós-fixados na mesma solução fixadora por uma noite e então crioprotetidos em solução tampão fosfato de sódio (PBS, 0,1 M, pH 7,4) mais sacarose a 20% até o momento da microtomia. Os encéfalos foram seccionados (Leica CM 1850) em cortes frontais de 40 µm de espessura, coletados em 12 séries paralelas, e armazenadas em solução anti-congelante até o momento de sua utilização.

Imunohistoquímica

A proliferação celular neural foi analisada por meio da proteína endógena Ki-67, que somente é expressa em células mitóticas em atividade, e BrdU, marcador de células em divisão que estão na fase “S” da mitose. A diferenciação neuronal e neurogênese foram evidenciadas utilizando animais tratados com BrdU e o anticorpo contra NeuN, em dupla imunofluorescência.

Ki-67

Para a detecção de células neurais imunorreativas a Ki67, secções montadas em lâminas eletrostáticas foram fervidas em ácido cítrico 0,01 M por 7 minutos (pH=6), lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e incubadas com anticorpo monoclonal feito em camundongo contra Ki-67, concentração de 1:200 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), por 48h, a 4°C. Então, as secções

foram lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e incubadas com o biotinilado IgG feito em cavalo contra camundongo durante 90 minutos a temperatura ambiente, lavadas novamente em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e então incubadas no complexo avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por mais 90 minutos, para então serem reveladas com solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno para visualização das células marcadas. Após lavagens em PBS 0,1 M (3 lavagens de 10 minutos cada), as lâminas contendo os cortes foram deixadas para secar por uma noite. Então, as secções foram contrastadas com tionina, desidratadas, diafanizadas e cobertas com lamínulas, usando DPX (distrene, plasticiser e xilene).

BrdU

Para a detecção de células neurais imuno-reativas a BrdU (IR-BrdU), as lâminas contendo os cortes foram fervidas em ácido cítrico 0,01M (pH=6) por 7 minutos, lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada), incubadas em solução de tripsina, desnaturadas por 30 minutos com ácido clorídrico 2,4N em estufa a 37°C, lavadas novamente com PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e incubadas com anticorpo monoclonal feito em camundongo contra BrdU (Vector Laboratories, 78 Burlingame, CA, EUA), na concentração de 1:100, por 48h, a 4°C. Então, as secções foram lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e incubadas com o biotinilado IgG feito em cavalo contra camundongo durante 90 minutos a temperatura ambiente, lavadas novamente em PBS 0,1M (5 lavagens de 6 minutos cada) e então incubadas no complexo avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por mais 90 minutos, para então serem reveladas com solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno para visualização das células marcadas. Após lavagens em PBS 0,1 M (3 lavagens de 10 minutos cada), as lâminas contendo os cortes foram deixadas para secar por uma noite. Então, as secções foram então contrastadas com tionina, desidratadas, diafanizadas e cobertas lamínulas, usando DPX (distrene, plasticiser e xilene).

BrdU/ NeuN

Inicialmente, para a detecção de células imuno-reativas a BrdU, foi seguido o protocolo descrito anteriormente até o momento da incubação do anticorpo primário

contra BrdU. Para a dupla imunofluorescência, após a incubação por 48h a 4°C, as lâminas foram lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e incubadas em solução contendo o anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, EUA), sendo utilizada a concentração de 1:1000, por 3 horas em temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e, para a marcação de neurônios maduros, foi usado NeuN acoplado ao fluoróforo AlexaFluor 488 (Millipore Corporate Headquarters, Billerica, MA, EUA) na concentração de 1:100 e tempo de incubação de 24 horas em temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e deixadas para secar por duas horas, sendo então cobertas com lamínulas utilizando glicerol 50% como meio de montagem.

Doublecortina (DCX)

Para a detecção de células neurais imunorreativas a DCX as secções de 40 µm montadas em lâminas eletrostáticas foram fervidas em ácido cítrico 0,01 M por 7 minutos (pH=6), lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e incubadas anticorpo monoclonal feito em coelho contra DCX (Abcam) em 3% NDS (*normal donkey serum*), em PBS. Seguinte à incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas em PBS 0,1 M (5 lavagens de 6 minutos cada) e incubadas com o “donkey α-goat” biotinilado (1:500) em 3% NDS, em PBS, durante 1 hora em temperatura ambiente, lavadas novamente em PBS 0,1M (5 lavagens de 6 minutos cada) e então incubadas no complexo avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por mais 90 minutos, para então serem reveladas com solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno para visualização das células marcadas. Após lavagens em PBS 0,1 M (3 lavagens de 10 minutos cada), as lâminas contendo os cortes foram deixadas para secar por uma noite. No dia seguinte, as secções foram contrastadas com tionina, desidratadas, diafanizadas e cobertas com lamínulas, usando DPX (distrene, plasticiser e xilene).

4.7. Análise histológica

Proliferação celular neuronal

A proliferação de células imunorreativas a Ki-67 e BrdU foi estimada contando-se manualmente células marcadas em microscopia de campo claro (E-1000, Nikon Corporation). As células localizadas até o limite de dois corpos celulares a partir da camada granular em direção ao hilo foram consideradas pertencentes à zona subgranular; células localizadas mais distalmente não foram incluídas na contagem. A cada 12^a secção, as células imunorreativas a Ki-67 e BrdU foram contadas bilateralmente na zona subgranular na ampliação de 400 ×. A contagem de células de cada animal foi somada por secção e, em seguida, multiplicado por 12 para obter uma estimativa do número total de células marcadas na zona subgranular..

Diferenciação neuronal

As análises do fenótipo neural foram realizadas em microscopia de fluorescência (Nikon Corporation, E-1000, Japão), sendo contabilizadas as células duplamente marcadas para BrdU e NeuN localizadas na camada granular do giro denteado do hipocampo, bilateralmente. A co-localização celular foi confirmada por meio de microscopia confocal (LSM 510, Zeiss, Alemanha)

Neurônios imaturos

A análise estereológica quantitativa das células hipocampais imunorreativas à doublecortina foi realizada nas dependências do Departamento de Anatomia no ICB-USP em colaboração com o Professor Doutor Jackson Cioni Bittencourt.

As secções reveladas para DCX foram contra-coradas com tionina, permitindo a delimitação das estruturas em microscópio óptico acoplado a sistema de estereologia constituído por uma platina motorizada (LudlElectronicProducts, Hawthorne, NY), câmera para captura (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) e o software StereoInvestigator (MBF Biosciences, Williston, VT).

O giro denteado do hipocampo foi delimitado com uma objetiva de baixo aumento, 4 X (Figura 10). Uma estimativa preliminar da população de neurônios marcados em um corte foi realizada, conforme ilustrado pelos pontos azuis na Figura 10A.

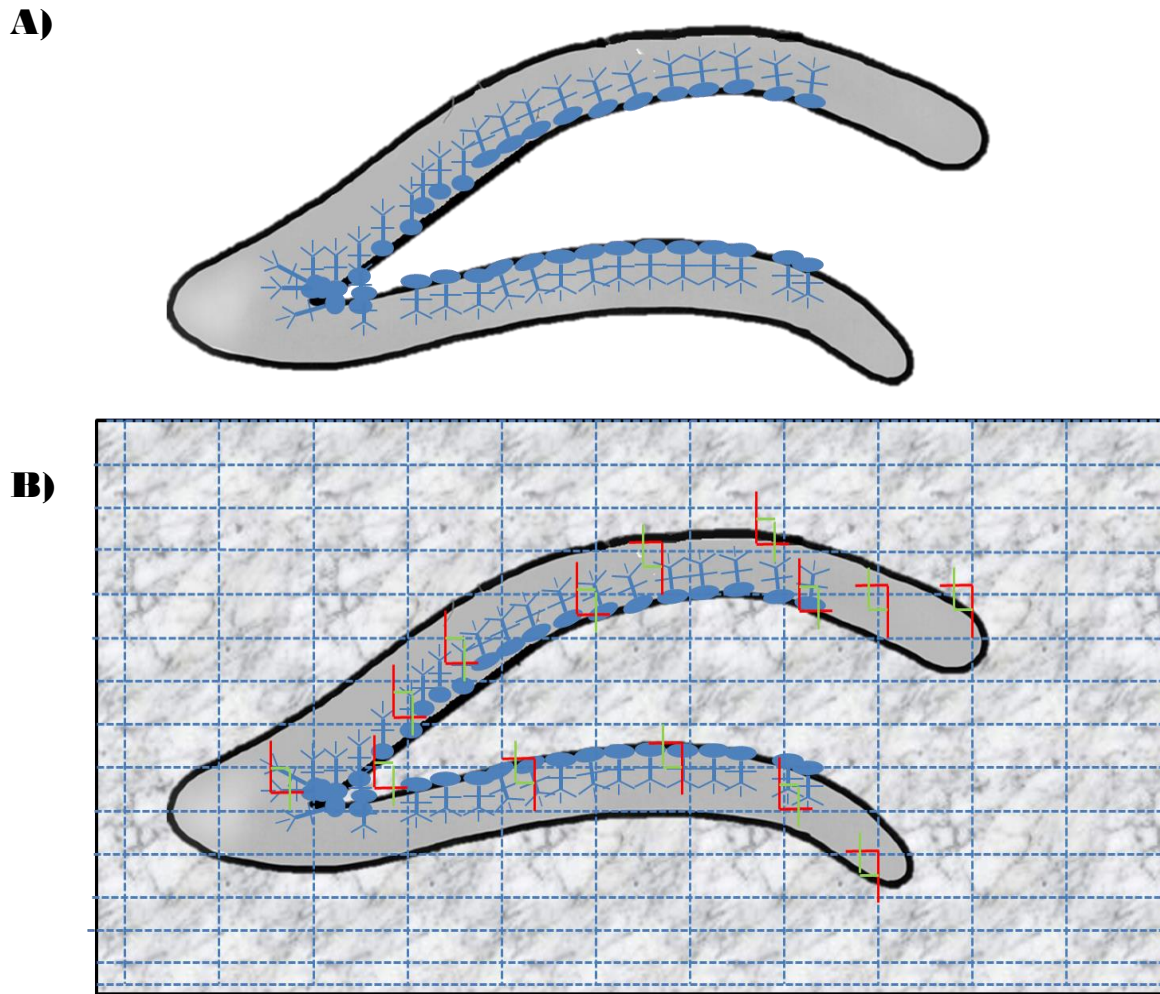


FIGURA 10. Representação esquemática da região nervosa cuja estimativa estereológica foi realizada. Em A, contorno do giro denteado (preto) e posição dos neurônios marcados. Em B, posicionamento dos campos amostrais (quadrados verde e vermelho) do fracionador óptico.

Os parâmetros para a estereologia foram então ajustados para uma região amostral de $40 \times 40 \mu\text{m}$, distribuídos em um retículo de $150 \times 150 \mu\text{m}$, posicionado aleatoriamente pelo programa em cada um dos quatro cortes amostrados em cada animal (Figura 10B).

5. RESULTADOS

5.1. Atividade física

A distancia percorrida diariamente pelos animais expostos ao exercício (EXE) é apresentada no Figura 11. A ANOVA revelou, como esperado, ausência de diferenças significativas entre os sujeitos dos grupos EXE₁, EXE₃ e EXE₆ ($F_{2,12} = 1,002$, $p = 0,3960$). Esse resultado era esperado, pois os intervalos de tempo pós-exercício, que diferencia os grupos, foram implantados posteriormente a exposição dos animais à roda de atividade. Portanto, o histórico dos animais dos diferentes grupos era exatamente o mesmo até a aquisição desses dados. A ANOVA revelou ainda um efeito significativo para o fator dia ($F_{6,12} = 19,93$, $p < 0,0001$), indicando que a distancia percorrida diariamente aumenta ao longo dos dias.

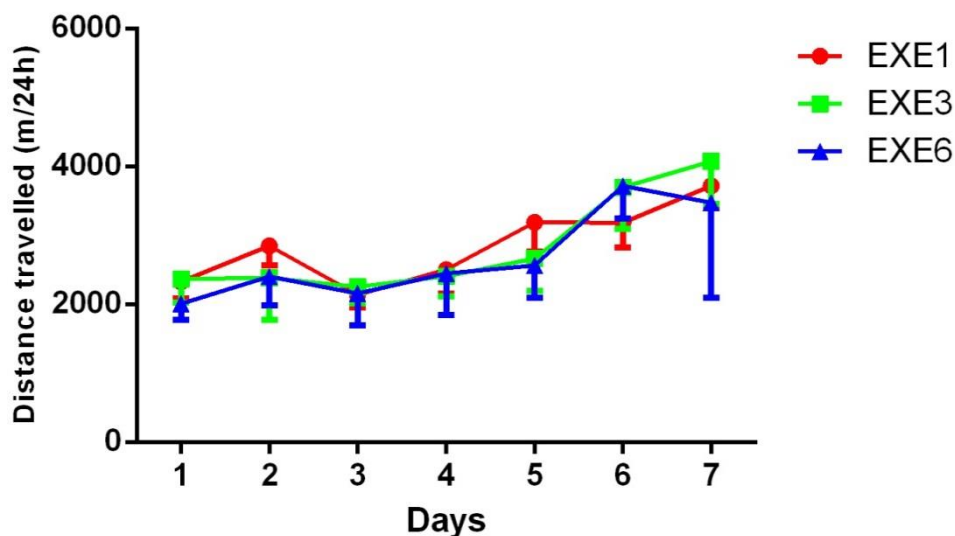


Figura 11. Distancia (em metros) percorrida a cada 24 horas (Média - E.P.M) pelos sujeitos dos grupos EXE ao longo de 7 dias de exposição à roda de atividade. Note que a divisão de grupos em relação ao fator INTERVALO após o exercício, de 1 (EXE₁), 3 (EXE₃) ou 6 (EXE₆) semanas, foi implementada posteriormente a exposição às rodas de atividade; portanto, não eram esperadas diferenças significativas em relação a esse fator.

5.2. Labirinto Aquático de Morris: Memória Operacional

Versão dependente do hipocampo

No teste de memória operacional a posição da plataforma é alterada a cada nova sessão (dia) de treinamento. Assim, na primeira tentativa de cada sessão os animais desconhecem sua localização. Porém, como uma mesma sessão inclui 4 tentativas, e a plataforma é mantida na mesma localização ao longo da sessão, o animal pode valer-se da informação obtida sobre a localização da plataforma na primeira tentativa daquele dia específico e melhorar seu desempenho ao longo das tentativas subsequentes. Foram realizadas duas fases de testes de memória operacional, variando-se o intervalo entre as tentativas (ITI – Intertrial Interval). Na primeira fase (dias 1-7) o ITI foi igual a 10 minutos. Na segunda fase (dias 9-11) o ITI foi virtualmente zero. Para efeitos de análise do desempenho, foram calculadas as médias dos escores de cada uma das tentativas incluindo as sessões de 5 a 7 com ITI de 10 minutos e as sessões de 9 a 11 com ITI de zero minutos.

Como o Figura 12 mostra, na primeira tentativa, quando a informação crítica sobre a localização da plataforma é desconhecida, a latência (Figura 12A) e comprimento do trajeto (Figura 12B) são relativamente mais longos. Entretanto, na segunda tentativa, quando os ratos podem utilizar a informação sobre a localização da plataforma obtida na primeira tentativa, há um decréscimo nos valores de latência e comprimento de trajeto, decréscimo este que é mais acentuado quando o ITI é igual à zero (Figuras 12A e 12B). Esses efeitos atingem níveis assintóticos nas tentativas três e quatro.

Congruentemente, em relação à latência e comprimento do trajeto, a ANOVA para medidas repetidas revelou efeito significativo para os fatores principais **ITI** ($F_{1,49} = 8,64-16,52$, $p < 0,005$) e **Tentativa** ($F_{3,147} = 105,28-106,46$, $P < 0,0001$). Em contraste, a ANOVA revelou ausência de efeitos significantes para latência e comprimento do trajeto em relação ao fator principal **GRUPO** (EXE VS Ñ-EXE) ($F_{1,49} = 0,58-0,62$, $p > 0,45$) e também em relação ao fator principal **INTERVALO** após o exercício (1, 3 ou 6 semanas) ($F_{2,49} = 0,33-0,68$, $p > 0,72$). Ademais, a ANOVA revelou ausência de interação significativa entre esses parâmetros ($p > 0,28$).

A versão de memória de operacional do labirinto aquático de Morris também proporciona, no dia seguinte a uma sessão, um teste de memória relativo à localização da plataforma 24 horas antes, uma vez que na primeira tentativa de cada sessão os animais tendem a buscar pela plataforma no local onde a mesma se encontrava no dia anterior. Em adição, decréscimos nessa busca ao longo das tentativas proporciona uma medida de extinção associada à aquisição da informação sobre a nova localização da plataforma, refletindo uma medida de flexibilidade comportamental. O Figura 13 mostra o tempo gasto no contador crítico do dia anterior (Figura 13A), o percentual de permanência dentro dessa área em relação a outras três áreas simetricamente localizadas (Figura 13B) e o número de entradas o contador crítico do dia anterior (Figura 13C). Como esperado, em relação a esses parâmetros a ANOVA revelou efeitos significantes para o fator principal **TENTATIVA** ($F_{3,147} = 31,15$ - 64,79, $p < 0.0001$), confirmando que na primeira tentativa os ratos buscam pela plataforma na localização crítica do dia anterior, mas extinguem essa busca ao longo das tentativas restantes.

ANOVA revelou ainda efeito significativo para o fator principal **INTERVALO** ($F_{2,49} = 6,24$, $p < 0,0039$) em relação a percentagem de tempo gasto no contador crítico do dia anterior e revelou ainda interação significativa em relação aos fatores **GRUPO x INTERVALO** ($F_{2,49} = 3,67$, $p < 0,0327$) para frequência de entradas no contador crítico do dia anterior.

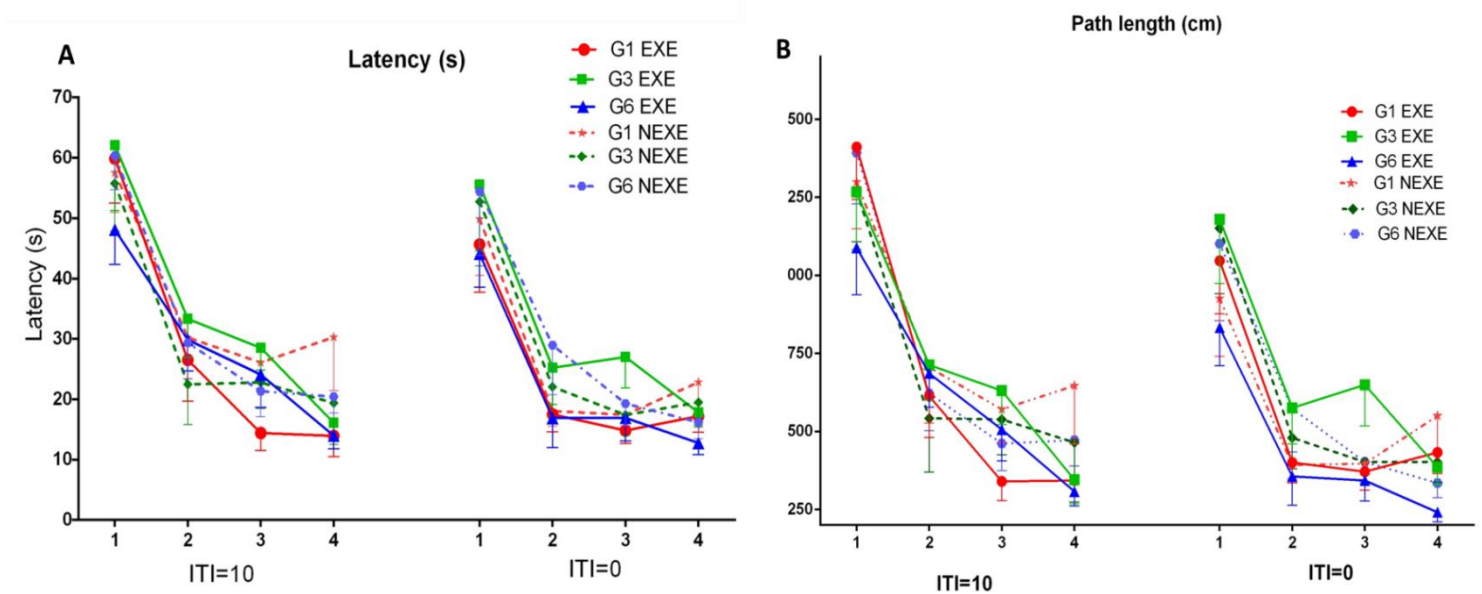


Figura 12. Médias das latências (em segundos) (A) e comprimento de trajeto (cm) (B) (-E. P.M.) ao longo das tentativas no teste de memória operacional do labirinto aquático de Morris em função do ITI, e Grupos (EXE versus Ñ-EXE) incluindo intervalo (1, 3 ou 6 semanas).

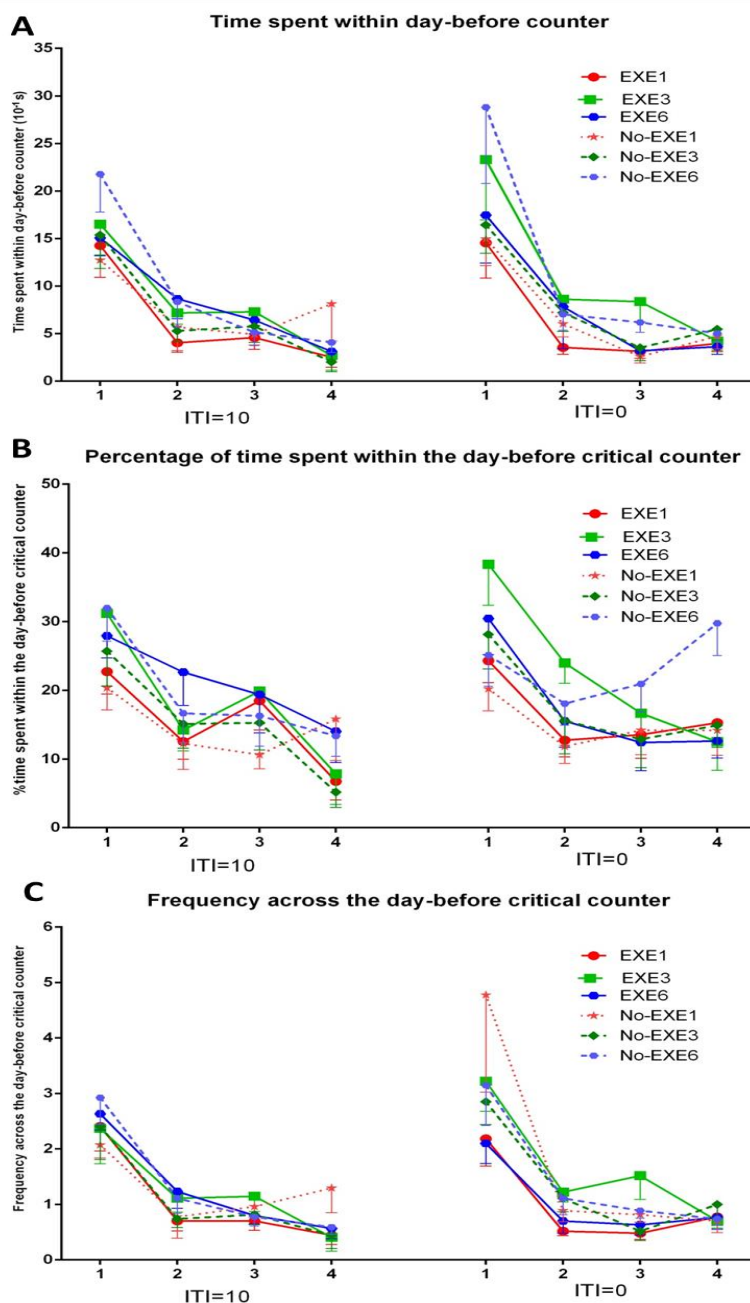


Figura 13. Média (- E.P.M.) do tempo gasto no contador crítico do dia anterior (10^{-1} s) (A), percentagem relativa de tempo de permanência no contador do dia anterior em relação a 3 outras áreas simetricamente localizadas (B) e frequência de entradas no contador crítico do dia anterior (C), ao longo das 4 tentativas do teste de memória operacional do labirinto aquático de Morris, em função do ITI, e Grupos (EXE versus NÃO-EXE) incluindo intervalo após o exercício (1, 3 ou 6 semanas).

Versão INdependente do hipocampo

Na versão da tarefa independente da função hipocampal, o mesmo protocolo experimental foi utilizado. Porém, havia uma bola de isopor de 7 cm de diâmetro, visível de qualquer ponto da piscina, posicionada 10 cm acima da plataforma, indicando assim sua localização para os animais. A localização da plataforma foi modificada a cada nova tentativa, tornando essa versão da tarefa independente de memória espacial.

Os resultados do teste com a plataforma visível são apresentados na Figura 14. Como esperado os ratos submetidos a essa versão da tarefa são capazes de escapar para a plataforma muito mais rápido do que aqueles que foram testados com a plataforma oculta, o que é expresso pelo decréscimo nos valores de latência e comprimento de trajeto, (Figura 14A e 14B). Mesmo estando a plataforma visível, diferenças significativas não foram encontradas em relação ao fator principal **GRUPO** (EXE vs Ñ-EXE) ($F_{1,28} = 0,06$ -0,25, $p > 0,8112$), **INTERVALO** após o exercício (1, 3 ou 6 semanas) ($F_{2,28} = 0,94$ -0,92, $p > 0,41$) e ausência de interação significativa entre esses parâmetros ($p > 0,44$).

A ANOVA para medidas repetidas revelou efeito significativo para os fatores principais **ITI** ($F_{1,28} = 5,63$ -6,90, $p < 0,0138$) e **TENTATIVA** ($F_{3,84} = 12,28$ -34,59, $p < 0,0001$). Congruentemente, a ANOVA revelou efeito significativo na interação entre **GRUPO** (EXE vs Ñ-EXE) x **ITI** ($F_{2,28} = 6,33$, $p < 0,0179$) e **ITI** x **TENTATIVA** ($F_{2,28} = 36,73$, $p < 0,001$) em relação a latência indicando que esse parâmetro variou diferentemente ao longo das tentativas (Figura 4A). E em relação ao comprimento do trajeto (Figura 4B) há interação significativa entre **ITI** x **TENTATIVA** ($F_{2,28} = 11,42$, $p < 0,0001$).

Em relação à velocidade média de natação (Figura 14C), a ANOVA para medidas repetidas revelou ausência de efeito significativo para os fatores principais **ITI** ($F_{1,28} = 0,00$, $p > 0,990$), **Tentativa** ($F_{3,84} = 1,63$, $p > 0,1882$), **GRUPO** (EXE vs Ñ-EXE) ($F_{1,28} = 0,72$, $p > 0,4036112$) e **INTERVALO** após o exercício (1, 3 ou 6 semanas) ($F_{2,28} = 3,23$, $p > 0,0547$). Entretanto, a ANOVA relevou interação significativa entre **GRUPO** x **TENTATIVA** ($F_{2,28} = 2,94$, $p < 0,0377$) e **ITI** x **TENTATIVA** ($F_{2,28} = 3,02$, $p < 0,034$).

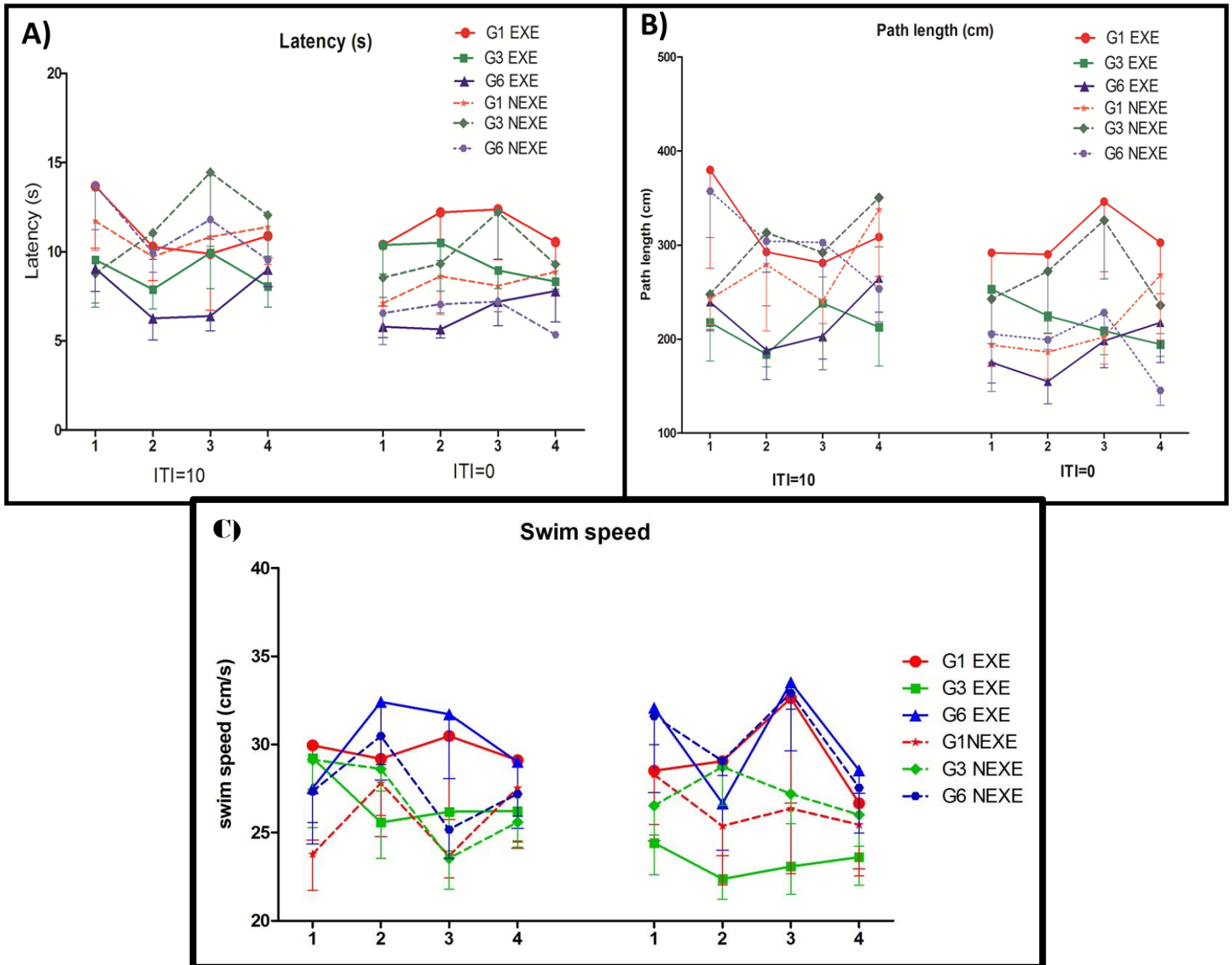


Figura 14. Médias das latências (em segundos) (A), comprimento de trajeto (cm) (B) e velocidade média de natação (expressa em cm por segundos) (-E. P.M.) ao longo das tentativas no teste de memória operacional do labirinto aquático de Morris na versão independente do hipocampo em função do ITI, e Grupos (EXE versus Ñ-EXE) incluindo intervalo (1, 3 ou 6 semanas).

5.3. Resultados histológicos

Proliferação - BrdU e Ki-67

Para a análise da proliferação de novos neurônios, foi realizada a quantificação das células imunorreativas para bromodeoxiuridina (BrdU) e Ki-67, levando-se em consideração o ciclo celular representado na Figura 15 (note que as cores refletem os marcadores). Essa quantificação focalizou a zona subgranular (ZSG) do giro denteado do hipocampo de 20 ratos adultos, divididos em dois grupos (Exercitado, $n=10$; Não-Exercitado, $n=10$)

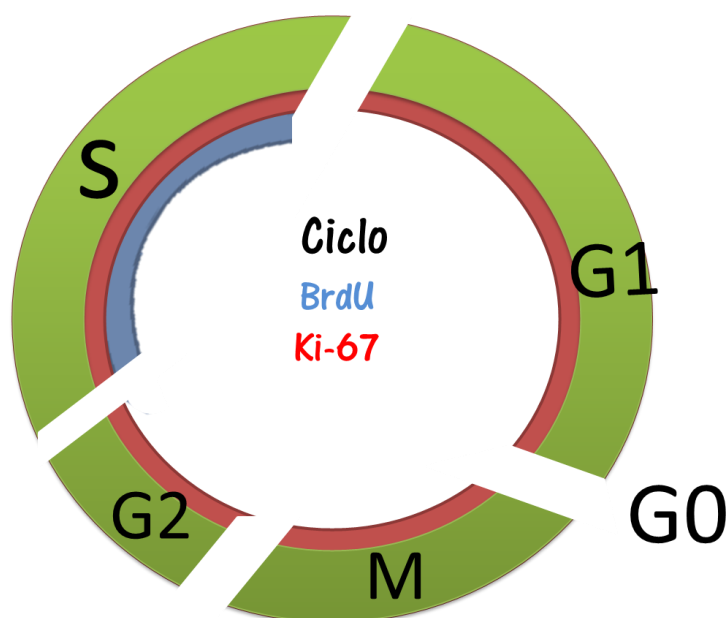


FIGURA 15. Desenho esquemático refletindo o ciclo celular e os estágios em que ocorre expressão de dois marcadores comumente usados, bromodeoxiuridina (BrdU) e Ki-67. Observe-se (em cores) que esses marcadores são observados em diferentes estágios do ciclo celular. Ki-67, um marcador endógeno da proliferação, é expresso ativamente em todas as fases do ciclo celular, especificamente, nos estágios de crescimento para replicação de cromossomos (G1), síntese de DNA (S), preparação para divisão mitótica (G2) e mitose (M). O BrdU somente é incorporado durante a fase de síntese (fase S) do ciclo celular, indicando que a célula se encontra na fase S ou já passou por ela.

A Figura 16 exemplifica os tipos de marcação observados após esses procedimentos (painéis superiores) e mostra estimativas do número de células que expressaram cada tipo de marcador em função dos tratamentos (painéis inferiores).

Em relação ao **BrdU** observou-se que o grupo EXE exibiu $3859 \pm 198,9$ (média \pm erro padrão) novas células, ao passo que o grupo NOEXE exibiu 1296 ± 162 (média \pm erro padrão). O teste T-Student revelou que a quantidade de células marcadas por BrdU foi significativamente maior no grupo EXE em relação ao grupo NOEXE ($p < 0,0001$) (Figura 16-D). Em relação ao **Ki-67** observou-se que o grupo EXE exibiu $3708 \pm 198,3$ (média \pm erro padrão) e que o grupo NOEXE exibiu $1606 \pm 233,2$ (média \pm erro padrão). O teste T-Student revelou que a quantidade de células marcadas por Ki-67 foi significativamente maior no grupo EXE em relação ao grupo NOEXE, ($p < 0,0001$) (Figura 16-C) indicando maior proliferação no grupo exercitado em relação ao controle.

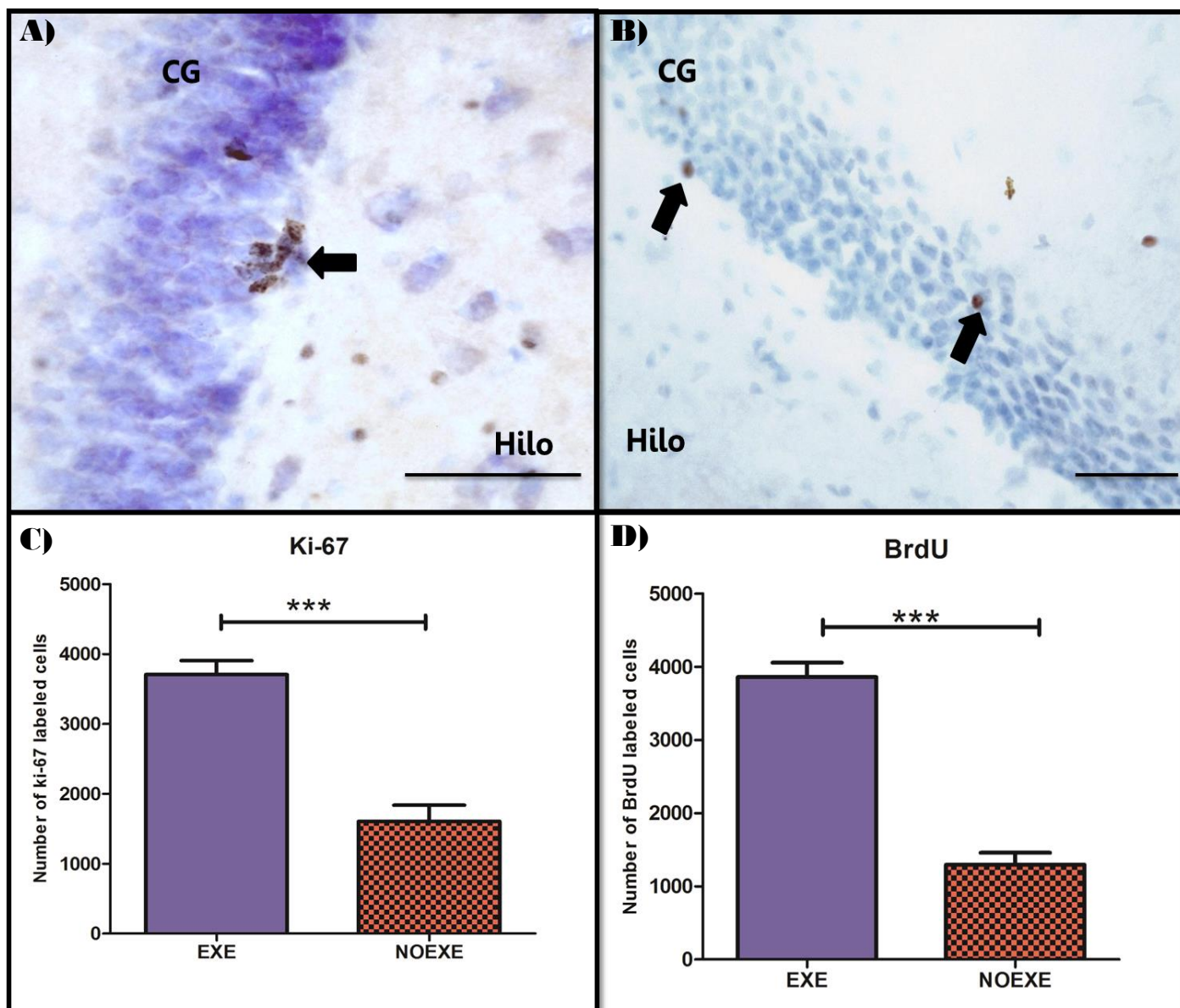


FIGURA 16 . Efeito de 7 dias de atividade física voluntária na proliferação celular. Imagens representativas obtidas por microscopia de campo claro para Ki-67 (A) e BrdU (B) no giro denteado de ratos exercitados. Células imunorreativas aparecem em marrom nas secções contra coradas com tionina. Na imagem à esquerda (A), agrupamento celular (“cluster”) imunorreativo a Ki-67 na borda entre a camada granular (CG) e Hilo, na zona subgranular. Na imagem da direita (B), células imunoreativas a BrdU na camada granular do giro denteado. Escala: 100µm. Magnificação: 40x. Número estimado de novas células em animais submetidos a uma semana de atividade voluntária, revelado por marcação positiva para Ki-67 (C) e BrdU (D). Dados expressos como a média + S.E.M., n = 5 animais por grupo. *** p < 0.001, conforme teste T-student.

Neurônios imaturos DCX

As estimativas estereológicas do número de células DCX-positivas nos grupos EXE e Ñ-EXE, considerando os intervalos de 1, 3 ou 6 semanas de interrupção do exercício físico antes da exposição ao teste comportamental na versão dependente do hipocampo, são mostradas na Tabela 4 e Figura 17 (dados expressos como a média + E.P.M., $n = 5$ animais por grupo).

A ANOVA revelou, como esperado, efeito significativo para o fator **GRUPO** (EXE VS Ñ-EXE) ($F_{1,24} = 67,67$ $p < 0,001$). A ANOVA revelou ausência de efeito significativo em relação ao fator **INTERVALO** após o exercício (1, 3 ou 6 semanas) ($F_{2,24} = 0,00$, $p > 0,9987$) e também ausência de interação significativa entre esses parâmetros ($F_{2,24} 0,37$ $p > 0,6941$).

Tabela 4. Quantificação de neurônios imaturos positivos para doublecortina (DCX) no giro denteado do hipocampo.

Grupo	EXE	Ñ-EXE
G1	87,78 ± 12,11	37,51 ± 6,079
G3	86,73 ± 3,539	37,88 ± 5,058
G6	82,18 ± 4,799	42,80 ± 6,228

Valores expressos em Média ± Erro padrão. Médias da contagem de células DCX-positivas nos Grupos (EXE versus NÃO-EXE) incluindo intervalo (1, 3 ou 6 semanas, correspondendo a G1, G3 e G6 respectivamente). Dados expressos como a média + E.P.M., $n = 5$ animais por grupo.

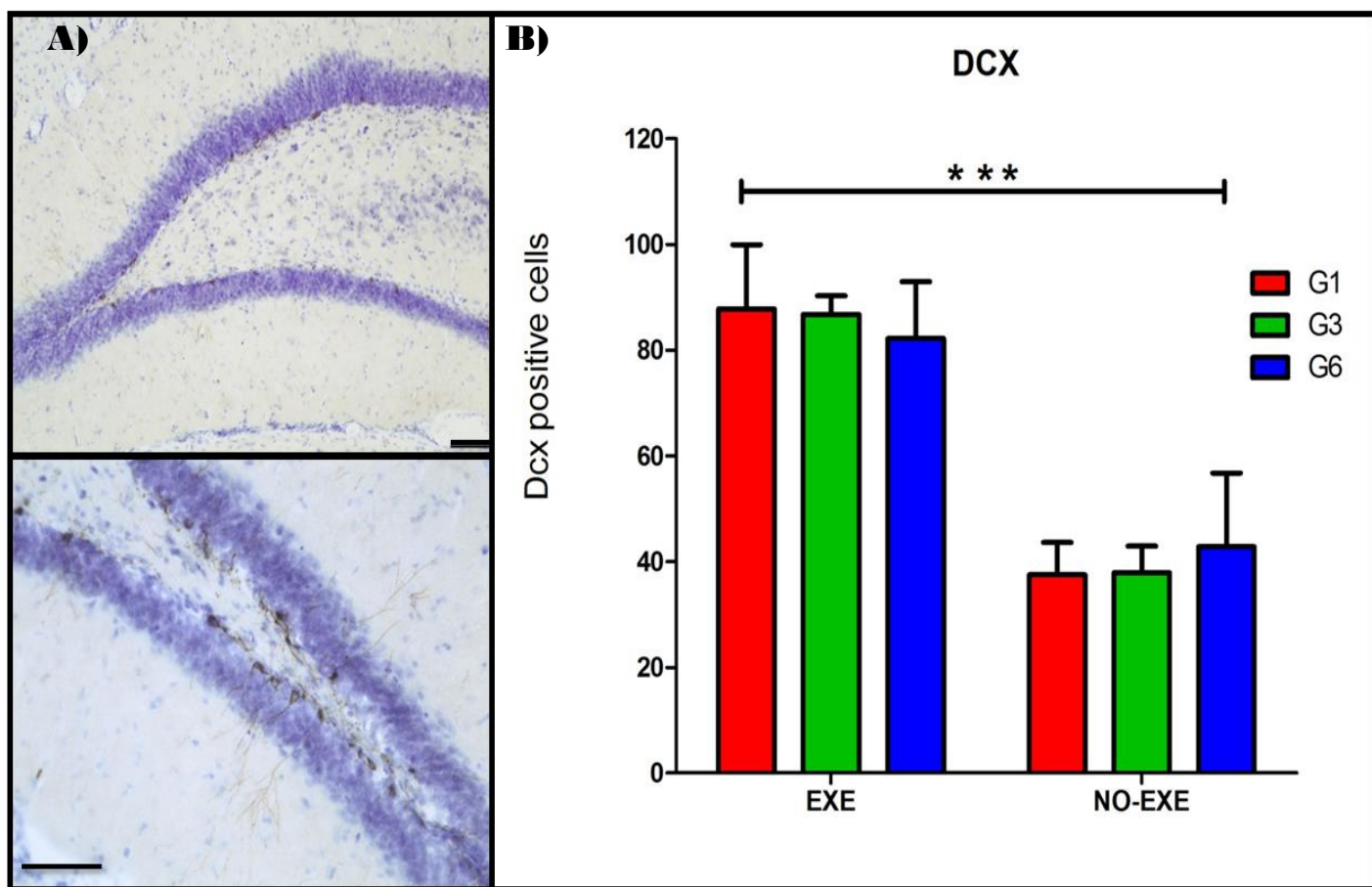


FIGURA 17. Células imunorreativas para Doublecortina (DCX) expressas em neurônios imaturos no hipocampo de animais exercitados. O soma das células imunopositivas estão localizados na zona subgranular e na borda entre a camada granular e o hilus com extensões passando através da camada granular e indo em direção à camada molecular (A). Escala: 100 μ m. Figura (B) mostrando as estimativas de células DCX-positivas nos Grupos (EXE versus NÃO-EXE) incluindo intervalo (1, 3 ou 6 semanas, correspondendo a G1, G3 e G6 respectivamente). Dados expressos como a média + E.P.M., n= 5 animais por grupo. *** p <0,001.

Diferenciação Neuronal BrdU/NeuN

Estimativas do número de células neurais com dupla marcação por imunofluorescência para BrdU e NeuN, no giro denteado do hipocampo, indicativa de diferenciação neuronal, mostradas na Tabela 5 e na Figura 18.

Para o animais expostos a versão dependente do hipocampo do labirinto aquático de Morris, a ANOVA revelou, como esperado, efeito significativo para o fator **GRUPO** (EXE VS Ñ-EXE) ($F_{1,24} = 48,14$ $p < 0,001$), indicando que o exercício físico espontâneo resulta num aumento na produção de novos neurônios. A ANOVA revelou ainda ausência de efeito significativo em relação ao fator principal **INTERVALO** após o exercício (1, 3 ou 6 semanas) ($F_{2,24} = 3,00$, $p > 0,0686$) e ausência de interação significativa entre GRUPO e INTERVALO ($F_{2,24} = 1,79$ $p > 0,1886$). Porém, o teste *post-hoc* de Bonferroni indicou diferença significativa entre os grupos exercitados EXE1 e EXE6 ($p < 0,05$) em relação ao número de novos neurônios, mostrando que à medida que se aumenta o fator intervalo há uma diminuição significativa no número de novos neurônios que sobrevivem.

Para o animais expostos a versão INdependente do hipocampo do labirinto aquático de Morris, a ANOVA também revelou, como esperado, efeito significativo para o fator **GRUPO** (EXE VS Ñ-EXE) ($F_{1,24} = 46,92$ $P < 0,001$), indicando que o exercício físico espontâneo resulta num aumento na produção de novos neurônios. A ANOVA revelou ainda ausência de efeito significativo em relação ao fator principal **INTERVALO** após o exercício (1, 3 ou 6 semanas) ($F_{2,24} = 0,48$, $p > 0,6242$) e ausência de interação significativa entre GRUPO e INTERVALO ($F_{2,24} = 0,83$ $p > 0,4470$). Note que os grupos exercitados nessa versão da tarefa possuem número de novos neurônios semelhantes aos animais não exercitados da versão dependente do hipocampo.

O número estimado de novos neurônios nos animais treinados na versão independente do hipocampo na tarefa do labirinto aquático de Morris teve um decréscimo significativo em comparação aos animais treinados na versão dependente da tarefa ($p < 0,0001$) como pode ser visto na figura 16.

Tabela 5. Quantificação das células que se diferenciaram em neurônios (neurogênese) no giro denteado do hipocampo.

Versão dependente do hipocampo		
Grupo	EXE	Ñ-EXE
G1	2434± 520,6*	489,6± 39,14
G3	1702±264,1	460,8± 70,75
G6	1382±155,3*	333,6± 29,73
Versão independente do hipocampo		
Grupo	EXE	Ñ-EXE
G1	468± 57,67	156± 12,59
G3	396±73,09	184,8± 24,18
G6	376,8±39,91	160,8± 25,04

Valores expressos em Média ± Erro padrão. Médias da contagem de células duplamente marcadas por imunofluorescência (BrdU e NeuN) no giro denteado do hipocampo (controle, n=5; exercitados, n=5) dos grupos G1, G3 e G6

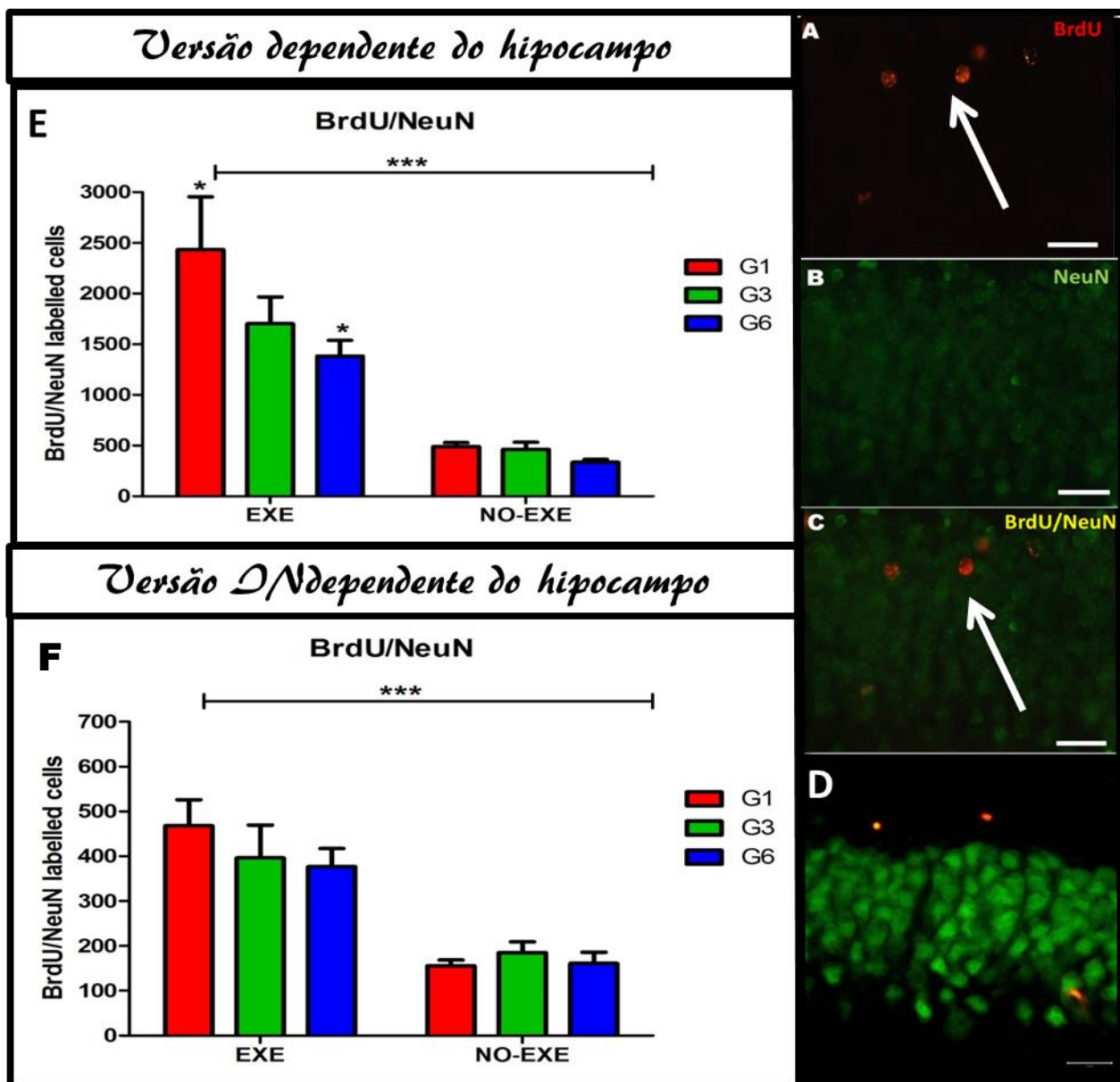


Figura 18 Fotomicrografias representativas evidenciando a imunofluorescência para BrdU(A), NeuN(B) e a co-localização NeuN + BrdU (C e D). Os Figura (E) e F mostra o número estimado de células duplamente marcadas por imunofluorescência para BrdU e NeuN, nos Grupos (EXE versus Ñ-EXE) incluindo intervalo (1, 3 ou 6 semanas, correspondendo a G1, G3 e G6, respectivamente) em função da tarefa do labirinto aquático Morris. Dados expressos como a média + S.E.M., n= 5 animais por grupo. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

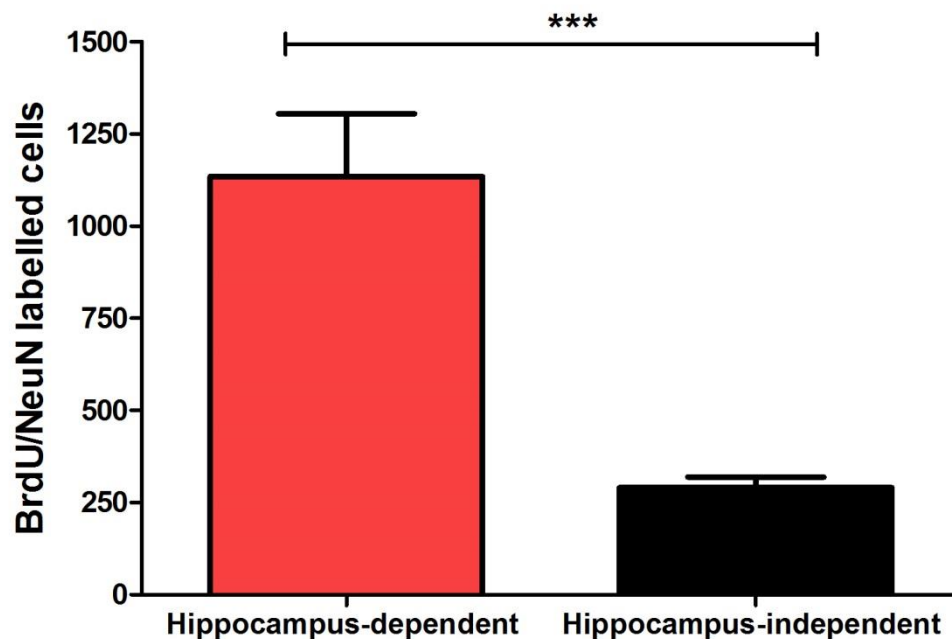


Figura 19. Efeito do treinamento da tarefa do labirinto aquático de Morris nas versões dependente e independente do hipocampo no número de novos neurônios. O número estimado de células duplamente marcadas por imunofluorescência para BrdU e NeuN diminuiu significativamente nos animais que foram submetidos a versão visível do labirinto de água de Morris em comparação com animais que passaram pela versão dependente função da tarefa do labirinto aquático Morris. Dados expressos como a média + S.E.M., $n=30$ animais por grupo. * $p<0,05$, *** $p <0.001$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito de sete dias de atividade física voluntária no desempenho da tarefa dependente do hipocampo, a versão que envolve memória operacional no labirinto aquático de Morris, e sua relação com a neurogênese. Investigou-se ainda se esses efeitos são mantidos depois de 1, 3 ou 6 semanas após a interrupção do exercício físico.

Este estudo demonstra que atividade física voluntária induz um aumento na proliferação celular e na diferenciação neuronal (neurogênese) no giro denteado. A introdução de um período de intervalo entre o final do exercício e a execução da tarefa comportamental causa uma redução significativa na sobrevivência dos novos neurônios, como observado com 1 semana de intervalo em comparação com os animais testados com 6 semanas de intervalo. Ademais, os animais que foram expostos a uma tarefa do labirinto aquático de Morris na versão INdependente do hipocampo (plataforma visível) apresentaram um robusto decréscimo de novos neurônios quando comparados aos animais expostos a versão dependente da tarefa ($p < 0,0001$).

Estudos anteriores em camundongos mostraram que exercício físico espontâneo em rodas de atividade aumenta a neurogênese (VAN PRAAG e col., 1999), melhora o desempenho em tarefas de memória e aprendizado (VAN PRAAG e col., 2005), e possui efeitos benéficos em desordens e distúrbios do Sistema Nervoso Central (RADAK e col., 2004).

Dados do presente estudo confirmam que sete dias de atividade física espontânea aumentam a neurogênese no giro denteado. Em contraste, entretanto, o presente resultado não confirma que esse aumento da neurogênese é acompanhado por melhora na memória espacial, como avaliado por meio da versão que envolve memória operacional no labirinto aquático de Morris.

Diferentes animais mostram melhor desempenho cognitivo como resultado do aumento da atividade física pelo exercício voluntário (VAN PRAAG e col., 1999; 2005; BARRIENTOS e col., 2011) ou exercício em esteira (ALBECK e col., 2006; AQUAR e col., 2011; BERCHTOLD e col., 2010; ANG e col., 2006). Muitos estudos têm observado também uma relação entre o exercício físico e o aumento da

capacidade de aquisição da versão tradicional do Labirinto Aquático de Morris (VAN PRAAG e col., 1999; 2005; RHODES e col., 2008; VAYNMAN e col., 2004). A maior parte desses estudos utilizou a versão que envolve memória de referência do labirinto aquático de Morris, adotando o paradigma de duas tentativas por dia para demonstrar aumento de memória espacial em diversas linhagens de camundongos (VAN PRAAG e col., 1999; MARLATT e col., 2012) e ratos (LEASURE e col., 2008; VAYNMAN e col., 2004; YAU e col., 2012). No entanto, poucos trabalhos (BEN, 2010) examinaram o efeito do exercício voluntário em uma versão que envolve memória operacional no labirinto aquático de Morris. É importante notar que o teste de memória de referência avalia a capacidade de se lembrar de um evento que permanece constante, a posição da plataforma é inalterada durante todo período de execução da tarefa. Para execução da tarefa operacional é necessário à aquisição diária de novas informações, o que leva a crer que essa versão seja mais sensível para detectar a função hipocampal do que a versão que envolve memória de referência (XAVIER e col., 1999) que é mais comumente usada.

Destaca-se, além disso, que em todos os estudos prévios em que foi demonstrado melhora no desempenho de memória espacial induzido pela atividade física, os animais foram submetidos ao teste comportamental imediatamente após o fim do exercício, independente do protocolo de exercício adotado. São quase inexistentes as abordagens experimentais que investigam especificamente como a introdução de um intervalo de tempo entre o fim da atividade física e o início da tarefa comportamental afetam a função cognitiva e sua relação com a neurogênese hipocampal (WIDENFALK e col., 1999; GREENWOOD e col., 2012).

Por exemplo, Berchtold e colaboradores (2010) investigaram, em camundongos, o efeito de 3 semanas de atividade física espontânea seguidos por um período de 1 ou 3 semanas sem exercício, no desempenho da tarefa do “labirinto radial aquático” (*radial arm water maze-RWM*); e analisaram os níveis protéicos de BDNF. Os sujeitos que foram expostos a atividade física tiveram melhor desempenho e níveis mais elevados da proteína BDNF que os sujeitos não exercitados. Eles relataram que os níveis dessa proteína no hipocampo permaneceram significativamente elevados quando medidos uma semana após a interrupção da atividade física. No entanto, após 3 semanas de interrupção do exercício os níveis de BDNF eram inferiores aos animais do grupo controle.

Nossos dados mostram que o grupo EXEG_I, que iniciou o teste comportamental na versão dependente do hipocampo após uma semana de interrupção da atividade física, e que provavelmente possuiria os maiores níveis de BDNF, teve diferenças significativas no número de novos neurônios em relação ao grupo EXEG₆ ($p < 0,05$), esse mesmo decréscimo foi visto nos animais que foram submetidos à tarefa na versão não dependente do hipocampo, porém não significativo ($p > 0,05$) mostrando que, à medida que se aumenta o fator intervalo, há uma diminuição significativa no número de novos neurônios que sobrevivem, o que pode estar relacionados à diminuição dos níveis de BDNF (COTMAN & BERCHTOLD, 2002; VAYNMAN e col., 2004; ZHENG e col., 2006).

Estudo conduzido por Llorens-Martin e col. (2010) mostrou que o número de novas células induzido por dois meses de enriquecimento ambiental retorna a níveis basais após uma semana da remoção do enriquecimento. Estudos prévios indicam que os benefícios do enriquecimento ambiental e da atividade física no hipocampo podem ser reversíveis (WIDENFALK e col., 1999; BERCHTOLD e col., 2010; KITAMURA e col., 2003; KANAREK e col., 2009).

Greenwood e colaboradores (2012) mostraram que a interrupção do exercício voluntário em ratos, por 6 semanas aumenta os comportamentos relacionados a ansiedade, o que torna plausível pensar na possibilidade de que a interrupção de exercício e o decréscimo de neurogênese hipocampal possam estar relacionados também a respostas de estresse, um modulador negativo da neurogênese (TANAPAT e col., 2001; GOULD e col., 1997; PHAM e col., 2003). O exercício físico e o estresse influenciam fortemente a neurogênese hipocampal de maneiras opostas, é possível que interrupção da atividade física tenha levado a um aumento da vulnerabilidade ao estresse e reduzido o potencial de melhora de desempenho na tarefa comportamental induzido pelo exercício, bem como a redução da sobrevivência de novos neurônios promovida pela de aprendizagem. Ademais, pode-se considerar também que um protocolo com maior tempo de exposição à atividade física seja requerido para que os efeitos benéficos do exercício tenham efeito com a inserção de um período de intervalo em uma tarefa cognitiva.

É importante ressaltar, que além da adoção de diferentes protocolos comportamentais, diferenças entre espécies podem existir e refletir nas propriedades dos novos neurônios em camundongos e ratos (DOBROSSY e col., 2003; SNYDER

e col., 2009). Em um estudo feito em camundongos, Stone e colaboradores (2011), mostraram que a taxa máxima de integração de novos neurônios modulada pela tarefa do labirinto aquático de Morris foi atingida apenas quando os novos neurônios possuíam de cinco ou mais semanas de idade. Snyder e col. (2009) relataram que neurônios jovens expressam proteínas e genes de expressão imediata para neurônio maturo 1 ou 2 semanas mais cedo em ratos do que em camundongos e neurônios possuem duas vezes mais chances de escapar das vias de apoptose e são dez vezes mais propensos a serem recrutados em circuitos de aprendizagem.

É interessante destacar que evidências diretas de que os efeitos comportamentais do exercício ou enriquecimento ambiental são mediados pela neurogênese são ainda escassas. A maioria dos estudos busca estabelecer uma correlação entre a melhora de desempenho em tarefas de aprendizagem e exercício ou ambiente enriquecido, condições que são conhecidas por aumentar a neurogênese, sem, no entanto, buscar qual é a relevância da neurogênese. A melhora da aprendizagem pode estar relacionada ao aumento da neurogênese, mas também pode ser decorrente de outros fatores relacionados ou não a produção neuronal. Por exemplo, foi relatado que animais expostos ao ambiente enriquecido apresentaram melhora de desempenho em uma tarefa de reconhecimento de objetos, entretanto, após tratamento com agentes antimitóticos que bloqueiam a neurogênese essa melhora é inexistente (BRUEL-JUNGERMAN e col., 2005). Em contraste, outros trabalhos forneceram evidências convincentes de melhora em tarefas dependentes do hipocampo induzidas pelo ambiente enriquecido na ausência de neurogênese (MADROÑAL e col., 2010; MESHI e col., 2006).

Dados do presente estudo confirmam que o aprendizado de uma tarefa dependente do hipocampo, a versão que envolve memória operacional do labirinto aquático de Morris, promove um aumento da sobrevivência de novos neurônios gerados pela atividade física. Em contraste, a aprendizagem da versão independente do hipocampo da tarefa não leva a benefícios na sobrevivência de novos neurônios.

A relação entre o aumento da sobrevivência de novos neurônios e o aprendizado de tarefas dependentes do hipocampo foi demonstrada por Gould e colaboradores em 1999. Sabe-se que a taxa de proliferação hipocampo adulto é muito maior em relação ao número de neurônios imaturos que sobrevivem até a maturidade, a maior parte dessas células morre após 1-2 semanas (CAMERON e col.,

1993). Entretanto, Gould e colaboradores mostraram que o aprendizado dependente do hipocampo foi capaz de resgatar esses neurônios imaturos promovendo maior sobrevivência e incorporação no giro denteado. Este resultado foi corroborado por uma série de estudos que também investigaram os efeitos de aprendizagem espacial sobre a sobrevivência de células imaturas (AMBROGINI e col., 2000; HAIRSTON e col., 2005; EPP e col., 2007, 2010, 2011).

No entanto, alguns estudos têm produzido resultados contraditórios, ou mostrando que a aprendizagem espacial diminuiu a sobrevivência de neurônios imaturos (DOBROSSY e col., 2003; AMBROGINI e col., 2004; MOHAPEL e col., 2006; EPP e col., 2011), ou que a aprendizagem espacial não teria qualquer efeito sobre a sobrevivência de novos neurônios (EHNINGER & KEMPERMANN, 2006; MOHAPEL e col., 2006; VAN DER BORGHT e col., 2006). A falta de resultados consistentes a partir dos estudos descritos acima sugere fortemente que, embora a aprendizagem espacial possa influenciar positivamente a sobrevivência de novos neurônios, esse efeito é dependente da condição existente.

A relação entre a aprendizagem dependente do hipocampo e aumento de sobrevivência de novos neurônios é uma relação complexa e com vários fatores importantes e janelas de tempo críticas que devem ser considerados. Talvez o fator mais importante a se considerar quando se examina os efeitos da aprendizagem espacial na neurogênese é o efeito da idade dos neurônios imaturos no momento da aprendizagem.

Quando os novos neurônios que tem de 1 a 5 dias de idade no momento da aprendizagem não há efeitos da aprendizagem espacial na sobrevivência desses neurônios (EPP e col., 2013). Quando esses neurônios imaturos têm de 15 a 20 dias de idade no momento da aprendizagem há uma diminuição da sobrevivência (EPP e col., 2013). Entretanto, quando os neurônios imaturos têm de 6 a 10 dias de idade no início da tarefa de aprendizagem há um aumento na sobrevivência desses neurônios [embora isso possa depender da dificuldade da tarefa (EPP & GALEA, 2009) e da qualidade da aprendizagem (EPP e col., 2007; SISTI e col., 2007)]. Esse período de tempo corresponde, em ratos, ao período de prolongamento dos axônios e formação de conexões com CA3. Assim, é provável que o aumento da sobrevivência induzido pelo aprendizado seja dependente que o mesmo ocorra durante o processo de conexão do neurônio imaturo a circuitaria existente (EPP e col., 2013).

Embora a abordagem experimental seja diferente, nossos dados corroboram os dados do grupo de Epp e colaboradores, em nosso estudo, as injeções de BrdU foram administradas nos 3 últimos dias de atividade física para marcar as células em divisão naquele momento, considerando o período de intervalo, os neurônios imaturos do grupo EXEG₁ tinham de 7 a 10 dias de idade no momento da aprendizagem do labirinto aquático o que refletiu em um aumento significativo na sobrevivência de novos neurônios em relação aos grupos que tinham mais de 20 dias de idade no momento do aprendizado.

Em conclusão, nosso estudo mostra que houve um aumento na proliferação e diferenciação neuronal (neurogênese) induzido pela atividade física voluntária. Esse aumento de neurogênese não refletiu em uma melhora na memória espacial. Além disso, esse estudo demonstra de maneira pioneira que a interrupção da atividade física anterior à execução da tarefa comportamental leva a uma redução significativa na sobrevivência dos neurônios gerados pela atividade física. Demostramos também que o aprendizado da tarefa do labirinto aquático de Morris, na versão de memória operacional que é dependente do hipocampo, leva a um aumento da sobrevivência dos novos neurônios que foram produzidos no período de exercício, ao passo que o aprendizado da versão independente da tarefa leva a uma redução do número absoluto de novos neurônios. Nossos dados, em conjunto com os dados da literatura reforçam o conceito que o aprendizado dependente do hipocampo modula positivamente a neurogênese hipocampal adulta.

O destreinamento físico baseia-se no conceito da reversibilidade, o qual mostra que quando o exercício físico é suspenso ou reduzido, os sistemas corporais se reajustam de acordo com a diminuição do estímulo (COYLE, 1994). Nossos dados fornecem uma nova perspectiva ao conceito das adaptações fisiológicas em decorrência do destreinamento ao mostrar que a interrupção da atividade física leva a alterações da neurogênese hipocampal. A adaptação do hipocampo à inatividade física pode não ser apenas uma simples inversão de uma adaptação decorrente do exercício físico.

7 . CONCLUSÕES

- I. O protocolo de 7 dias de atividade física voluntária leva a um aumento na proliferação e na diferenciação neuronal (neurogênese).
- II. O aumento da neurogênese hipocampal não refletiu em uma melhora na memória espacial.
- III. A interrupção da atividade física anterior à execução da tarefa comportamental leva a uma redução significativa na sobrevivência dos neurônios gerados pela atividade física.
- IV. O aprendizado da tarefa do labirinto aquático de Morris, na versão de memória operacional que é dependente do hipocampo, leva a um aumento da sobrevivência dos novos neurônios que foram produzidos no período de exercício, ao passo que o aprendizado da versão independente da tarefa leva a uma redução do número absoluto de novos neurônios.

Resumo

MOTTA-TEIXEIRA, L.C. Universidade de São Paulo, novembro de 2013. **Exercício Físico, aprendizado e Memória.** Orientador: Gilberto Fernando Xavier

A neurogênese hipocampal é modulada por muitos fatores que incluem envelhecimento, estresse, enriquecimento ambiental, atividade física e aprendizado. Atividade física voluntária (espontânea) estimula a proliferação celular no giro denteado e facilita a aquisição e/ou retenção de tarefas dependentes do hipocampo, incluindo o Labirinto Aquático de Morris. Embora seja bem estabelecido que o exercício físico regular melhora o desempenho em tarefas de memória e aprendizado, não está claro qual a duração desses benefícios após o final da atividade física. Neste estudo investigamos a relação temporal entre os efeitos benéficos da atividade física associado ao aprendizado de tarefa dependente da função hipocampal, e sua relação com a neurogênese, levando em consideração também o tempo decorrido desde o término da atividade física. Grupos independentes de ratos tiveram acesso a roda de atividade ao longo de 7 dias (Grupo EXE) ou roda bloqueada (Grupo Ñ-EXE) e receberam injeções de BrdU nos últimos 3 dias de exposição roda. Após um INTERVALO de 1, 3 ou 6 semanas após o final da exposição a roda de atividade após o final da exposição a roda de atividade, os animais foram testados no labirinto aquático de Morris, sendo uma parte deles expostos a tarefa de memória operacional espacial, dependente da função hipocampal (H), e outra parte a uma tarefa de busca por uma plataforma visível, independente da função hipocampal (ÑH). Em ambos os casos, o intervalo entre as tentativas (ITI) foi de 10 minutos durante as sessões 1-6 e (virtualmente) zero minutos durante as sessões 7-10. Concluída a tarefa os cérebros foram processados para imuno-histoquímica. Foram feitas imunoistoquímicas para a detecção de Ki-67 (proliferação celular), BrdU, NeuN (para identificar neurônios maduros), e DCX (para identificar imaturo neurônios). Nossos dados suportam a ideia que atividade física voluntária induz um aumento na proliferação celular e na diferenciação neuronal (neurogênese) no giro denteado. A introdução de um período de intervalo entre o final do exercício e a execução da tarefa comportamental causa uma redução significativa na sobrevivência dos novos neurônios, como observado com 1 semana de intervalo em comparação com os animais testados com 6 semanas de intervalo. Em contraste, entretanto, o presente resultado não confirma que esse aumento da neurogênese é acompanhado por melhora na memória espacial, como avaliado por meio da versão que envolve memória operacional no labirinto aquático de Morris. O aprendizado da tarefa do labirinto aquático de Morris, na versão de memória operacional que é dependente do hipocampo, leva a um aumento da sobrevivência dos novos neurônios que foram produzidos no período de exercício, ao passo que o aprendizado da versão independente da tarefa leva a uma redução do número absoluto de novos neurônios.

Palavras-chave: neurogênese, atividade física, aprendizado espacial, memória espacial

Abstract

MOTTA-TEIXEIRA, L.C. University of São Paulo, in november 2013. **Exercise, neurogenesis and memory.** Advisor: Gilberto Fernando Xavier

Hippocampal adult neurogenesis is modulated by many factors including age, stress, environmental enrichment, physical exercise and learning. Spontaneous exercise in a running wheel stimulates cell proliferation in the adult dentate gyrus and facilitates acquisition and/or retention of hippocampal-dependent tasks including the Morris water maze. While it is well established that regular physical exercise improves cognitive performance, it is unclear for how long these benefits last after its interruption. In this study, we investigate the temporal relation between exercise-induced benefits associated with learning of a hippocampal-dependent task, this relationship with neurogenesis, considering the time after exercise has ended. Independent groups of rats were given free access to either unlocked (EXE Group) or locked (No-EXE Group) running wheels for 7 days, having received daily injections of BrdU for the last 3 days. The animals were then transferred to standard home cages. After a time period of either 1, 3 or 6 weeks, the animals were tested in the Morris water maze, one of them being exposed to the spatial working memory task dependent on hippocampal function (H) and partly to a task search for a visible platform, independent of hippocampal function (NH). In both cases, the interval between trials (ITI) was 10 minutes during sessions and 1-6 and (virtually) zero minute during the sessions 7-10. After the task brains were processed for immunohistochemistry. Cell proliferation and net neurogenesis were assessed in hippocampal sections using antibodies against BrdU, NeuN (to identify mature neurons), and DCX (to identify immature neurons). Data of the present study confirm that exposure of rats to 7 days of spontaneous wheel running increases cell proliferation and neurogenesis. In contrast, however, the present results did not confirm that this neurogenesis is accompanied by a significant improvement in spatial learning, as evaluated using the working memory version of the Morris' water maze task. The introduction of a delay period between the end of exercise and cognitive training on the Morris water maze reduces cell survival; the number of new neurons was higher in the EXE1 week delay group as compared to the EXE6 week delay. We showed that learning the Morris water maze in the working memory task dependent on hippocampal function (H) increases the new neurons survival, in contrast, learning hippocampal-independent version of the task decreases number of new neurons.

keywords: neurogenesis, physical activity, spatial learning, spatial memory

8. Referências Bibliográficas

- Aimone JB, Wiles J, Gage FH. (2009). Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. **Neuron** 61:187–202
- Aimone JB, Gage FH. (2011) Modeling new neuron function: a history of using computational neuroscience to study adult neurogenesis. **Eur J Neurosci.** 33:1160–1169.
- Akbari, E.M., Chatterjee, D., Levy, F., and Fleming, A.S. (2007). Experience-dependent cell survival in the maternal rat brain. **Behav. Neurosci.** 121, 1001–1011.
- Albeck DS, Sano K, Prewitt GE, Dalton L. (2006) Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. **Behav Brain Res.** 168:345–348.
- Alberg et al. (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. **J. Neurosci.**, 20, 2896–2903
- Alberini CM. (2011) The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. **Front. in Behav. Neurosci.** 2011, Vol. 5, No. 12.
- Allen E. (1912) The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. **J. Comp. Neurol.** 12 547-568
- Altman G. 1962 Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science.** 135 1127-1128
- Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J. Comp. Neurol.** 124:319–35
- Altman J. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **J. Comp. Neurol.** 1966:431–74
- Altman J. 1967. In *The Neurosciences, Second Study Program*, ed. GC Quarton, T Melnechuk, FO Schmitt, pp. 723–43. New York: Rockefeller Univ. Press
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain,

with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **J. Comp. Neurol.** 137:433–57

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. **J Neurosci.** 1;22(3):629-34.

Alvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron** 41:683–86

Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, Santi S, Cuppini R. (2004) Morphofunctional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. **Brain Res** 1017:21–31

Andersen, P.; Morris, R.; Amaral, D.; Bliss, T.; O'keefe, J. **The hippocampus book**. New York, Oxford University Press, 2007.

Andersen ML, Tufik S. **Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research**. São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, 2010

Aquiar AS, Jr, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos AR, Tasca CI, Latini A, Prediger RD. (2011) Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: Involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mech Ageing Dev.** 132(11-12):560-7

Barnea A. 2009-Interactions between environmental changes and brain plasticity in birds. **General Compar Endocri..** 2009, 163: 128–134.

Barrientos RM, Frank MG, Crysdale NY, Chapman TR, Ahrendsen JT, Day HE, Campeau S, Watkins LR, Patterson SL, Maier SF. (2011) Little exercise, big effects: reversing aging and infection-induced memory deficits, and underlying processes. **J Neurosci.** 31:11578–11586.

Ben et al., 2010. Running exercise effects on spatial and avoidance tasks in ovariectomized rats. **Neurobiol Learn Mem.**;94(3):312-7.

Bédard A, Gravel C, Parent A. (2006). Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates. **Exp Brain Res** 170:501–12.

Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA. (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. **J Neurosci** 21:6718–6731.

- Berchtold, N. C., Castello, N., & Cotman, C. W. (2010). Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neurosci** 167(3), 588-97.
- Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Götz, M., and Canossa, M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 105, 15570–15575.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A.(2006) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. **Proc Natl Acad Sci** 99:11464–9.
- Best, P.J.; White, A.M.; Minai, A.(2001) Spatial processing in the brain: The Activity of Hippocampal Place Cells. **An Rev Neurosci**,24:459-486
- Bick-Sander, A., Steiner, B., Wolf, S. A., Babu, H., and Kempermann, G. (2006). Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103, 3852–3857.
- Bhattacharyya BJ, Banisadr G, Jung H, Ren D, Cronshaw DG, Zou Y, Miller RJ. (2008).The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates GABAergic inputs to neural progenitors in the postnatal dentate gyrus. **J Neurosci.** 28:6720–6730.
- Bliss TV, Lomo T. 1973 .Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol.** 232(2):331–356.
- Blundon JA, Zakharenko SS.(2008) Dissecting the components of long-term potentiation. **Neuroscientist.** 14(6):598-608
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W,Kempermann G.(2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. **Mol Cell Neurosci.** 24:603–613.
- Brannvall K, Bogdanovic N, Korhonen L, Lindholm D. (2005). Nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain. **Eur J Neurosci** ;21:871–878.
- Broadbent, N.J.; Squire, L.R.; Clark, R.E. (2004).Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 101: 14515-20, 2004.
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG.(2003). Enriched environment and physical activity stimulate

hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. **Eur J Neurosci**, 17: 2042–2046.

Brown JP, Couillard-Despre S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. 2003. Transient expression of double-cortin during adult neurogenesis. **J Comp Neurol** 467: 1–10.

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: 513–521

Cahil L, McGaugh JL. 1998. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends Neurosci** 11: 294–299

Cameron, H.A.; Woolley, C.S.; McEwen, B.S.; Gould, E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neurosci**, 56:337–344.

Cameron HA, Gould, E. (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. **Neurosci** 61:203–209.

Cameron HA, McKay RD. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. **J Comp Neurol**. 435(4):406–17.

Chmielnicki E, Benraiss A, Economides AN, Goldman SA. (2004) Adenovirally expressed noggin and brain derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. **J Neurosci** ;24:2133–2142

Chow C, Epp JR, Lieblich SE, Barha CK, Galea LA. 2012. Sex differences in neurogenesis and activation of new neurons in response to spatial learning and memory. **Psychoneuroend**.38(8):1236–50

Christie, B. R. , Cameron, H. A. (2006). Neurogenesis in the adult hippocampus. **Hippocampus**: 16, 199–207.

Clelland CD, M. Choi, C. Romberg, G. D. Clemenson Jr., A. Fragniere, P. Tyers, S. Jessberger, L. M. Saksida, R. A. Barker, F. H. Gage, T. J. Bussey. (2009) A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. **Scien** 325:210–13

Cotman, C.W. & Berchtold, N.C. 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neurosci** 25: 295–301.

Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. 2007. Exercise builds brain health: Key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends Neurosci** 30: 464–472

Creer DJ, Romberg C, Saksida LM, van Praag H, Bussey TJ. (2010). Running enhances spatial pattern separation in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.107, n. 5, p. 2367-72.

Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. **J Comp Neurol** 460:563-72.

Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories : how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory ? **Nat** 11(5), 339-350

Doetsch, F. 2003. The glial identity of neural stem cells. **Nat. Neurosci.** 6, 1127-1134.

Döbrössy MD, Drapeau E, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN.(2003). Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. **Mol. Psychiatry** 8:974-82

Drapeau E, Montaron MF, Aguerre S, Abrous DN. Learning-induced survival of new neurons depends on the cognitive status of aged rats. **J Neurosci.** 2007; 27:6037-6044

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. (2008). Development of neural stem cell in the adult brain. **Curr Opin Neurobiol**; 18:108 -15.

Dubai Y.(2004)The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. **Annu. Rev. Psychol.** 55:51-86.

Duman, R.S., (2004). Depression: a case of neuronal life and death? **Biol. Psychiatry** 56, 140-145.30

Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Olier SH, Piazza PV, Abrous DN. (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. **PLoS Biol.** 5, e214

Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. **PLoSOne** 3:e1959

Dustman, R.E., Emmerson, R.Y., Ruhling, R.O., Shearer, D.E., Steinhaus, L.A., Johnson, S.C., Bonekat, H.W., Shigeoka, J.W., 1990. Age and fitness effects on EEG, ERPs, visual sensitivity, and cognition. **Neurobiol. Aging** 11, 193– 200.

Ehninger & Kempermann, 2003. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. **Cerebral Cortex** 13, 845–51

Einchenbaum, (2002). **The Cognitive Neuroscience of Memory: an Introduction.**Oxford University Press

Eichenbaun, H.; Stewart, C.; Morris, R.G.M. (1990) Hippocampal representation in place Learning. **J Neurosci**, 10(11). P3531-3542. 1990

Encinas JM, Vaahtokari A, Enikolopov G.(2005) Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103:8233–8238

Encinas JM, Enikolopov G. (2008) Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. **Methods Cell Biol** 85:243–272.

Encinas JM, Sierra A. (2012) Neural stem cell deforestation as the main force driving the age-related decline in adult hippocampal neurogenesis. **Behav Brain Res** 433-439

Epp JR, Spritzer MD, Galea LA, (2007). Hippocampus- dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. **Neurosci** 149, 273–285

Epp, J.R., & Galea, L.A.M. (2009). Hippocampus-dependent strategy choice predicts low levels of cell proliferation in the dentate gyrus. **Neurobiol. Learn. Mem.** 91, 437–446.

Epp JR, Haack AK, Galea LA., (2010). Task difficulty in the Morris water task influences the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus* 20, 866–876.

Epp JR, Haack AK, Galea LA. (2011). Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and a geofcells at examination. **Neurobiol. Learn. Mem.** 95, 316–325.

Epp JR, Chow C, Galea LA. (2013) Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis **Front Neurosci.** 7:57.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med** 4:1313–1317

Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. **J Neurosci.** 25:10074–10086.

Fabel, K., and Kempermann, G. (2008). Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. **Neuromolecular. Med.** 10, 59–66.

Fabel, K., Wolf, S. A., Ehninger, D., Babu, H., Galicia, P. L., Kempermann, G. (2009). Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. **Front. Neurosci.** 3, 50-67

Farioli-Vecchioli, S., Saraulli, D., Costanzi, M., Pacioni, S., Cina, I., Aceti, M., Micheli, L., Bacci, A., Cestari, V., Tirone, F. (2008). The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. **PLoS Biol.** 6(10):e246

Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., and 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. **Neurosci** 124, 71–79.

Faulkner RL, Jang MH, Liu XB, Duan X, Sailor KA, Kim JY, Ge S, Jones EG, Ming GL, Song H, Cheng HJ. (2008) Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 105:14157–14162.

Ferreira, A.F.B., Real, C.C., Rodrigues, A.C., Alves, A.S., Britto, L.R.G. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, bdnf-independent hippocampal plasticity. **Brain Research** 1425: 111-122. 2011

Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. **Mol Cell Neurosci** 23:373–382.

Fowler CD, Liu Y, Ouimet C, Wang Z. (2002) The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. **J Neurobiol** 51:115–128.

Gage ,FH. (2000). Mammalian neural stem cells. **Sci** 287: 1433–1438.

Gage ,FH. (2002) Neurogenesis in the adult brain. **J Neurosci** 3:612-3.

Gage, FH. (2004) Structural plasticity of the adult brain. **Dialogues Clin Neurosci** 6:135-41.

Garthe, A., Behr, J., e Kempermann, G. (2009). Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. **PLoS ONE** 4, e5464.

Garthe, A. , Kempermann, G. (2013). An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis. **Front Neurosci.** 7: 63

Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H.(2007) GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis.**Trends Neurosci** 30:1–8.

Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS. (1992)Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. **J Neurosci** 12:3642–3650.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosci** 17:2492–2498.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95:3168–3171.

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Sci** 286:548–552.

Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. (1999) Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96:5263–5267.

Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG. (2001) Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98:10910–10917.

Greenwood , BN, Loughridge AB, Sadaoui N, Christianson JP, Fleshner M. (2012). The protective effects of voluntary exercise against the behavioral consequences of uncontrollable stress persist despite an increase in anxiety following forced cessation of exercise. **Behav Brain Res** 233:314–21

Hairston, I. S., Little, M. T.M., Scanlon, M. D., Barakat, M. T., Palmer, T. D., Sapolsky, R. M., et al. (2005). Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. **J. Neurophysiol.** 94, 4224–4233.

Hastings, NB & Gould, E. 1999. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. **J. Comp. Neurol.** 413:146–54

Helene, A & Xavier, GF. 2003. A construção da atenção a partir da memória. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 25 (Sup.II), 12-20

Helene, A & Xavier, GF. 2007. Memória e (a Elaboração da) Percepção, Imaginação, Inconsciente e consciência. In: Ladeira-Fernandez, J e Silva, M. T. A. (ed.) **Intersecções entre psicologia e neurociências**, 1ª edição. MedBook, Rio de Janeiro, pp 103-148

Hernandez-Rabaza V, Llorens-Martín M, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Arcusa A, Gumus HG, Gómez-Pinedo U, Pérez-Villalba A, Roselló J, Trejo JL, Barcia JA, Canales JJ. (2009). Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long- term conditional rule retention and spatial reversal. **Neurosci** 159:59–68

Herry C, Ferraguti F, Singewald N, Letzkus JJ, Ehrlich I, Lüthi A. (2010). Neuronal circuits of fear extinction. **Eur J Neurosci.**;31(4):599-612.

Huang, L., Devries, G. J., and Bittman, E. L. (1998). Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. **J. Neurobiol.** 36, 410–420.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. **Nature Neurosci.** 11: 1153–1161.

Izquierdo I. **Memória**. Porto Alegre, Ed. Artmed, 2002.

Jaholkowski P, Kiryk A, Jedynak P, Ben Abdallah NM, Knapska E, Kowalczyk A, Piechal A, Blecharz-Klin K, Figiel I, Lioudyno V, Widy-Tyszkiewicz E, Wilczynski GM, Lipp HP, Kaczmarek L, Filipkowski RK. (2009). New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning. **Learn Mem** 16:439–451

Jessberger, S., Clark, R. E., Broadbent, N. J., Clemenson, G. D. Jr., Consiglio, A., Lie, D. C., Squire, L. R., and Gage, F. H. (2009). Dentate gyrus-specific knock-down of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. **Learn. Mem.** 16, 147–154

Jin et al. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99:11946- 11950

Kanarek RB, D'Anci KE, Jurdak N, Mathes WF.(2009). Running and addiction: precipitated withdrawal in a rat model of activitybased anorexia. *Behav Neurosci*;123:905–12.

Kannangara, T. S., Lucero, M. J., Gil- Mohapel, J., Drapala, R. J., Simpson, J. M., Christie, B. R., and van Praag, H. (2010). Running reduces stress and enhances cell genesis in aged mice. *Neurobiol. Aging. neurobiolaging.* 32(12):2279-86.

Kannangara, T. S., Webber, A., Gil- Mohapel, J., and Christie, B. R. (2009). Stress differentially regulates the effects of voluntary exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of mice. **Hippocampus** 19, 889–897

Kaplan MS, Bell DH. (1983). Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radio- autographic study of granule cells in the hippocampus. **Exp. Brain Res.** 52:1–5

Kaplan MS, Hinds JW. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science** 197:1092–94

Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW.(1985) Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. **J Comp Neurol** 239:117–125

Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. **J Neurosci Methods** 115:97–105.

Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. (2007). Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. **Nat Neurosci** 10:355–362.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH.(1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**. 386: 493–495.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends Neurosci** 27:447–452.

Kempermann, G. **Adult Neurogenesis: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain**. USA:Oxford University Press; 2005.

Kempermann, G. **Adult Neurogenesis: Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain**. USA: 2ed Oxford University Press; 2010.

Khabour OF, Alzoubi KH, Alomari MA, Alzubi MA. (2013).Changes in spatial memory and BDNF expression to simultaneous dietary restriction and forced exercise. **Brain Res Bull**. 90:19-24.

Khabour OF, Alzoubi KH, Alomari MA, Alzubi MA.(2010) Changes in spatial memoryand BDNF expression to concurrent dietary restriction and voluntary exercise. **Hippocampus** 20:637–45

Kim H, Lee SH, Kim SS, Yoo JH, Kim CJ (2007) The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. **Int J Dev Neurosci** 25:243–249

Kitamura T, Mishina M, Sugiyama H. (2003). Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. **Neurosci. Res.** 47, 55–63.

Kitamura, T., Saitoh, Y., Takashima, N., Murayama, A., Niibori, Y., Ageta, H., Sekiguchi, M., Sugiyama, H., and Inokuchi, K. (2009). Adult neurogenesis modulates the hippocampus- dependent period of associative fear memory. **Cell** 139, 814–827.

Kramer, A. F., Hahn, S., Cohen, N. J., Banich, M. T., McAuley, Harrison, C. R. et al. (1999). Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature.** 400:418-419.

Ko, H. G., Jang, D. J., Son, J., Kwak, C., Choi, J. H., Ji, Y. H., Lee, Y. S., Son, H., and Kaang, B. K. (2009). Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of con- textual fear memory. **Mol. Brain** 2, 1.

Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. (2011). Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. **Learn Mem** 18:605–609.

Kohman RA, Deyoung EK, Bhattacharya TK, Peterson LN, Rhodes JS.(2012) Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. **Brain Behav Immun.** 26(5):803-10.

Kohman RA, Clark PJ, Deyoung EK, Bhattacharya TK, Venghaus CE, Rhodes JS.(2012). Voluntary wheel running enhances contextual but not trace fear conditioning. **Behav Brain Res.** 126:1-7.

Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. (2005).Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. **Sci** ;310:679–683.

Kornack DR, Rakic P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999;96:5768–5773

Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G.(2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. **J Comp Neurol**; 467: 455–63

Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, (2006). Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. **Neurobiol Aging**. 27: 1505–1513.

Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH.(1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. **J Neurosci** 17:5820–5829.

Lacefield CO, Itskov V, Reardon T, Hen R, Gordon JA. (2010). Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. **Hippocampus**. 22(1):106-16.

Lafenetre, P., Leske, O., Ma-Hogemeier, Z., Haghikia, A., Bichler, Z., Wahle, P., and Heumann, R. (2010). Exercise can rescue recognition memory impairment in a model with reduced adult hippocampal neurogenesis. **Front. Behav. Neurosci**. 3:34.

Langston, R. F.; Ainge, J. A; Couey, J. J. (2010). Development of the spatial representation system in the rat. **Sci**. 328: 5985: 1576–80.

Lazarini F, Lledo PM. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? **Trends Neurosci**. 34:20–30

Leasure J.L e Decker L. (2009) Social Isolation Prevents Exercise-Induced Proliferation of Hippocampal Progenitor Cells in Female Rats. **Hippocampus**. 19:907-912.

Lee DA, Blackshaw S. (2012). Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain. *Int J Dev Neurosci*. 30(8):615-21

Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 97:11032-37

Lent, R.2010. **Cem Bilhões de Neurônios** - 2ª Ed.Editora: Atheneu

Levi G. **Sulla cariocinesi delle cellule nervosa**. Riv. Patol. Nerv. Ment. 1898

Leuner, B., Kozorovitskiy, Y., Gross, C.G., Gould, E., 2007. Diminished adult neurogenesis 849 in the marmoset brain precedes old age. **Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A**. 104, 850 851 17169-17173.

Lindsey BW, Tropepe V (2006) A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. **Prog Neurobiol** 80:281-307.

Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, Erlanson-Albertsson C. (2006) High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. **Eur J Neurol**.13(12):1385-8.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nat Rev Neurosci** 7:179-193

- Llorens-Martin Tejeda GS, Trejo JL. 2010. Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. **PLoS ONE**;5:e12188
- Lois c, Alvarez-Buylla A 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. **Proc. Natl Acad Sci USA** 90: 2074-2077
- Lou SJ, Liu JY, Chang H, Chen PJ (2008) Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Res** 1210:48–55
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L. (2003). Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. **Exp Neurol** 183:600-609.
- Luzzati F, De Marchis S, Fasolo A, Peretto P. (2006) Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. **J Neurosci** 26:609–621
- Madsen, T. M., Kristjansen, P. E., Bolwig, T. G., and Wortwein, G. (2003). Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. **Neurosci** 119, 635–642.
- Manganas LN, Zhang X, Li Y, Hazel RD, Smith SD, Wagshul ME, Henn F, Benveniste H, Djuric PM, Enikolopov G, Maletic-Savatic M. (2007) Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. **Sci** 318:980–985
- Marín-Burgin A, Schinder AF. (2012) Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. **Behav Brain Res**.227(2):391-9.

Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H. (2012). Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. **Dev Neurobiol.** 72(6):943-52

Markakis EA, Gage FH. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. **J Comp Neurol** 406:449-460.

Mattson, MP, 2000. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. **Brain Res.** 886, 47-53

McGaugh J.L. (2000). Memory - a Century of Consolidation. **Sci**, 287.

McGaugh JL. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu Rev Neurosci** 27: 1-28.

McGaugh JL. (2005). Emotional arousal and enhanced amygdala activity: new evidence for the old perseveration-consolidation hypothesis. **LearnMem** 12: 77-79.

Mello, P. **Efeitos do exercício físico sobre diferentes tipos de memória em ratos normais e com prejuízo mnemônico causado pela separação maternal.** [dissertação de mestrado] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008

Menini A, 2010. **The Neurobiology of Olfaction.** Boca Raton (FL): CRC Press; 2010. Chapter 11. Frontiers in Neuroscience.

Meshi D. D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R. (2006). Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nat Neurosci.** 9(6):729-31

Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annu Rev Neurosci** 28:223-250.

Mohapel P, Mundt-Petersen K, Brundin P, Frielingsdorf H. (2006). Working memory training decreases hippocampal neurogenesis. **Neurosci** 142:609-13

Monfils MH, Cowansage, KK, Klann E, Ledoux JE 2009. Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. **Scie** 324: 951-955

Mongiat LA, Schinder AF. (2011) Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. **Eur J Neurosci**. 33:1055-1061.

Moreira, R. C.; Moreira, M. V.; Bueno, J. L.; Xavier, G. F. Hippocampal lesions induced by ionizing radiation: a parametric study. **J Neurosci Methods** 75(1) 41-7.

Morris, R.G.M.; Garrud, P.; Rawlins, J.N.P.; O'keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nat** 297: 681-683, 1982.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J. Neurosci. Methods** 11, 47-60.

Morris RGM, Schenck F, Tweedie F, Jarrard LE. (1990). Ibotenate lesions of the hippocampus and/or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. **Eur J Neurosci** 2:1016-1028.

Moser EI, Kropff E, Moser MB (2008) Place cells, grid cells and the brain's spatial representation system. **Annu Rev Neurosci**. 2008;31:69-89.

Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aurousseau C, Le Moal M, et al. (2006) Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. **Neurobiol Aging** 27:645–54.

Mustroph ML, Chen S, Desai SC, Cay EB, Deyoung EK, Rhodes JS. 2012. Aerobic exercise is the critical variable in an enriched environment that increases hippocampal neurogenesis and water maze learning in male C57BL/6J mice. **Neurosci** 219:62–71

Naylor AS, Persson AI, Eriksson PS, Jonsdottir IH, Thorlin T. et al.,2005. Extended voluntary running inhibits exercise-induced adult hippocampal progenitor proliferation in the spontaneously hypertensive rat. **J Neurophysiol** 93:2406–2414

Nottebohm F (1981) A brain for all seasons: Cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. **Sci** 214:1368-1370

O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM.. (2007) The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res.* 176(2):362-6.

Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radák Z. (2005) . The effects of moderate-, strenuous-and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. **Neurochem. Int.** 46, 635–640

Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S.(2010). Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. **Nat Neurosci.**13(2):173-9

O'Keefe J. and Nadel, L., 1978. **The Hippocampus as a Cognitive Map**. Oxford: Oxford University Press.

O'Keefe J, Dostrovsky J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Res.** 34(1):171-5.

Okuda, H., Tatsumi, K., Makinodan, M., (2009). Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala. **J. Neurosci. Res.** 87, 3546–3553

Olariu A, Cleaver KM, Shore LE, Brewer MD, Cameron HA. (2005). A natural form of learning can increase and decrease the survival of new neurons in the dentate gyrus. **Hippocampus** 15:750–62

Olton DS. (1983). Memory functions and the hippocampus. In: Seifert W, editor. **Neurobiology of the hippocampus**. London: Academic Press. p 335–373.

Overstreet-Wadiche LS, Bensen AL, Westbrook GL. Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. **J Neurosci.** 2006a; 26:2326–2334.

Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. **J Neurosci.** 2006b;

Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. **J Neurosci** 21:6706-6717

Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA- NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **Eur J Neurosci** 17:879

Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., VandenBerg, S.R. & Fike, J.R. (2004) Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. **Radiat. Res.**, 162, 39–47.

Radak, Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, Goto S. (2004). Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. **FASEB J.**18, 749–750.

Radak, Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvári M, Nyakas C, Goto S. (2005). Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochem. Int.** 38, 17– 23.

Radak, Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S. (2006) The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem** 49:387–392.

Ramirez-Amaya, V., Marrone, D.F., Gage, F.H., Worley, P.F., Barnes, C.A., (2006). Integration of new neurons into functional neural networks. **J. Neurosci.** 26, 12237–12241.

Ramon y Cajal, S.(1928). **Degeneration & Regeneration of the Nervous System**. London: Oxford University Press.

Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A., Lesch, K.P., (2006). Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. **Mol. Psychiatry** 11, 514–522.

Rhodes, JS, van Praag H, Jeffrey S, Girard I, Mitchell GS, Garland T Jr, Gage FH.(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: 1006–1016.

Ribak CE, Korn MJ, Shan Z, Obenaus A.(2004) Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. **Brain Res** 1000:195–199

Rola, R., Raber, J., Rizk, A., Otsuka, S., VandenBerg, S. R., Morhardt, D. R., and Fike, J. R. (2004). Radiation- induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. **Exp. Neurol.** 188, 316–330.

Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., Fabbri, M. E., Tessarollo, L., Maffei, L., Berardi, N., and Caleo, M. (2008). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1850–1856.

Sadananda, M. (2004) Adult neurogenesis in the brain of higher vertebrates: implications of the paradigm shift. **Curr Sci**, 87; (3)297-307

Sahay, A., Wilson, D. A., and Hen, R. (2011). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. **Neuron** 70, 582–588.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Sci** 301, 805–809.

Santos, A.M.G. **Envolvimento do giro denteado e córtex entorrinal medial, mas não do córtex entorrinal lateral, com o processamento de informações de natureza espacial.** Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001

Santos, A.M.G.. Aprendizagem e Memória no Labirinto Aquático de Morris. In: Gilberto Fernando Xavier. (Org.). **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. 1ed.São Paulo: Plêiade, 1999, v. , p. 135-158

Sara SJ. 2000. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learn Mem** 7:73-84.

Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J. W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Santarelli, L., Hen, R., and Drew, M. R. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103, 17501–17506.

Schaper A. (1897) .Die fruhesten differenzierung im centralnervenssystem. **Arch.f Entw-Mech Organ**, 5 81-132

Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J.(2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. **Nat** 429:184–187.

Seki T, Arai Y. (1993) Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. **J Neurosci** 13:2351–2358.

Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. **J Neurosci** 21: 7153–60.

Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A.(2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. **J Comp Neurol** 478:359–378.

Shapiro LA, Ng K, Zhou QY, Ribak CE. (2009) Subventricular zone-derived, newly generated neurons populate several olfactory and limbic forebrain regions. **Epilepsy Behav** 14:74–80

Shapiro M.L. Eichenbaum H. (1997). Hippocampus as a memory map: Synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. **Hippocampus**. 9(4), 365-384.

Shors TJ, Miesagae G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. (2001). Neurogenesis in the adult rat is involved in the formation of trace memories. **Nat** 410:372–76

Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. **Hippocampus** 12:578–84

Shors TJ. (2008). From stem cells to grandmother cells: how neurogenesis relates to learning and memory. **Cell Stem Cell** 3:253–58

Shors TJ, Mathew J, Sisti HM, Edgecomb C, Beckoff S, Dalla C. (2007). Neurogenesis and helplessness are mediated by controllability in males but not in females. **Biol. Psychiatry** 62:487–95

Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. **Cell Stem Cell**. 8;7(4):483-95

Smart I. (1961). The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by autography after [H3]-thymidine injection. **J. Comp. Neurol.** 116:325–27

- Smart I, Leblond CP (1961) Evidence for division and transformation of neuroglia cells in the mouse brain as derived from radioautography after injection of thymidine-H3. **J Comp Neurol** 116:349–367.
- Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM (2001) Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. **J Neurophysiol** 85:2423–2431
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., and Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. **Neurosci** 130, 843–852.
- Snyder, J. S., Glover, L. R., Sanzone, K.M., Kamhi, J. F. e Cameron, H. A. (2009). The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. **Hippocampus** 19, 898–906
- Sohuer US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD.(2006) Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 361:1477–1497
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass,K, Bernard,S, (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. **Cell** 153, 1219–1227
- Squire, L.R.; Kandel, E.R. (2003). **Memória: da mente às moléculas**. Artmed, Porto Alegre
- Squire LR, Zola SM (1998): Episodic memory, semantic memory, and amnesia. **Hippocampus** 8:205–211.
- Steiner, B., Zurborg, S., Horster, H., Fabel, K., and Kempermann, G. (2008). Differential 24 h responsiveness of Prox1-expressing precursor cells in adult hippocampal neurogenesis to physical activity, environmental enrichment, and kainic acid-induced seizures. **Neurosci** 154, 521–529.

Swanson, L.W. (2004) **Brain Maps: Structure of the Rat Brain**. A Laboratory Guide with Printed and Electronic Templates for Data, Models and Schematics. 3ª 215pp., Elsevier, Amsterdam.

Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N (1999): Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. **Brain Res** 831:283-287.

Takase et al., 2009 . Effects of the hypnotic drug zolpidem on cell proliferation and survival in the dentate gyrus of young and old rats.. **Brain Reser.** 1259, p. 26-31.

Tanapat P, Galea LA, Gould L. (1998). Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. **Int. J. Dev. Neurosci.** 16:235-39

Tanapat P e Gould E (1997). EGF stimulates proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus. **Soc Neurosci Abstr.** 23:317.

Tanapat P et al. (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. **J Comp Neurol** 437:496-504.

Tashiro A, Makino H, Gage FH.(2007) Experience-Specific Functional Modification of the Dentate Gyrus through Adult Neurogenesis: A Critical Period during an Immature Stage. **J Neurosci** 27:3252-3259.

Taupin, P. **Adult Neurogenesis And Neural Stem Cells In Mammals**. England: Nova Science Publishers Inc; 2006.

Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. **J Neurosci** 21:1628–1634

Toni, N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. **Nat Neurosci.** 10, 727–7

Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. **Nat Neurosci.** 11:901–907.

Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T.(2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. **Neuron.** 1104:64–72

Tulvin, E. 1987. Multiple memory systems and consciousness. **Hum. Neurobiol,** 6; 67-80.

Uda M, Ishido M, Kami K, Masuhara M.(2006) Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. **Brain Res.** 1104:64–72.

van der Borght K, Meerlo P, Luiten PG, Eggen BJ, Van der Zee EA.,2005. Effects of active shock avoidance learning on hippocampal neurogenesis and plasma levels of corticosterone. **Behav. Brain Res.** 157:23–30

van der Borght K, Ferrari F, Klauke K, Roman V, Havekes R, Sgoifo A, van der Zee EA, Meerlo P (2006) Hippocampal cell proliferation across the day: increase by running wheel activity, but no effect of sleep and wakefulness. **Behav Brain Res.**;167(1):36-41.

- Van der Borght K, Kóbor-Nyakas DE, Klauke K, Eggen BJ, Nyakas C, Van der Zee EA, Meerlo P. (2009) Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. **Hippocampus**;19:928–36.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci** 2:266–270
- van Praag, H. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nat** 415:1030
- van Praag, H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J. Neurosci.** 25, 8680–8685
- Vaynman, S., Ying, Z., and 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. **Neurosci** 122, 647–657.
- Vaynman, S., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Eur. J. Neurosci.** 20, 2580–2590
- Vorheese CV, Williams MT. (2006) : Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nat Protoc** 1:848–848
- Xavier GF, Oliveira-Filho FJB, Santos AMG. (1999) Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in ‘place strategy’ because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus** 1999;9:668–81.

Xavier G.F. **Técnicas para estudo do sistema nervosa**. São Paulo: Plêiade, 1999.

Xavier GF, Costa VC. (2009) Dentate gyrus and spatial behaviour. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**.;33(5):762-73.

Whishaw, I. Q; mittleman, G.(1986) Visits starts, routes and places by rats (Rattus norvegicus) in swimming pool navigation tasks. **J. comparat. Psych.** V. 100. P.422-431, 1986.

Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Sekeres, M., Snyder, J. S., and Wang, S. (2006). Inhibition of neurogenesis inter- feres with hippocampus-dependent memory function. **Hippocampus** 16, 296–304

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

Wojtowicz, J.M. (2008) Irradiation as an experimental tool in studies of adult neurogenesis. **Hippocampus**, 16, 261–266.

Wu, C. W., Chang, Y. T., Yu, L., Chen, H. I., Jen, C. J., Wu, S. Y., Lo, C. P., and Kuo, Y. M. (2008). Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. **J. Appl. Physiol.** 105, 1585–1594.

Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH.(2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **J Neurosci.** 26:3–11

Zhang CL, Zou Y, He W, Gage FH, Evans RM. (2008) A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. **Nat** 451:1004–1007.

Zigova Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. (1998). Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol. Cell. Neurosci.*, 11, 234–245.

Biografia

Lívia Clemente Motta Teixeira

Informações pessoais

Nome: Lívia Clemente Motta Teixeira

Nome usado em citações: TEIXEIRA, L. C. M.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.

Filiação: Sérgio Alyro Motta Teixeira e Maria de Lourdes Clemente Motta Teixeira

Nascimento 22/02/1987 - Conselheiro Lafaiete/MG - Brasil

Carteira de Identidade 15216991 SSP - MG - 02/04/2004

CPF 087.060.436-82

Site: <http://www.ib.usp.br/labnec/livia.html>

Endereço Profissional: Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Rua do Matão, Travessa 14, 101- São Paulo, SP - Brasil - Caixa-postal: 05586030

Telefones de contato: +55 (11) 30917504 /+55 (11) 965398038

URL da Homepage: <http://www.ib.usp.br/labnec/livia.html>

contact e-mail : liviaclemente@hotmail.com/ e-mail alternativo :

liviaclemente@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- | | |
|--------------------|--|
| 2010 | Mestrado em Ciências (Fisiologia Geral) (Conceito CAPES 5).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Exercício físico, neurogênese e memória,
Orientador: Gilberto Fernando Xavier
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo |
| 2006 - 2010 | Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz De Fora, Brasil
Título: Neurogênese, aprendizado e memória: uma revisão
Orientador: Bernadete Maria de Sousa, Gilberto Fernando Xavier |
-

Formação complementar

- | | |
|--------------------|--|
| 2010 - 2010 | Curso de curta duração em MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS. Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, SBNeC, São Paulo, Brasil |
| 2010 - 2010 | Curso de curta duração em DEPENDÊNCIA DE DROGAS X APRENDIZAGEM E MEMÓRIA:. Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, SBNeC, São Paulo, Brasil |
| 2009 - 2009 | Curso de curta duração em Bioterismo de Invertebrados. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil |
| 2009 - 2009 | Curso de Inverno em Tópicos em Fisiologia Comparativa.. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil |

2009 - 2009	Curso de curta duração em 1º Curso de Neurociências e Comportamento. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Apoptose. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil
2007 - 2009	Intermediated Course in English. Cultura Inglesa, CIJF, Brasil
2008 - 2009	Curso de curta duração em Desenho experimental e Determinação Amostral. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz De Fora, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Interação Neuroimunoendócrino. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz De Fora, Brasil
2008 - 2008	Curso de curta duração em Canais iônicos e saúde. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz De Fora, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Controle Molecular da Morte Celular. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz De Fora, Brasil
2005 - 2007	Basic Course in English. Cultura Inglesa, CIJF, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2012 - 2012	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor, Regime: Parcial Atividade de monitoria PAE junto à disciplina BIF0217 - Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptação da Comunicação e Integração, ministrada aos alunos de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo
2010 - Atual	Vínculo: Mestrando , Enquadramento funcional: Mestrando , Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Atividades

10/2009 - 06/2010	Ensino médio Especificação: EJA - CURSO PARA EDUCAÇÃO DE JOVENS E ADULTOS - JOÃO XXIII- Biologia
12/2008 - 07/2009	Estágio, UFJF APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ENRIQUECIMENTO EM PSITACÍDEOS CATIVOS(AVES, PSITACÍDEOS), VISANDO O BEM ESTAR-PIBIC
04/2008 - 12/2008	Treinamento, CBR

Especificação:

TREINAMENTO EM ATIVIDADES DO BIOTÉRIO: ALOJAMENTO DE PRIMATAS, DE CAMUNDONGOS E DE RATOS

04/2008 - 12/2008 Estágio, Instituto de Ciências Biológicas
Estágio:
Biociclos Empresa Jr de Consultoria e Projetos em Biologia e Meio Ambiente

3. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis IBAMA

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Projetos

- 2012 – Atual** Contribuições do exercício físico para a neurogênese hipocampal e a memória Descrição: Investiga os efeitos de exercício físico sobre a neurogênese hipocampal e seus reflexos sobre a memória. Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Integrantes: Lívia Clemente Motta Teixeira; Gilberto Fernando Xavier ; Carolina de Souza Goulart
- 2011 - Atual** EXERCÍCIO FÍSICO, NEUROGÊNESE E MEMÓRIA
Descrição: Novos neurônios são continuamente gerados na zona subgranular do giro dentado e na zona subventricular dos ventrículos laterais do encéfalo adulto. Atividade física voluntária (espontânea) estimula a neurogênese de células granulares do giro dentado. Esse estímulo também é conhecido por melhorar o desempenho de tarefas dependentes do hipocampo. Porém, não está claro qual a duração desses benefícios após o final da atividade física. O objetivo desse trabalho é investigar por quanto tempo os efeitos benéficos induzidos pela atividade física perduram após seu término e em que extensão a exposição ao treinamento em tarefa cuja aprendizagem é dependente da função hipocampal promove maior recrutamento e sobrevivência dos novos neurônios. Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Integrantes: Lívia Clemente Motta Teixeira (Responsável); Gilberto Fernando Xavier ; Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP
- 2009 - 2010** EXERCÍCIO FÍSICO APÓS LESÃO SELETIVA DO GIRO DENTADO PREVINE PREJUÍZOS DE MEMÓRIA ESPACIAL? Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (1); Integrantes: Lívia Clemente Motta Teixeira; Gilberto Fernando Xavier (Responsável)
- 2008 - 2009** Aplicação da técnica de enriquecimento em Psitacídeos cativos (Aves, Psitacídeos), visando o bem estar
Descrição: Psitacídeos são aves ameaçadas de extinção em todo o mundo, notadamente no Brasil em virtude da fragmentação de habitat, tráfico e domesticação, sendo portanto facilmente encontrados em ambientes cativos. Manter animais em cativeiro implica no dever ético de lhes

proporcionar saúde física e psicológica. Técnicas de enriquecimento ambiental tem como objetivo principal melhorar o bem-estar dos animais em cativeiro, reduzindo a frequência de comportamentos anormais, aumentando a diversidade comportamental e a habilidade de lidar com desafios de uma maneira natural. Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (1); Integrantes: Lívia Clemente Motta Teixeira; Fábio Prezoto (Responsável) Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Prêmios e títulos

2013 Outstanding Student Poster Award, Second Brazilian Meeting on Brain and Cognition- UFABC

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Sousa, C.E.C, **TEIXEIRA, L. C. M.**, Tostes, F, Peters, V.M.. 2010. PROPORÇÃO SEXUAL NA NINHADA E DESENVOLVIMENTO PONDERAL DE CRIAS DE RATOS WISTAR: DADOS PRELIMINARES Interdisciplinary Journal of Experimental Studies. , v.1, 82-83

Capítulos de livros publicados

1. **TEIXEIRA, L. C. M.**. 2011. Neurogênese no sistema nervoso central adulto: onde, como e com que propósito? In VIII Tópicos em Fisiologia Comparativa, editado por Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo

Apresentação de trabalho

1. TAKADA, S. H., LEE, V. Y., HAEMMERLE, C. S., **MOTTA-TEIXEIRA, L. C.**, Xavier, G. F., TAKASE, L. F., WATANABE, I., NOGUEIRA, M. I. Cell death and neurogenesis in the rat hippocampus following neonatal anoxia. Second Brazilian Meeting on Brain and Cognition 2013.

2. LEE, V. Y., TAKADA, S. H., **MOTTA-TEIXEIRA, L. C.**, MACHADO, A. V., Xavier, G. F., NOGUEIRA, M. I. Influência do exercício materno gestacional sobre os efeitos da anóxia neonatal na aprendizagem e na quantidade de neurônios maduros e sinapses no hipocampo de ratos. IV Simpósio de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais 2013.

3. TAKADA, S. H., LEE, V. Y., HAEMMERLE, C. S., **MOTTA-TEIXEIRA, L. C.**, Xavier, G. F., TAKASE, L. F., WATANABE, I., NOGUEIRA, M. I. Morte neural e neurogênese no hipocampo

de ratos pós anóxia neonatal. 2013. IV Simpósio de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais 2013

4. **MOTTA-TEIXEIRA, L. C.**, TAKADA, S. H., NOGUEIRA, M. I., Xavier, G. F. *Detraining, spatial memory and neural proliferation, in rats. 42nd American Society for Neuroscience Meeting*, 2012.

5. **TEIXEIRA, L. C. M.**, TAKADA, S. H., LEE, V. Y., NOGUEIRA, M. I., Xavier, G. F. *DOES 5-BROMO-2'-DEOXYURIDINE (BRDU) INFLUENCE THE POSTNATAL DEVELOPMENT IN RATS?. 10th International Congress on Cell Biology 2012.*

6. TAKADA, S. H., LEE, V. Y., **MOTTA-TEIXEIRA, L. C.**, Xavier, G. F., TAKASE, L. F., NOGUEIRA, M. I. *Study of neural proliferation pattern in subgranular cell layer of dentate gyrus induced by neonatal anoxia in young and adult rats. 42nd American Society for Neuroscience Meeting 2012.*

7. TAKADA, S. H., LEE, V. Y., **TEIXEIRA, L. C. M.**, TAKASE, L. F., NOGUEIRA, M. I. *Diferentes padrões de proliferação neuronal na camada subgranular do giro denteado induzidos por anóxia neonatal em ratos jovens e adultos. III Simpósio de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais 2011.*

8. MATIAS, I. C. P., **TEIXEIRA, L. C. M.**, SILVA, M. A. S. *Neurogênese: mecanismo de plasticidade?. 2011. in I Fórum de produção científica da Região Centro Sul-Fluminense- Universidade Severino Coimbra*

9. **TEIXEIRA, L. C. M.**, COSTA, M. A., GONÇALVES, B.S.V., ALMEIDA, A.C.G, RODRIGUES, A.M. *NON-SYNAPTIC NATURE OF EPILEPTIFORM ICTAL ACTIVITY.. XXXIV Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento 2010.*

10. **TEIXEIRA, L. C. M.**, PREZOTO, F. *Aplicação da técnica de enriquecimento em Psitacídeos cativos (Aves, Psitacideos), visando o bem estar. XXVI Encontro Anual de Etologia. 2009.*

11. Sousa, C.E.C, **TEIXEIRA, L. C. M.**, Tostes, F, Peters, V.M. *Influência do índice sexual da ninhada no desenvolvimento pós-natal de crias de ratos Wistar. 12ª Semana Temática da Biologia USP 2009.*

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Orientação de outra natureza

1. Isadora Cristina Pereira Matias. *O exercício físico voluntário influencia o condicionamento ao contexto?. 2011. Orientação de outra natureza - Universidade de São Paulo*

2. Dayane Caixeta. *O exercício físico voluntário influencia o condicionamento ao contexto?. 2011. Orientação de outra natureza - Universidade de São Paulo*

3. Wilfredo Luis Alberto Flores Valerio. *O exercício físico voluntário influencia o condicionamento ao contexto?. 2011. Orientação de outra natureza - Universidad Nacional Mayor de San Marcos*

4. Ricardo Cézare Araújo. *O exercício físico voluntário influencia o condicionamento ao contexto?. 2011. Orientação de outra natureza - Universidade de São Paulo*



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEUA/IB/052/2011
Ref. 2011.1.1043.41.5

São Paulo, 26 de setembro de 2011.

Prezado Senhor

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada nesta data, **APROVOU** o Projeto "Exercício Físico, Neurogênese e Memória"- **Protocolo 143/2011**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Livia Clemente Motta Teixeira).

Atenciosamente.

Profa. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. GILBERTO FERNANDO XAVIER

Departamento de Fisiologia do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-090 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - <http://www.ib.usp.br>