UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

CÉSAR RENATO SARTORI

Atividade física e neuroproteção em camundongos adultos após indução de *status epilepticus* por pilocarpina

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) César Renato Sartori
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Francesco Langone

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Sa773a

Sartori, César Renato
Atividade física e neuroproteção em camundongos adultos após indução de *status epilepticus* por pilocarpina / César Renato Sartori. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Francesco Langone.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Epilepsia. 2. Camundongo. 3. Pilocarpina. 4. Atividade física. 5. Agentes neuroprotetores. I. Francesco Langone. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdet/ib)

Título em inglês: Physical activity and neuroprotection in adult mice after pilocarpine-induced *status epilepticus.*
Palavras-chave em inglês: epilepsy, mice, pilocarpine, physical activity, neuroprotective agents.
Área de concentração: Fisiologia.
Titulação: Mestrado.
Banca examinadora: Francesco Langone, Li Li Min, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Edison Duarte, Denise Vaz de Macedo.
Data da defesa: 21/06/2005.

Data da Defesa: 21/06/2005

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Francesco Langone (orientador)

Prof. Dr. Li Li Min

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Prof. Dr. Edison Duarte

Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

iii

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Celso e Marina, pelo inabalável e incondicional apoio em todos os momentos, ao longo da minha vida, e especialmente durante a realização deste projeto.

Agradeço aos meus irmãos, Marisa e Celso, aos cunhados, Marco e Márcia, e ao meu sobrinho, Felipe, pelo constante e imprescindível conforto fraterno e familiar.

Agradeço ao Prof. Dr. Francesco Langone, meu orientador, que se tornou um amigo, pela oportunidade que me proporcionou de realizar o mestrado. Pela atenção, paciência e dedicação na orientação. Por ter aberto as portas do seu laboratório a um educador físico interessado em neurociência. E por acreditar na idéia de se estudar os efeitos da atividade física sobre o cérebro.

Agradeço à Dra. Verônica S. Valentinuzzi pela prontidão e dedicação ao me ensinar o protocolo dos testes no labirinto aquático de Morris.

Agradeço ao Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier pelas importantes sugestões relativas à interpretação dos testes comportamentais realizados neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Roberto Lent pelas sugestões, muito oportunas, a respeito da investigação da proliferação celular desenvolvida neste projeto.

Agradeço à Prof. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari por disponibilizar o espaço e a infra-estrutura do seu laboratório para a realização de diversos procedimentos experimentais. Agradeço-a especialmente pelas valiosas sugestões no meu exame de qualificação; e, ainda, pela amigável convivência.

Agradeço à Profa. Dra. Glauce Aparecida Pinto e aos técnicos Cristiano e Eduardo, do Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo providencial auxílio com os procedimentos de imunoistoquímica utilizados neste trabalho para o estudo da proliferação celular.

Agradeço ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares pelo auxílio crucial no processamento estatístico dos dados obtidos neste trabalho.

Agradeço aos componentes da banca do exame de qualificação e da banca examinadora da defesa da dissertação, Prof. Dr. Li Li Min, Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, Prof. Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo e especialmente ao Prof. Dr. Edison Duarte, que ainda nos tempos da graduação, se constituiu num exemplo como docente e foi responsável pelo despertar do meu interesse pela neurociência.

Agradeço ao Sr. Eduardo Veiga pelo prestativo serviço na fabricação e manutenção dos equipamentos utilizados para proporcionar a atividade física aos animais.

Agradeço ao colega André Luiz do Nascimento por me ensinar o modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em camundongos e diversos outros procedimentos experimentais executados durante este trabalho.

Agradeço à colega Fernanda Pelagio pelo auxílio na realização e na coleta de dados dos testes no labirinto aquático de Morris.

Agradeço a todos os colegas e amigos do Laboratório de Neurobiologia, Alexandre, André Nascimento, André Vieira, Cristiane, Débora, Fábio, Fernanda Hussein, Fernanda Pelagio, Gustavo e Rafael pela convivência amigável e saudável, e por vezes divertida.

Agradeço aos funcionários do Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/MA, Campinas), Paulinho e Israel, pelo ótimo atendimento em todas as vezes que solicitei os animais utilizados neste trabalho.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP pela boa convivência.

Por fim agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para o êxito deste empreendimento.

Agradecimentos Institucionais

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço ao Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/MA, Campinas, pelo fornecimento dos camundongos utilizados neste trabalho.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP por fornecer a infra-estrutura necessária para a realização deste projeto de mestrado.

Sumário

Resumo ..... *viii*

Abstract ..... *ix*

1. Introdução 1

2. Objetivos 10

3. Materiais e Método 11

3.1 Animais e grupos experimentais. 11
3.2 Indução do *status epilépticos* 11
3.3 Condições de atividade física 12
3.4 Teste do Labirinto Aquático 14
3.5 Análise histológica e quantitativa 17
3.5.1 Perfusão e obtenção dos cortes histológicos 17
3.5.2 Coloração de Nissl com violeta de cresila e avaliação da perda neuronal 18
3.5.3 Histoquímica para Fluoro Jade B 19
3.5.4 Imunoistoquímica para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) 21
3.6 Testes estatísticos 22

4. Resultados 24

4.1 Alterações comportamentais induzidas pela administração de pilocarpina 24
4.2 Volume de atividade física (VAF) 24
4.3 Teste do Labirinto Aquático 27
4.3.1 Memória de referência espacial 27
4.3.2 *Probe Test* 29
4.4 Análise histological 31
4.4.1 Coloração de Nissl e avaliação da perda neuronal 31
4.4.1.1 Giro denteado 31
4.4.1.2 Camada piramidal 32
4.4.2 Detecção de neurônios marcados pelo Fluoro Jade B 35
4.4.2.1 Giro denteado 35
4.4.2.2 Camada piramidal 36
4.4.3 Avaliação da proliferação celular 40

5. Discussão 43

6. Conclusões 60

7. Referências Bibliográficas 61

Anexos 70

Resumo

O modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em camundongos reproduz a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) em humanos. Animais submetidos à indução de *status epilepticus* apresentam alterações comportamentais, eletroencefalográficas e lesão neuronal compatíveis com esta condição. Estudos recentes relatam relevantes efeitos positivos da prática de atividade física sobre o sistema nervoso tanto em humanos como em modelos animais. Dentre estes efeitos figuram o aumento da sobrevivência neuronal e da resistência cerebral a diferentes insultos, promoção da angiogênese, estímulo da neurogênese, fortalecimento da potenciação de longa duração no hipocampo, melhora da aprendizagem e memória e contribuição para a manutenção da função cognitiva durante o envelhecimento. Todos estes efeitos conferem à atividade física um grande potencial neuroprotetor. Além disso, foram relatados benefícios decorrentes desta intervenção ambiental diretamente em pacientes com epilepsia e em animais submetidos à epilepsia induzida. Contudo, não há dados na literatura sobre o possível efeito neuroprotetor da atividade física no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em camundongos. Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da atividade física voluntária crônica sobre a perda neuronal no hipocampo e suas conseqüências na função mnemônica de camundongos submetidos a este modelo experimental. Trinta e dois camundongos Swiss foram divididos em quatro grupos experimentais (n=8): Saudável Sedentário (SS), Saudável Corredor (SC), Epiléptico Sedentário (ES) e Epiléptico Corredor (EC). Quarenta e oito horas após a indução do *status epilepticus*, ou sua simulação, foi proporcionado aos animais dos grupos corredores (SC e EC) o acesso a uma roda de atividade instalada em suas respectivas gaiolas por um período de 28 dias. Após este período os animais foram testados no labirinto aquático de Morris para avaliação da memória de referência espacial. Ao final dos testes os animais foram perfundidos com paraformaldeído (4% em tampão fosfato) e os cérebros removidos e processados para inclusão em parafina. Foram então obtidos cortes frontais do cérebro (8µm) para avaliação da extensão da lesão tecidual (coloração de Nissl), da presença de neurônios em degeneração (Fluoro Jade B) e da proliferação celular (PCNA) na formação hipocampal dorsal. Os animais dos grupos SS e SC não apresentaram lesão neuronal ou neurodegeneração, como esperado; também não diferiram entre si na proliferação celular e no teste de memória de um modo geral. Os animais dos grupos ES e EC apresentaram lesão neuronal e neurodegeneração, não sendo constatadas diferenças entre sedentários e corredores. Por outro lado, os animais ES revelaram maior proliferação celular comparados aos EC. Os animais do grupo EC apresentaram desempenho significativamente melhor nos testes de memória quando comparados aos animais ES. Assim, nossos dados revelaram que, a despeito de não ter ocorrido proteção contra lesão histológica, a atividade física melhorou significantemente o desempenho dos animais submetidos ao *status epilepticus* no teste do labirinto aquático de Morris, indicando que mesmo após lesão neurológica a atividade física promove melhora funcional. Acreditamos que tal melhora pode ser atribuída a mecanismos moleculares relacionados à plasticidade neuronal, que não foram identificados pelas técnicas utilizadas no presente estudo.

Abstract

Pilocarpine-induced epilepsy in mice is an experimental model of the Temporal Lobe Epilepsy (TLE). *Status epilepticus* determined by pilocarpine adminstration leads to behavioral and electroencephalographic changes and neuronal damage similar to those observed in TLE. Recently, it has been shown that physical activity exerts neuroprotective effects, such as increase in neuronal survival, angiogenesis and neurogenesis; resistance to brain injuries, strengthening of the long term potentiation (LTP), improvement of memory and learning; and preservation of cognitive function during aging process. Particularly, physical activity also plays a positive role in epileptic patients and animals. However, there are no reports regarding the neuroprotective action of physical activity on the pilocarpine model of epilepsy in mice. In the present work, we studied the effects of the voluntary physical activity on hippocampal neuronal loss and mnemonic function of mice after the pilocarpine-induced *status epilepticus.* Thirty-two Swiss mice were assigned to four experimental groups (n=8): Normal Sedentary (NS), Normal Runner (NR), Epileptic Sedentary (ES) and Epileptic Runner (ER). Forty-eight hours after the *status epilepticus* or its simulation the animals of the runner groups (NR, ER) had access to a running wheel for 28 days. After that, the mice were submitted to the Morris Water Maze test for the evaluation of the spatial memory. Finally, the mice were perfused with paraformaldehyde (4% in phosphate buffer), the brains were dissected and processed for paraffin embedding. Frontal sections (8μm) were serially cut and used for analysis of histologic damage (Nissl staining), degenerating neurons (Fluoro Jade B) and cell proliferation (immunohistochemistry for PCNA) of the dorsal hippocampal formation. Mice of the NS and NR groups showed neither neuronal damage nor neurodegeneration. In addition, these groups were similar to each other in the Morris Water Maze test and exhibited comparable immunostainig patterns for PCNA. In contrast to the previous groups, in ES and ER groups neuronal damage and neurodegeneration were observed and equivalent. However, cell proliferation was higher in ES than in ER. Animals of the ER group had better performance in the Morris Water Maze test compared to ES mice. In conclusion, our results show that physical activity improved significantly the spatial memory of mice that had *status epilepticus* induced by pilocarpine, despite of having not changed the morphological evidence of neuronal damage. We believe that such improvement might be attributed to molecular mechanisms related to neuronal plasticity, which were not identified by the techniques we used in the present investigation.

1. Introdução

Epilepsia, conceito e características

A epilepsia é admitida hoje como sendo um grupo de doenças que têm em comum crises epilépticas que ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril. Tais crises são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo (crises focais), ou de área mais extensa envolvendo simultaneamente os dois hemisférios do cérebro (crises generalizadas). Os sintomas das crises dependem de quais regiões cerebrais estão envolvidas. Contudo, tais crises advêm do desencadeamento de uma atividade elétrica anormalmente intensa, síncrona e transitória das células nervosas. Por outro lado, considerando-se as diversas formas clínicas de epilepsia, acredita-se que no âmbito celular os mecanismos indutores das crises sejam vários (GUERREIRO et al., 2000).

A classificação das epilepsias e síndromes epilépticas baseia-se nas semelhanças, no tipo de crise, idade de início, sinais clínicos associados, histórico familiar, dados neurológicos e prognóstico. Assim, são descritos vários tipos diferentes de epilepsias e síndromes epilépticas, que constam do quadro de classificação internacional. Destaque-se que graças à melhor caracterização clínico-vídeo-eletroencefalográfica e ao conhecimento da história natural de muitas formas clínicas, se tornou possível nos últimos anos a identificação de síndromes e sub-síndromes como as epilepsias de lobo temporal (ELT), frontal, parietal e occipital (GUERREIRO et al., 2000).

A ELT possui alta prevalência e, embora na maioria dos casos se inicie na infância, pode manifestar-se em qualquer idade, sendo relativamente resistente ao tratamento medicamentoso. Aproximadamente 50% dos adultos com epilepsia apresentam ELT e o controle completo das crises através de tratamento clínico ocorre em menos da metade desses

pacientes. Manifesta-se, geralmente, por crises parciais simples e complexas recorrentes, sendo pouco freqüentes as crises com generalização secundária (crises tônico-clônicas). A forma mais comum de ELT é aquela cujos principais sintomas são gerados predominantemente pelo acometimento de estruturas mesiais do lobo temporal. Pacientes com ELT freqüentemente apresentam histórico familiar de epilepsia e antecedente de convulsão febril prolongada na infância. É comum existir um período silencioso, sem ocorrência de crises ou com crises de fácil controle; esta fase se estende das manifestações iniciais até o período no qual ocorrem crises espontâneas freqüentes ou refratárias à medicação (ENGEL, 1989; GUERREIRO et al., 2000).

Um fenômeno clínico bastante comum em pacientes com epilepsias mesiais do lobo temporal é a ocorrência da aura imediatamente antes do início da crise propriamente. A aura consiste em sintomas autonômicos, como mal estar epigástrico, e psíquicos incluindo emoções como o medo, podendo ocorrer ainda sensações olfatórias ou gustativas. As manifestações comportamentais decorrentes de crises parciais complexas geralmente iniciam-se com parada de atividade e olhar fixo, sendo comuns automatismos oroalimentares. As crises geralmente duram de 1 a 2 minutos. Após a remissão da crise o paciente pode apresentar desorientação, amnésia do evento, déficit de memória recente e afasia se as crises atingiram o hemisfério dominante (ENGEL, 1993; GUERREIRO et al., 2000).

A ELT é a síndrome epiléptica mais estudada tanto clinicamente quanto no âmbito experimental. Esta importância se deve à alta prevalência e à resistência ao tratamento medicamentoso, como já mencionado. Característica peculiar da ELT é a sua associação com esclerose mesial temporal, que consiste na redução da densidade neuronal com um padrão característico, envolvendo predominantemente as regiões CA1, CA3, CA4 e giro denteado da formação hipocampal. A esclerose mesial temporal também pode atingir, em um grau

variável, outras estruturas do lobo temporal como amígdala, úncus e giro parahipocampal (BABB e BROWN, 1987; GLOOR, 1991; MEENCKE e VEITH, 1991; CENDES e KOBAYASHI, 2000). A avaliação neuropsicológica do paciente com ELT pode revelar distúrbios de memória; essa disfunção tende a ser progressiva e é proporcional ao grau de atrofia das estruturas mesiais, sobretudo do hipocampo (CENDES e KOBAYASHI, 2000).

Modelo de epilepsia induzida por pilocarpina

Os modelos experimentais são importantes para a busca da melhor compreensão da fisiopatologia das epilepsias. Diversos modelos animais que reproduzem a ELT foram desenvolvidos em mamíferos fornecendo dados comportamentais, eletroencefalográficos e histológicos compatíveis com esta condição em humanos (LOTHMAN et al., 1995; ENGEL, 1996; ISOKAWA, 1997; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000). Nestes modelos se faz a indução inicial do *status epilepticus* (SE) por meio de agentes farmacológicos ou por estimulação elétrica. Nos modelos denominados agudos, o animal apresenta crises convulsivas somente durante a vigência do agente indutor, enquanto que nos modelos crônicos as crises recorrem a intervalos variados de tempo após a indução, podendo acompanhar toda a vida do animal (SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

Dentre os modelos crônicos, nos quais ocorrem crises recorrentes espontâneas, o modelo induzido pela administração da pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico, em ratos e camundongos reproduz com grande fidelidade a ETL humana (CAVALHEIRO, 1995; CAVALHEIRO et al., 1996). A injeção intraperitonial de 300-380mg/kg de pilocarpina nesses animais induz uma série de alterações comportamentais e eletroencefalográficas indicativas de atividade epiléptica automantida. Após a administração da droga os animais apresentam *status epilepticus* (SE), caracterizado pela gradual manifestação de fenômenos

epilépticos, que pode durar 24 horas (fase aguda). Após este período, segue-se uma fase silenciosa, com duração de 4 a 44 dias, durante a qual há um retorno progressivo ao quadro comportamental e eletroencefalográfico normal. Finalmente, com a ocorrência da primeira crise espontânea, inicia-se a fase crônica, na qual as crises ocorrem com uma freqüência de 2 a 15 por mês, por toda a vida do animal (CAVALHEIRO, 1995; CAVALHEIRO et al., 1996; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

Acredita-se que o efeito epileptogênico agudo da pilocarpina seja inicialmente decorrente do bloqueio de correntes de potássio, promovido pela ativação de receptores muscarínicos, que leva à facilitação para a descarga de salvas de potenciais de ação pelos neurônios hipocampais (BERNADO e PRINCE, 1981). Este mecanismo poderia levar à ativação secundária do sistema glutamatérgico e, conseqüentemente, a uma excitotoxicidade na formação hipocampal e em outras estruturas (TURSKI, et al., 1984).

Estudos anatomopatológicos desse modelo evidenciam importantes alterações do tecido nervoso similares ao que se observa em humanos, sendo que diferentes estruturas neurais são atingidas, tais como a formação hipocampal, o complexo amigdalóide, o córtex entorrinal e o neocórtex (TURSKI et al., 1983a, 1984). Tais alterações correspondem a anormalidades dendríticas e axonais acompanhadas da perda de neurônios, reação gliótica, reorganização sináptica e neurogênese no giro denteado (CLIFFORD et al., 1987; MELLO et al., 1992; PARENT et al., 1997). A perda neuronal é principalmente evidente na região hipocampal CA1 e CA3 e no hilo do giro denteado, embora também ocorra em outras regiões encefálicas (TURSKI et al., 1983b). Diversos estudos sugerem que a morte neuronal no hilo do giro denteado seja um passo importante para o desencadeamento de uma reorganização sináptica local determinando a ocorrência de crises recorrentes. Uma hipótese sugere que com a morte de neurônios hilares (células musgosas) que normalmente projetam axônios para

o campo dendrítico das células granulares, ocorre um rearranjo nas conexões locais. Tal evento é caracterizado pelo brotamento (*sprouting*) de fibras musgosas das células granulares do giro denteado que se projetam para seu próprio campo dendrítico, resultando num circuito excitatório recorrente (TAUCK e NADLER, 1985; McNAMARA, 1994). Outra proposição indica que a perda de neurônios hilares acarreta a remoção da eferência excitatória desses neurônios sobre as células em cesto, que, por sua vez, são GABAérgicas e exercem uma inibição tônica sobre as células granulares. Desta forma a perda da inibição combinada à aferência de estímulos normais leva a excessivos disparos das células granulares resultando em hiperexcitabilidade (SLOVITER, 1994; McNAMARA, 1994). Ainda um outro mecanismo proposto que parece contribuir para a hiperexcitabilidade e o estabelecimento da condição crônica, com crises recorrentes, seria a ocorrência de neurogênese ectópica de células granulares, em função das crises. Trata-se da formação de novas células que migrariam para outras regiões do giro denteado além da camada granular, como o hilo e a camada molecular, onde estabeleceriam conexões aberrantes responsáveis pela hiperexcitabilidade (PARENT et al., 1997; PARENT e LOWENSTEIN, 2002; PARENT, 2002; RIBAK e DASHTIPOUR, 2002).

Todas estas alterações são compatíveis com a esclerose hipocampal e promovem mudanças na circuitaria da formação hipocampal gerando uma condição permanente de hiperexcitabilidade e epileptogênese (SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

Estas observações referentes à perda neuronal no modelo experimental são condizentes com os dados obtidos através de mapeamento com imagem por ressonância magnética em humanos, demonstrando que a maioria dos pacientes com crises parciais complexas intratáveis apresenta esclerose temporal mesial devido à atrofia e perda celular na porção mesial da formação hipocampal (GUERREIRO et al., 2000). Assim, parece

fortemente sugestiva uma associação entre perda neuronal na formação hipocampal e o desenvolvimento de epilepsia do lobo temporal.

Atividade física, plasticidade cerebral e neuroproteção

Um moderno conceito de plasticidade cerebral foi formulado por Hebb (1949) que postulou: "quando uma célula excita outra repetidamente, ocorrem mudanças em uma ou ambas as células de modo que uma se torna mais eficiente em disparar a outra". Este conceito foi ampliado desde então, e o processo plástico cerebral relacionado a ele envolve diversos substratos anatômicos, tais como sinapses, neuritos e mesmo neurônios inteiros (Van PRAAG et al., 2000; COTMAN e BERCHTOLD, 2002). A plasticidade cerebral parece ser um fenômeno estreitamente relacionado com estímulos ambientais e experiência, e se revela como um processo dependente de atividade, uma vez que a estimulação ambiental elicia várias respostas plásticas no cérebro adulto (Van PRAAG et al., 2000).

A atividade física é tida como um importante estímulo para a plasticidade cerebral (KEMPERMANN et al., 2000). Diversos estudos recentes relatam relevantes efeitos positivos da prática de atividade física sobre o sistema nervoso tanto em humanos como em modelos animais. Dentre estes efeitos figuram o aumento da sobrevivência neuronal e da resistência cerebral a diferentes insultos, promoção da angiogênese, estímulo da neurogênese, fortalecimento da potenciação de longa duração no hipocampo, melhora da aprendizagem e memória e contribuição para a manutenção da função cognitiva durante o envelhecimento (ISAACS et al., 1992; GÓMEZ-PINILLA et al., 1998; KRAMER et al., 1999; Van PRAAG et al., 1999a; Van PRAAG et al., 1999b; YOUNG et al., 1999; MATTSON, 2000; CARRO et al., 2001; LAURIN et al., 2001; TREJO et al., 2001). Todos estes efeitos conferem à atividade física um grande potencial neuroprotetor. É importante destacar também que as

alterações estruturais e funcionais relacionadas com a estimulação ambiental, através da atividade física, envolvem especialmente a formação hipocampal, estrutura cerebral classicamente relacionada com plasticidade, aprendizagem e memória (SQUIRE, 1992).

Na mesma linha de argumentos, TREJO e colaboradores (2002) apontam o sedentarismo como fator de risco para doenças neurológicas que envolvem morte neuronal progressiva ou aguda. Adicionalmente, COLCOMBE et al. (2003) estabeleceram uma correlação entre o nível de condicionamento físico aeróbio e a redução da perda de tecido cerebral em humanos idosos atestando, desta forma, também para o potencial efeito neuroprotetor da atividade física.

Os mecanismos neurofisiológicos subjacentes às alterações morfo-funcionais observadas na formação hipocampal em decorrência da atividade física não estão completamente elucidados. No entanto, há fortes indícios do envolvimento de diversos fatores neurotróficos, moléculas que através de sinalização extracelular regulam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células nervosas durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. No organismo adulto postula-se que estes fatores neurotróficos estão envolvidos em vários processos moleculares da neuroplasticidade como crescimento de dendritos, sinaptogênese, neurogênese e ainda sobrevivência neuronal e resistência a insultos (LINDVALL et al., 1994; SCHINDER e POO, 2000; Van PRAAG et al., 2000). Diversos trabalhos relatam que a atividade física promove um aumento da expressão de vários fatores tróficos como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), o Fator de Crescimento do Nervo (NGF), o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF-2) e um fator periférico, o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I (IGF-I), elegendo-os como prováveis mediadores dos efeitos positivos da atividade física sobre o cérebro (NEEPER et al., 1996; GÓMEZ-PINILLA et al., 1998; CARRO et al., 2000; Van PRAAG et al., 2000; CARRO et al., 2001;

TREJO et al., 2001; COTMAN e BERCHTOLD, 2002; ANDERSON et al., 2002; ANG et al. 2003; VAYNMAN et al., 2004).

Atividade física e epilepsia

Além do referido efeito positivo do exercício físico sobre a perda neuronal, a neurogênese e a função cognitiva, notadamente mnemônica, foram relatados benefícios decorrentes desta intervenção ambiental diretamente em pacientes com epilepsia e em animais submetidos à epilepsia induzida.

Assim, pacientes com epilepsia podem colher benefícios da participação em um programa adequado de atividade física, respeitando-se as exigências especiais para esta população. Isto promoveria melhora da capacidade funcional orgânica geral, notoriamente creditada à prática regular de atividade física, além da tendência à redução da freqüência de crises e da conseqüente melhora psicológica, com diminuição dos níveis de depressão, condição muito comum entre pacientes com epilepsia (NAKKEN et al., 1990; ROTH et al., 1994). Nesta linha, um estudo realizado por ARIDA et al. (1999), utilizando o modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos, revelou efeitos benéficos do exercício físico diretamente sobre a epilepsia, não permitindo o aumento da freqüência das crises recorrentes, comum nesse modelo experimental. Em outro trabalho YOUNG et al. (1999), apresentaram dados demonstrando que o ambiente enriquecido, incluindo entre seus componentes uma roda de atividade, suprimiu as crises induzidas por cainato e protegeu contra lesão excitotóxica.

Num outro estudo que utilizou ratos com epilepsia induzida e submetidos a um ambiente enriquecido, também com acesso à roda de atividade, constatou-se que os animais que se exercitavam demonstraram melhor desempenho no teste do Labirinto Aquático, que

avalia a capacidade de memória espacial dos animais, além de aumentada taxa de neurogênese no giro denteado da formação hipocampal (FAVERJON et al., 2002).

Os mecanismos que sustentam os efeitos positivos creditados à atividade física em animais e humanos com epilepsia não são bem compreendidos. Atualmente as explicações se limitam a proposições que passam pelo envolvimento de sistemas de neurotransmissores, cujas concentrações cerebrais podem ser alteradas sob influência da atividade física, tais como a noradrenalina e o GABA, que influenciariam a atividade eletroencefalográfica epileptogênica (ARIDA et al.,1998; ARIDA et al., 1999). Outras evidências indicam que fatores neurotróficos podem afetar processos envolvidos na geração de crises. Acredita-se que tais fatores modificam a excitabilidade neuronal afetando a expressão de proteínas receptoras de glutamato e modulando canais de sódio e cálcio, alterando, desta forma, o limiar de crises (YOUNG et al., 1999).

Considerando os dados até aqui referidos, parece relevante testar a hipótese de que os benefícios da prática regular de atividade física - observados em animais e em humanos com epilepsia - possam derivar de sua propriedade neuroprotetora potencial. Nos quadros epilépticos, tal propriedade poderia contribuir para a manutenção das funções do hipocampo, amenizando a hiperexcitabilidade e a freqüência e severidade das crises.

Além disso, não há dados na literatura sobre o possível efeito neuroprotetor da atividade física no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em camundongos. Assim sendo, o presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da atividade física voluntária crônica sobre a perda neuronal no hipocampo e suas conseqüências na função mnemônica de camundongos submetidos a este modelo experimental.

2. Objetivos

Geral

Investigar o efeito da atividade física voluntária sobre as conseqüências do *status epilepticus* induzido pela pilocarpina em camundongos.

Específicos

1. Comparar o volume de atividade física voluntária de camundongos normais e de camundongos que tiveram *status epilepticus*.

2. Avaliar o efeito da atividade física voluntária sobre a memória espacial de camundongos que tiveram *status epilepticus*, por meio do teste do labirinto aquático de Morris.

3. Investigar se atividade física voluntária altera o padrão da lesão hipocampal de camundongos provocada pelo *status epilepticus*.

4. Avaliar o efeito da atividade física voluntária sobre a degeneração neuronal na formação hipocampal dorsal de camundongos provocada pelo *status epilepticus*.

5. Avaliar o efeito da atividade física voluntária sobre a proliferação celular no giro denteado de camundongos induzidos ao *status epilepticus*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com idade de dez a doze semanas, pesando entre 30 e 45 gramas, fornecidos pelo Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/MA, Campinas). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em condições controladas de luz, com ciclo 12:12 horas de claro-escuro, e temperatura (21^{o}C), recebendo água e ração *ad libitum.*

Os animais foram divididos em quatro grupos: saudável sedentário (SS), saudável corredor (SC), epiléptico sedentário (ES) e epiléptico corredor (EC), sendo cada grupo formado com 8 animais.

3.2 Indução do *status epilepticus*

Os animais pertencentes aos grupos ES e EC foram submetidos à indução do *status epilepticus* (SE). Em tal procedimento os camundongos receberam inicialmente metilescopolamina 0,01% na dose de 1mg/kg (s.c.), visando minimizar os efeitos colinérgicos periféricos da pilocarpina. Após trinta minutos foi administrada pilocarpina 4%, em dose única de 340 mg/kg (i.p.) e monitorada a ocorrência do *status epilepticus* em cada animal. O SE é definido como crises clônicas generalizadas e ininterruptas persistindo por um período mínimo de 30 minutos antes de seu término espontâneo (OLNEY et al.,1983; TURSKI et al., 1983b; CAVALHEIRO et al., 1991; SANABRIA E CAVALHEIRO, 2000).

Depois da administração das drogas os camundongos foram continuamente observados. Imediatamente após o início do SE os animais foram monitorados por um período de 6 horas. Somente aqueles que apresentaram SE ininterrupto durante 6 horas foram incluídos nos grupos experimentais.

Os animais pertencentes aos grupos SS e SC receberam duas doses de solução salina (NaCl 0,9%) em substituição às drogas aplicadas aos animais dos outros grupos experimentais.

3.3 Condições de atividade física

Imediatamente após a indução do SE os animais foram transferidos para gaiolas padrão de camundongo (29x18x12cm), sendo mantido um animal por gaiola. Os animais dos grupos sedentários (SS e ES) permaneceram nestas condições até o final do período de sobrevida. Quarenta e oito horas após a indução do SE, os animais dos grupos corredores (SC e EC) foram transferidos para gaiolas individuais, com dimensões de 40cm de comprimento, 32cm de largura e 16cm de altura, equipadas com uma roda de atividade para pequenos animais, à qual tinham livre acesso. Esta roda tinha curso livre e a atividade dos animais foi avaliada através de um conta-giros eletrônico instalado no eixo da mesma (Figura 1). O conta-giros estava conectado a um sistema de registro automatizado, desenvolvido especificamente para esse fim, sendo computado o volume da atividade física (VAF) dos animais durante 24 horas. De acordo com nossas prévias observações, esse tempo de espera (48 horas) é necessário para que o animal se recupere do quadro neurológico agudo que se instala com o *status epilepticus*. O período de permanência dos animais nas gaiolas experimentais foi de 28 dias. Após esse período, os camundongos foram submetidos ao Labirinto Aquático de Morris durante 5 dias, para testes de memória, e a seguir sacrificados e processados para histologia.

Figura 1. Os animais corredores (grupos SC e EC) foram mantidos por 28 dias em gaiolas com dimensões de 40cm x 32cm x 16cm, equipadas com uma roda de atividade, à qual tinham livre acesso. Esta roda tinha livre curso e a atividade dos animais foi avaliada através de um conta-giros eletrônico instalado no eixo da mesma.

3.4 Teste do Labirinto Aquático

Para avaliação da memória foi utilizado o Labirinto Aquático de Morris que consistiu de uma piscina circular com 120cm de diâmetro e 50cm de altura, preenchida com água a 26±1°C até 45 cm. Para que a água ficasse opaca foram acrescentados 30ml de tinta branca não tóxica. Uma plataforma circular de acrílico, com 9 cm de diâmetro, foi colocada a aproximadamente 1,5 cm abaixo da superfície da água (Figura 2)

Uma câmara de vídeo (Sony, TR818), posicionada a 2,5 metros acima do centro da piscina, foi acoplada a um sistema de gravação em fita para o registro e posterior avaliação do comportamento do animal. Os equipamentos para o registro, composto por um monitor de vídeo e um gravador de fita VHS (Panasonic, NV-HD625), foram montados em uma sala adjacente ao labirinto aquático para acompanhamento dos testes. Nas quatro paredes da sala de teste foram distribuídas diferentes figuras (círculo, quadrado, triângulo e estrela) para servirem de pistas espaciais.

Para os testes de memória de referência espacial a plataforma permaneceu numa posição fixa num dos quadrantes da piscina ao longo de todo o período de testes. O animal foi colocado na água junto à borda da piscina, com o focinho voltado para a mesma, e liberado para nadar livremente até encontrar a plataforma; este procedimento caracteriza uma tentativa. O animal realizou quatro tentativas por sessão, sendo uma sessão por dia. Em cada tentativa o animal foi liberado em pontos de partida diferentes e aleatórios, porém aproximadamente eqüidistantes com relação à plataforma. O animal deveria encontrar a plataforma em 2 minutos no máximo, onde permaneceria por 10 segundos e, então era retirado pelo experimentador. Caso o animal não encontrasse a plataforma em 2 minutos, ele era colocado sobre a mesma pelo experimentador. O tempo despendido pelo animal

entre sua liberação e o momento em que encontrava a plataforma foi categorizado como a latência e empregado como um índice de desempenho do animal no teste. A latência foi cronometrada manualmente por dois experimentadores independentes de forma simultânea à realização das tentativas. Estes dados foram confirmados posteriormente pela análise dos vídeos. Após cada sessão de testes os animais foram secos com toalha de papel absorvente e recolocados em suas respectivas gaiolas.

Ao final dos quatro dias de teste para memória de referência espacial, foi realizado um teste para avaliação da retenção da memória (*Probe Test*). Para isso a plataforma foi removida do labirinto e avaliou-se o número de vezes que o animal penetrava na região ocupada pela mesma durante o teste para memória de referência espacial. Esta região foi definida como uma área circular de diâmetro três vezes maior que o da plataforma, denominada contador crítico. A duração do teste foi de 3 minutos, sendo que este tempo foi subdividido em três períodos de 1 minuto cada. A freqüência de entradas do animal no contador crítico foi obtida pela análise posterior dos vídeos, desenhando-se na tela do monitor um círculo de diâmetro correspondente ao contador; e forneceu informações sobre a precisão da resposta de busca.

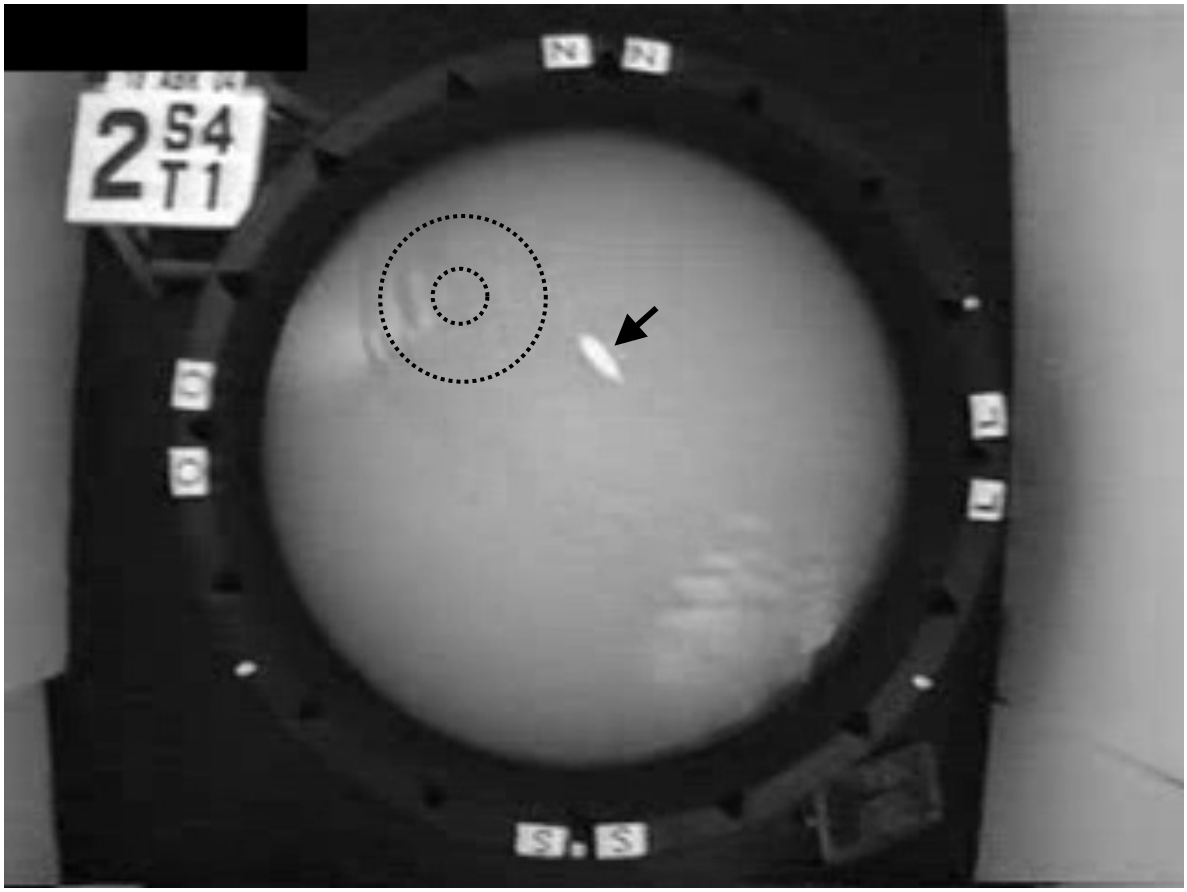

Figura 2. O Labirinto Aquático de Morris consistiu de uma piscina circular com 120cm de diâmetro e 50cm de altura, preenchida com água opaca até 45 cm. Uma plataforma circular de acrílico (representada na figura pelo círculo pequeno) com 9 cm de diâmetro, foi colocada a aproximadamente 1,5 cm abaixo da superfície da água. O círculo maior representa a área correspondente ao contador crítico. A seta indica o camundongo em teste.

3.5 Análise histológica e quantitativa

3.5.1 Perfusão e obtenção dos cortes histológicos

Após os testes comportamentais e o período correspondente de sobrevida, 5 animais de cada grupo foram anestesiados com Pentobarbital sódico 3% (0,1 ml/20g, i.p.), submetidos à toracotomia e perfundidos transcardiacamente com 100 ml de solução heparinizada (0,2 ml/ 500 ml de salina) de cloreto de sódio 0,9%, seguido de 120 ml de solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,40), com auxílio de uma bomba de perfusão (Masterflex). Após este procedimento, os animais foram eviscerados e mantidos em geladeira com os encéfalos dentro dos respectivos crânios. Os mesmos foram retirados após 24 horas e mergulhados em uma solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,40), onde permaneceram por 12 horas até o processamento de inclusão em parafina (Paraplast®, Merck)

Foram obtidos cortes histológicos com 8µm de espessura, de orientação coronal, da região do encéfalo entre 1,00mm e 3,50mm posterior ao bregma (FRANKLIN and PAXINOS, 1997), empregando-se micrótomo Leica (modelo RM2125RT). Os cortes foram recolhidos diretamente sobre lâminas gelatinizadas, coletando-se três cortes seqüenciais, dispostos cada um em uma lâmina diferente, e desprezando-se os dez cortes subseqüentes. Este procedimento foi realizado sucessivamente até que se completassem cinco cortes por lâmina. Desta forma foram obtidas três séries distintas de cortes histológicos. A primeira série foi submetida à reação histoquímica para Fluoro Jade B, para a avaliação dos neurônios em degeneração na formação hipocampal; a segunda, à coloração de Nissl com violeta de cresila, para a avaliação da perda neuronal na formação hipocampal; e a terceira,

à reação imunoistoquímica para o antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA) para a avaliação da proliferação celular no giro denteado.

3.5.2 Coloração de Nissl com violeta de cresila e avaliação da perda neuronal

Para coloração de Nissl com violeta de cresila seguiu-se o protocolo descrito por ONISHI (1999), com algumas adaptações. Inicialmente os cortes foram desparafinizados através de duas passagens em xilol por 3 minutos cada. A seguir foram hidratados em uma série de álcoois: etanol 100%, 95%, e 70%, por 3 minutos cada, e finalmente deixadas em água destilada por 3 minutos. Os cortes foram então imersos em uma solução de violeta de cresila, mantida a 45°C, por 9 minutos. Após a etapa de coloração, os cortes foram desidratados através de passagens rápidas em água destilada seguida de outra em etanol 70% e transferidos para etanol 95% por 3 minutos e logo depois em três passagens em etanol 100% por 3 minutos cada. Os cortes foram então diafanizados em xilol através de duas passagens de 5 minutos cada, e logo em seguida as lâminas foram montadas com Entellan (Merck).

A coloração de Nissl foi utilizada para a avaliação do grau de perda neuronal na camada piramidal das regiões CA1 e CA3 do hipocampo e no hilo e camada granular do giro denteado. Essa avaliação foi realizada na porção da formação hipocampal dorsal compreendida entre 1,58 mm e 1,79 mm posterior ao bregma, em ambos os hemisférios. Foram utilizados três cortes seriais para cada animal distanciados 96 µm entre si. Atribuiu-se um escore para cada uma das regiões acima referidas em ambos hemisférios dos três cortes, conforme a tabela 1. Os valores dos escores de cada região foram ordenados para o cálculo da média que correspondeu ao escore final da região analisada em cada animal. A avaliação do grau de perda neuronal foi realizada utilizando-se microscópio Nikon

Optiphot 2, sob objetiva de 40X. A identificação do grupo experimental ao qual pertenciam os espécimes analisados não era do conhecimento do experimentador. Os cortes dos animais pertencentes ao grupo saudável sedentário (SS) tinham sua identidade conhecida do experimentador, pois foram utilizados individualmente como referência para caracterizar o padrão de 100% de neurônios saudáveis (escore 0); e eram analisados sempre e imediatamente antes da análise dos cortes pertencentes aos animais dos outros grupos experimentais (BORGES et al., 2003).

Escore	***Percentual de neurônios saudáveis (núcleo e nucléolo evidentes)***
0	100%
1	> 75% e < 100%
2	> 50% a 75%
3	> 25% a 50%
4	≤ 25%

Tabela 1. Escores utilizados na avaliação do grau de lesão neuronal.

3.5.3 Histoquímica para Fluoro Jade B

Para marcação com Fluoro Jade B seguiu-se o protocolo descrito por SCHMUED e HOPKINS (2000), com algumas adaptações. Os cortes foram desparafinizados, através de duas passagens em xilol por 3 minutos cada, e foram seqüencialmente imersos em NaOH 1%, em etanol 80% (5 minutos), e em etanol 70% (2 minutos). A seguir foram transferidos para uma solução de permanganato de potássio 0,06% e mantidos por 10 minutos sob agitação constante. Após este procedimento, os cortes foram mergulhados em água destilada (2 minutos) e transferidos para uma solução de Fluoro Jade B 0,0004% (20 minutos). Após esta etapa de marcação, os cortes foram mergulhados por três vezes em

água destilada, durante um minuto cada. Imediatamente depois as lâminas foram transferidas para estufa a 50°C, por 40 minutos. Finalmente as lâminas foram imersas em xilol durante 1 minuto e montadas com Entellan (Merck).

O marcador Fluoro Jade B foi utilizado para avaliação quantitativa de neurônios em degeneração nas seguintes regiões da formação hipocampal: camada piramidal das regiões CA1 e CA3 do hipocampo e hilo e camada granular do giro denteado. Os cortes utilizados para esta avaliação eram imediatamente adjacentes àqueles corados com violeta de cresila, destinados a avaliação da perda neuronal (vide item 3.5.2).

O número de neurônios Fluoro Jade B positivos foi contado em ambos os hemisférios e por duas vezes em cada espécime; sem o conhecimento do grupo ao qual o mesmo pertencia. A média das duas contagens correspondeu ao número total de neurônios contados em cada uma das regiões acima mencionadas. Foi utilizado um microscópio Nikon Optiphot 2, equipado com um conjunto de filtros para fluoresceína (Nikon B-2A) e uma vídeo câmera (Leica DC 300F) para a captura e digitalização das imagens. As imagens foram capturadas sob objetiva de 40 vezes e sobre as mesmas foram adicionados, aleatoriamente, 36 quadrados de 30 x 30 micrômetros cada um, em cada uma das regiões da formação hipocampal avaliadas (camada piramidal das regiões CA1 e CA3 do hipocampo e hilo e camada granular do giro denteado) em cada animal. Foram contados todos os neurônios marcados com Fluoro Jade B, cujos corpos celulares ocupavam o interior do quadrado que delimitava o campo amostrado, ou que tocavam as linhas horizontal superior e/ou vertical direita deste (GUNDERSEN et al., 1988).

3.5.4 Imunoistoquímica para o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA)

Para marcação com PCNA os cortes foram inicialmente desparafinizados através de três passagens em xilol, várias lavagens em cada uma. A seguir foram hidratados em uma série de álcoois: etanol 100%, por três vezes, etanol 80% e etanol 50%, várias lavagens em cada um. Finalmente deixados em água destilada por 5 minutos. Os cortes passaram então pelo bloqueio da peroxidase endógena através de três lavagens de três minutos cada em H_2O_2, 10%. Nova lavagem de 5 minutos em água destilada. Depois da lavagem os cortes foram submetidos à recuperação antigênica por 30 minutos em panela a vapor a 95°C com tampão citrato (10mM; pH 6,0). Novamente foram lavados em água destilada por 5 minutos. Finalmente os cortes foram incubados em estufa a 37ºC por 30 minutos e depois 12 horas em geladeira (4°C) com anticorpo monoclonal contra PCNA (diluição 1:150; DAKO, cat. nº M0879; Carpinteria, CA). Após esta etapa os cortes foram lavados por três vezes, 3 minutos cada, no agitador, em tampão fosfato salina (PBS). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário (Sistema Envision Peroxidase – DAKO; Carpinteria, CA) por 1 hora em estufa a 37°C. Após a incubação os cortes foram imersos em uma solução de diaminobenzidina (DAB; 0,5 mg/ml; Sigma). Mais uma vez se realizou uma lavagem em água destilada por 5 minutos e após esta os cortes foram contra-corados com hematoxilina. Repetiu-se a lavagem de 5 minutos em água destilada acrescentando-se hidróxido de amônia por 10 segundos; e mais outra lavagem em água destilada por 5 minutos. Finalmente as lâminas foram imersas em álcool 100% por três vezes e em xilol por três vezes e montadas com Entellan (Merck).

A marcação com PCNA foi utilizada para avaliação quantitativa da proliferação celular nas seguintes regiões do giro denteado: camada granular, fronteira hilo-camada granular e camada molecular. Os cortes utilizados para esta avaliação foram imediatamente

adjacentes àqueles corados com violeta de cresila, destinados à avaliação da perda neuronal (vide item 3.5.2).

Foi realizada a contagem absoluta do número de células PCNA positivas, por duas vezes, nas áreas mencionadas acima e sem o conhecimento do grupo experimental ao qual o espécime pertencia. A média das duas contagens correspondeu ao número total de células contadas. As contagens foram realizadas utilizando-se microscópio Leica (DMLB), sob objetiva de 40X.

3.6 Testes estatísticos

Os valores do VAF obtidos ao longo do período de 28 dias foram avaliados estatisticamente através da Análise da Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do Teste Tukey-Kramer. A comparação dos valores do VAF diário médio computado ao final do período de 28 dias foi realizada através do Teste t não pareado corrigido por Welch.

A avaliação estatística dos valores da latência registrados no labirinto aquático de Morris foi realizada através da Análise da Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do Teste de Tukey-Kramer para comparação entre os grupos. A comparação dos valores da latência registrados na primeira e na quarta sessões do labirinto aquático de Morris em cada grupo foi realizada através do Teste t pareado.

A avaliação estatística dos valores da freqüência de entradas no contador crítico obtidos com o *Probe Test* foi realizada através da Análise da Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do Teste de Tukey-Kramer para comparação entre os grupos. A

comparação dos valores da freqüência de entradas no contador crítico no 1º e no 3º minutos em cada grupo foi realizada através do Teste t pareado.

Os valores obtidos na avaliação da perda neuronal foram analisados estatisticamente através do Teste de Mann Whitney. Os resultados da contagem do número de neurônios marcados com Fluoro-Jade B foram analisados através do Teste t não pareado corrigido por Welch. Os resultados da contagem do número de neurônios imunorreativos para PCNA foram processados através da Análise da Variância (ANOVA) de uma via seguida do Teste de Tukey-Kramer.

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad InStat (versão 3.00).

4. Resultados

4.1 Alterações comportamentais induzidas pela administração de pilocarpina

Após 5 a 10 minutos da administração da pilocarpina os animais passaram a apresentar alterações comportamentais características que culminaram no *status epilepticus* (SE). Inicialmente os camundongos apresentaram acinesia seguida de agitação do corpo ao redor do eixo crânio-caudal (*wet dog shakes)*, movimentos atáxicos e automatismos mastigatórios acompanhados por salivação. Esses comportamentos progrediram para tremores generalizados, clonia nas extremidades do corpo, breves crises convulsivas seguidas por um comportamento em que o camundongo ficava em pé, apoiado nas patas posteriores e apresentando clonia nas patas anteriores (*rearing*), e queda. Finalmente, os animais passaram a apresentar crises clônicas generalizadas e ininterruptas características do SE. O intervalo de tempo entre a aplicação da pilocarpina e o início do SE foi de 39,5±4,03 minutos (média ± E.P.M.; n=32). Tais crises mantiveram-se com a mesma intensidade por pelo menos 30 minutos e diminuíram gradualmente ao longo do período de monitoramento (6 hs.), podendo se tornar parciais porém sem interrupção.

4.2 Volume de atividade física (VAF)

Todos os animais saudáveis (SC) e epiléticos (EC) mantidos nas gaiolas com roda de atividade acessaram voluntariamente a mesma e tal acesso ocorreu predominantemente no período noturno, compreendido entre 19:00 e 7:00 horas. Contudo, apresentaram diferenças no volume de atividade física diária (Figuras 3 e 4)

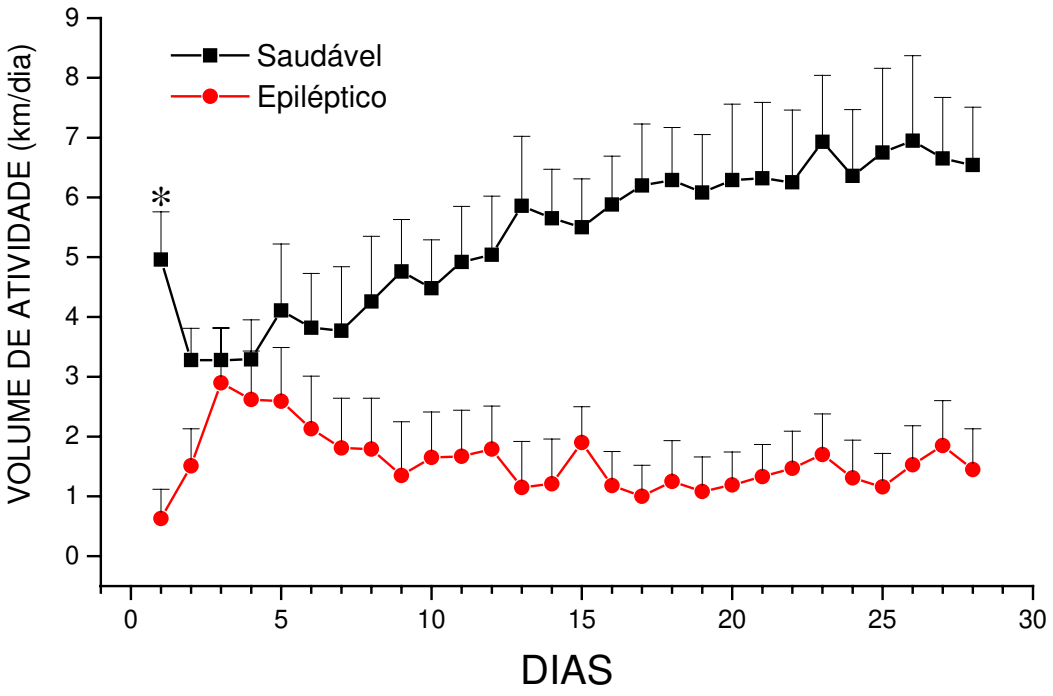

Figura 3. Valores do volume de atividade física diária (VAF) dos animais saudáveis e epilépticos corredores. Notar que o valor do VAF durante o primeiro dia foi significativamente inferior nos animais epilépticos (* p<0,01). Notar também que no 3º dia os valores do VAF foram semelhantes em ambos grupos. Notar ainda que após o 3º dia os animais epilépticos apresentaram uma inicial redução do VAF seguida da estabilização do seu valor, contrariamente ao observado nos animais saudáveis. Os valores estão expressos em média±E.P.M.

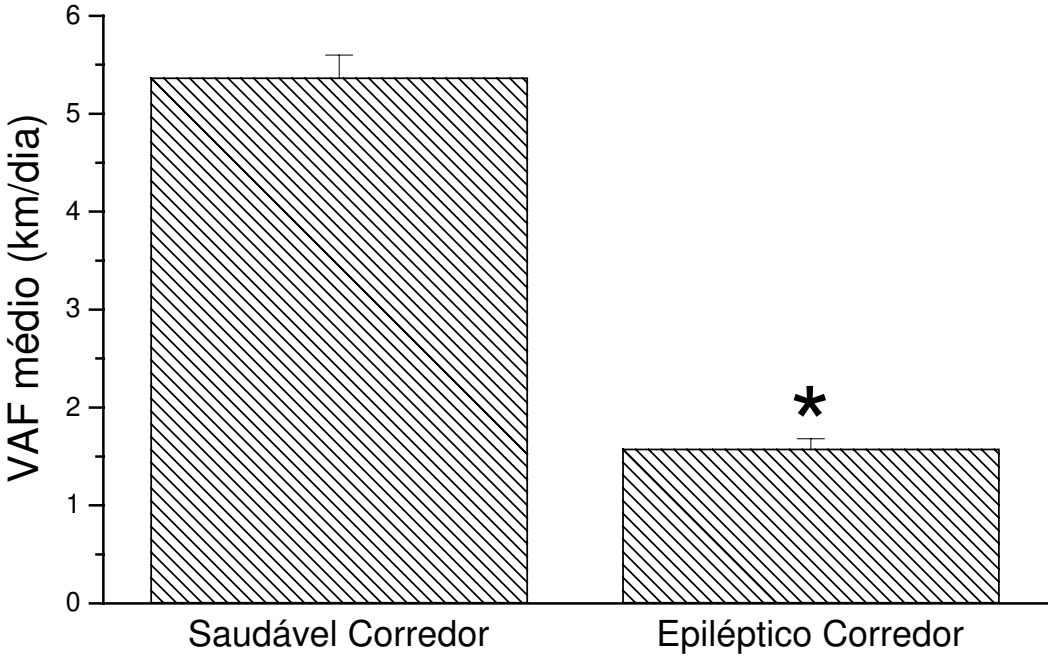

Figura 4. Média do volume de atividade física diária (VAF) dos animais saudáveis e epilépticos corredores. Notar que o VAF médio diário computado ao final do período de 28 dias foi significativamente inferior no grupo de animais epilépticos (* p<0,0001). Os valores estão expressos em média±E.P.M.

Os animais SC tiveram um aumento gradual do VAF diário na roda de corrida ao longo do período de 28 dias. Nas primeiras 24 horas o VAF foi de 4,96±0,80 km/dia, caindo para 3,29±0,66 km/dia ao final das seguintes 72 horas, e passando a aumentar gradativamente até alcançar o valor de 6,54±0,97 km/dia nas últimas 72 do período experimental. O VAF médio do grupo SC, considerando-se todo o período de 28 dias, foi de 5,37±0,22 km/dia (n=8).

Por sua vez, os animais EC apresentaram um VAF significativamente inferior (0,63±0,49 km/dia) aos animais SC (4,96±0,80 km/dia; $F_{(6,42)}$=10,729 p<0,001) nas primeiras 24 horas. Interessantemente, durante as seguintes 48 horas houve um acentuado aumento do VAF, que atingiu o valor de 2,90±0,90 km/dia. Este pico de atividade foi seguido de uma lenta diminuição até o valor de 1,35±0,89 km/dia no 9º dia, que se manteve até o final do período de 28 dias (1,45±67 km/dia). O VAF médio do grupo EC, considerando todo o período, foi de 1,54±0,09 km/dia (n=8) e significativamente inferior ao registrado nos animais do grupo SC (p<0,0001).

4.3 Teste do Labirinto Aquático

4.3.1 Memória de referência espacial

A avaliação da memória de referência espacial através do Teste do Labirinto Aquático de Morris revelou que os animais dos grupos saudáveis, sedentários (SS) e corredores (SC), apresentaram o melhor desempenho dentre todos os grupos ao longo dos 4 dias de teste. A latência média destes dois grupos diminuiu gradativamente e apresentou diferenças significativas entre a 1ª e última sessão para ambos grupos (SS: 1ª sessão=76,3±4,7; 4ª sessão=35,8±5,1; p<0,002. SC: 1ª sessão=97,4±9,6; 4ª sessão=24,6±6,6; p<0,001). Não houve diferenças significativas entre SC e SS, no entanto, a partir da 2ª sessão os animais corredores tenderam a apresentar menores valores de latência que os animais sedentários. Por sua vez, os animais

epilépticos, sedentários (ES) e corredores (EC), apresentaram latências semelhantes entre si nas três primeiras sessões. Contudo, à semelhança do ocorrido com os animais saudáveis, os animais epilépticos corredores tenderam a apresentar melhor desempenho que os animais epilépticos sedentários. Esta tendência se tornou evidente na 4ª sessão, onde a latência dos animais EC (77,5±13,2) foi significativamente menor que a dos animais ES (117,4±2,6; $F_{(15,105)}$=12,953; p<0,05). Por outro lado, apenas para os animais corredores (EC) houve diferença significativa entre as latências registradas na 1ª e a 4ª sessões (1ª sessão=108,3±5,8; 4ª sessão=77,5±13,2; p<0,05) (Figura 5).

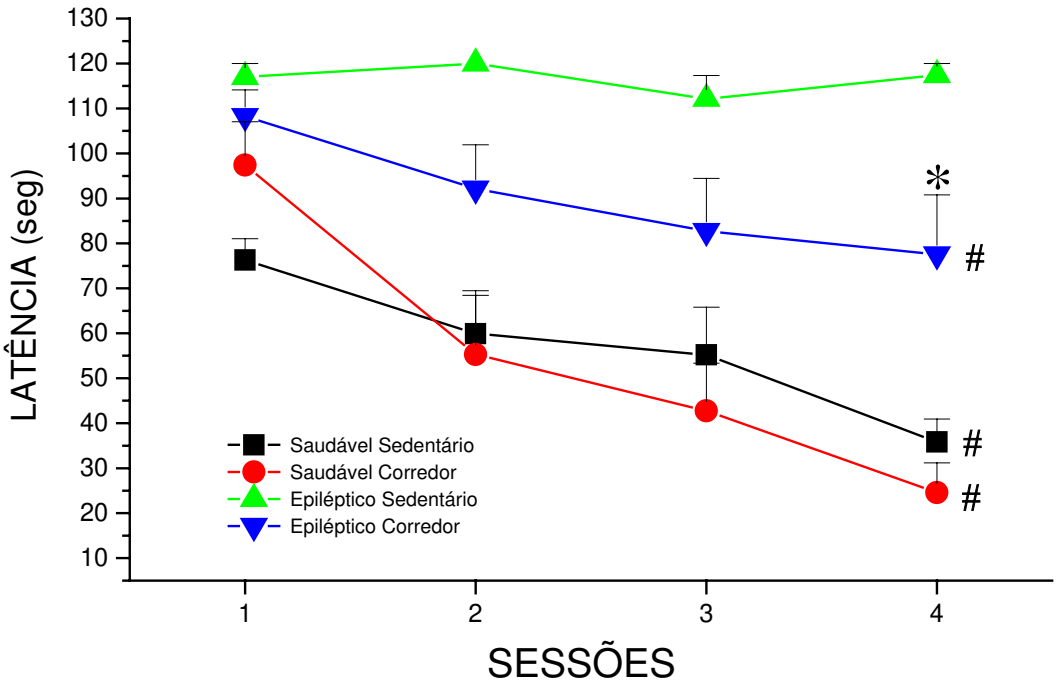

Figura 5. Valores médios da latência para encontrar a plataforma. Notar que os animais epiléticos corredores apresentaram latência significativamente menor que os animais epilépticos sedentários na sessão 4 do teste do labirinto aquático (* p<0,05). Notar ainda que houve gradual diminuição da latência dos grupos SS, SC e EC ao longo das sessões. O valor da latência na sessão 4 foi significativamente inferior quando comparada à registrada na sessão 1 nos três grupos (# p<0,05). Os valores estão expressos em média±E.P.M.

4.3.2 *Probe Test*

O *Probe Test* avaliou a retenção da memória espacial através da freqüência de entradas dos animais no contador crítico durante o 1º, 2º, e 3º minutos. Durante o 1º minuto os animais saudáveis corredores entraram um número significativamente maior de vezes no contador crítico que os animais epiléticos sedentários (SC=8,6±1,2; ES=1,5±0,7; $F_{(11,77)}$=7,798; p<0,001) e epiléticos corredores (SC=8,6±1,2; EC=3,9±1,3; $F_{(11,77)}$=7,798; p<0,05). Por sua vez, os animais saudáveis sedentários apresentaram uma freqüência de entradas maior apenas que a dos animais epiléticos sedentários (SS=5,9±1,4; ES=1,5±0,7; $F_{(11,77)}$=7,798; p<0,05). Por outro lado, embora não tenham sido detectadas diferenças estatisticamente significativas entre a freqüência de entradas dos animais dos grupos saudáveis no 1º minuto, os animais corredores tenderam a cruzar um maior número de vezes os limites do contador crítico (SC=8,6±1,2; SS=5,9±1,4). Esse mesmo padrão de comportamento foi observado entre os grupos epilépticos. Ou seja, os animais corredores mostraram maior tendência a entrar no contador crítico que os animais sedentários no 1º minuto (EC=3,9±1,3; ES=1,5±0,7).

Na fase final do teste observou-se que em ambos os grupos de animais corredores (SC e EC) a freqüência de entradas no contador crítico apresentou queda entre o 1º minuto e o 3º minuto, sendo estatisticamente significante para o grupo SC (p<0,02) (Figura 6).

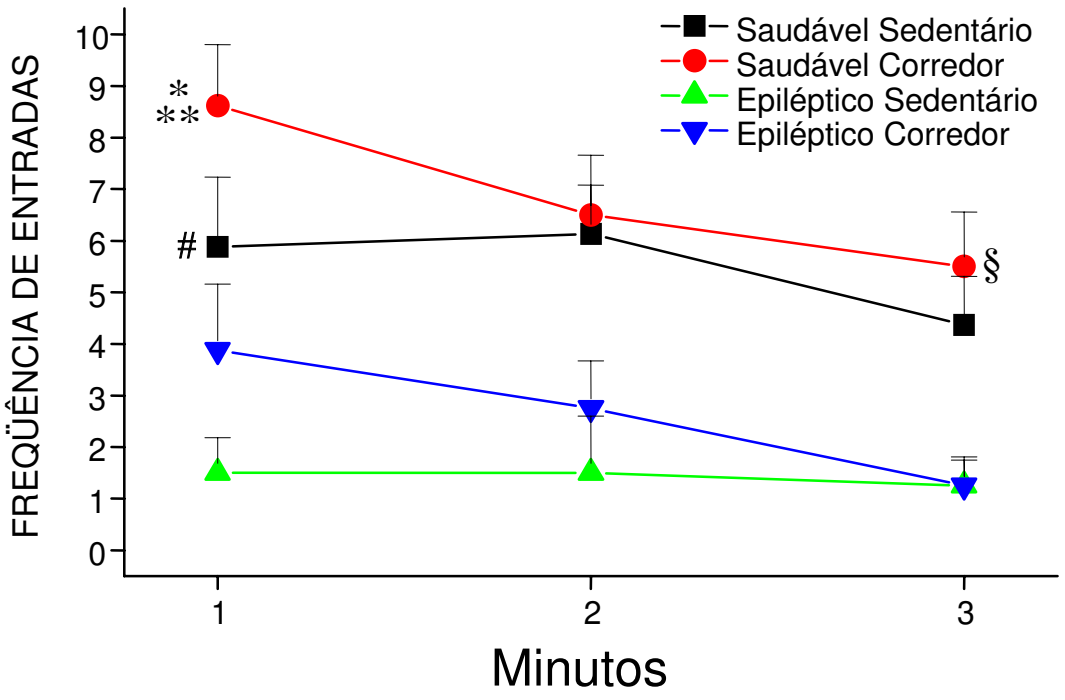

Figura 6. Freqüência de entradas no contador crítico durante o *probe test*. Notar que no 1º minuto os animais saudáveis corredores apresentaram freqüência de entradas significativamente maior que os animais epilépticos corredores (*p<0,05) e epilépticos sedentários (**p<0,001). Notar também que a freqüência de entradas dos animais saudáveis sedentários foi significativamente maior que dos animais epilépticos sedentários (#p<0,05), porém não diferiu daquela registrada para os animais epilépticos corredores. Notar ainda que em ambos grupos de animais corredores, saudáveis (SC) e epilépticos (EC), a freqüência de entradas apresentou queda entre o 1º e o 3º minuto, sendo estatisticamente significante para o grupo SC (§p<0,02). Os valores estão expressos em média±E.P.M.

4.4 Análise histológica

4.4.1 Coloração de Nissl e avaliação da perda neuronal

A coloração de Nissl evidenciou nos animais dos grupos ES e EC lesões na formação hipocampal caracterizadas por perda de neurônios na camada granular e hilo do giro denteado e na camada piramidal das regiões CA1 e CA3. Nestas mesmas regiões pôde-se observar a presença de neurônios retraídos e com núcleos intensamente corados. Nos animais dos grupos SS e SC não foram observados sinais de lesão em qualquer das regiões avaliadas na formação hipocampal.

4.4.1.1 Giro denteado

A camada granular do giro denteado foi a região que apresentou menor grau de lesão dentre todas as regiões avaliadas em ambos grupos. De fato, apenas um animal do grupo ES apresentou perda neuronal. À lesão desse animal foi atribuído o escore 2 e o valor da média para esse grupo foi igual a 0,4±0,4 (n=5). No grupo EC três animais apresentaram lesão com escore 2 ou 1, e o valor da média do grupo foi igual a 1±0,4 (n=5). No entanto, a diferença entre os escores dos grupos ES e EC não foi estatisticamente significante.

Por sua vez, o hilo do giro denteado apresentou os maiores escores de lesão entre todas as regiões avaliadas. No grupo ES os animais apresentaram escores entre 2 e 3,5, sendo que a média foi igual a 2,8±0,3. Por outro lado, os animais do grupo EC tiveram lesões de menor intensidade, com escore entre 1 e 3, e a média desse grupo foi igual a 2±0,3. Contudo, a diferença entre os escores registrados nos grupos ES e EC não foi estatisticamente significante

4.4.1.2 Camada piramidal

Na região CA1 o escore da lesão variou entre 0 e 3 e a média foi igual a 1±0,5 nos animais do grupo ES. No grupo EC os animais apresentaram lesões com escores entre 0 e 4, e a média foi igual a 1,6±0,7. O grau de lesão observado na camada piramidal da região CA3 apresentou escore 2 em todos os animais do grupo ES. Por sua vez, nos animais do grupo EC a intensidade da lesão variou entre os escores 0 e 4, sendo a média igual a 1,6±0,7.

A análise estatística revelou que não houve diferença significativa entre os escores registrados nos grupos ES e EC em ambas regiões CA1 e CA3 (Figuras 7, 8 e 9).

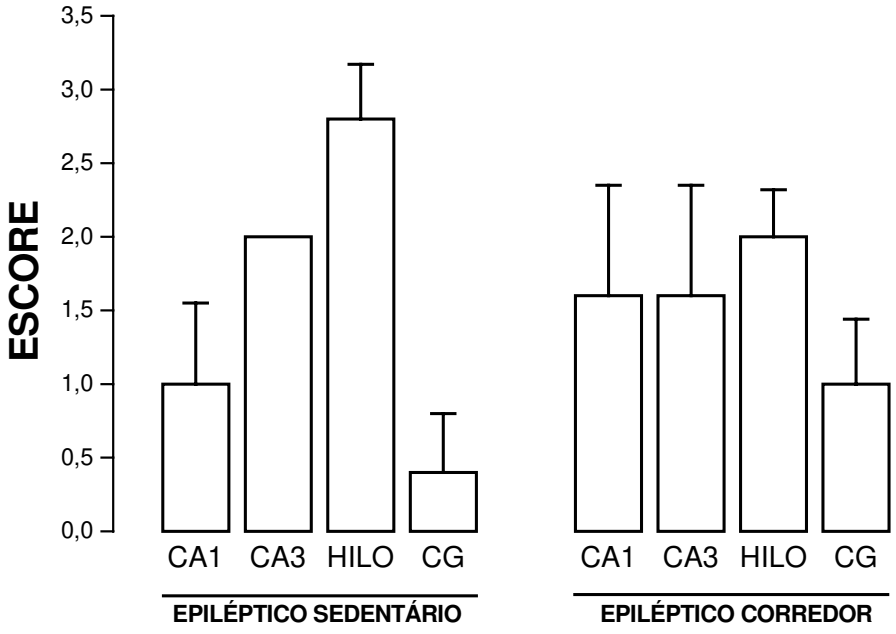

Figura 7. Escores atribuídos à lesão histológica evidenciada pela coloração com violeta de cresila nas regiões da formação hipocampal avaliadas. CG – camada granular. Os valores estão expressos em média±E.P.M. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos em quaisquer das estruturas analisadas.

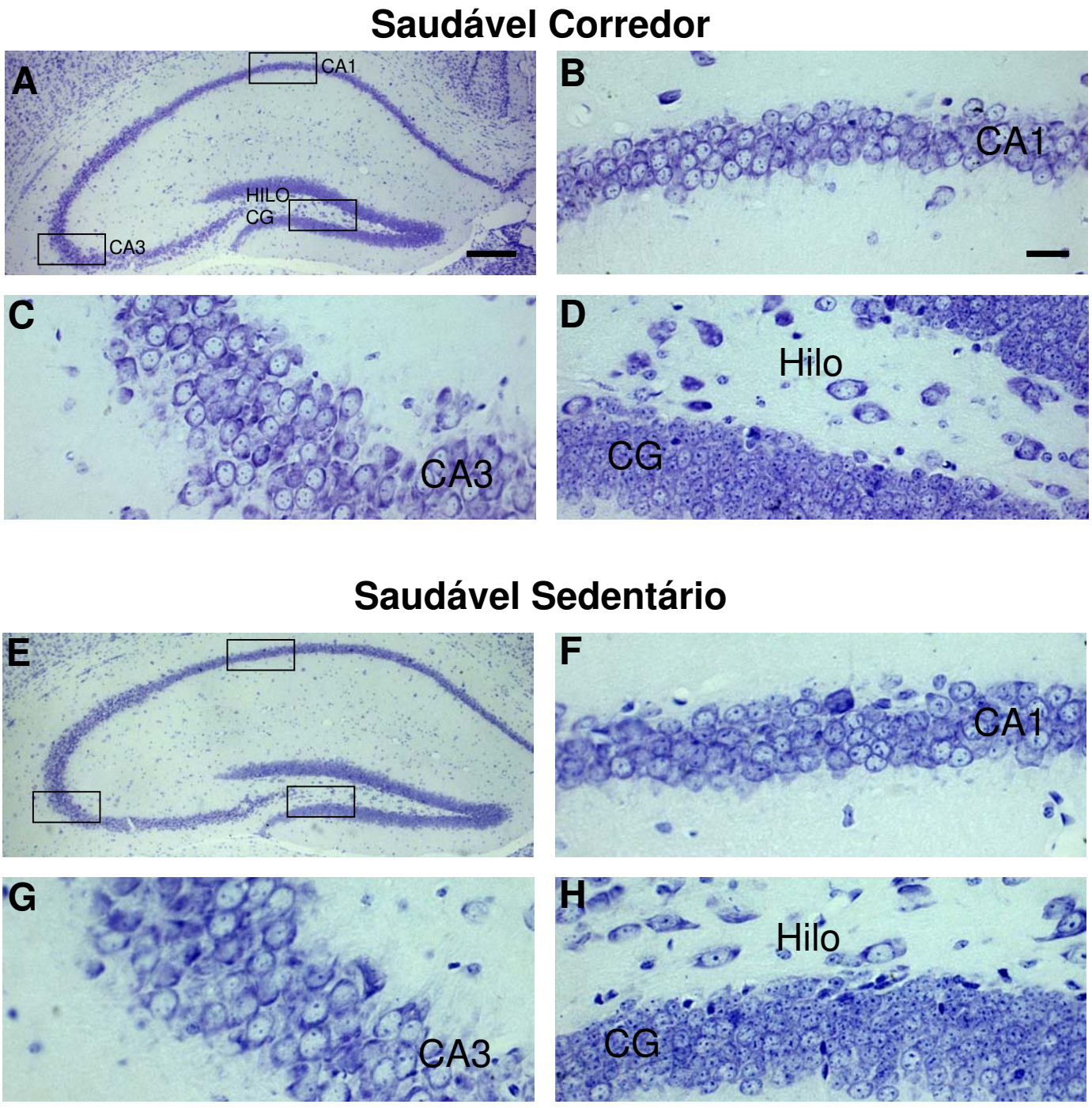

Figura 8. Avaliação da perda neuronal. A-D: Formação Hipocampal de animal do grupo Saudável Corredor. A – Imagem panorâmica da formação hipocampal. B, C e D – Detalhes das regiões CA1, CA3 e giro denteado (hilo e camada granular), respectivamente, mostrando aspecto histológico normal, sem sinais de perda celular. E-H: Formação Hipocampal de animal do grupo Saudável Sedentário. E – Imagem panorâmica da formação hipocampal. F, G e H – Detalhes das regiões CA1, CA3 e giro denteado (hilo e camada granular), respectivamente, mostrando aspecto histológico normal, sem sinais de perda celular. A e E, barra=500µm; B-D e F-H, barra=50µm. (Violeta de Cresila)

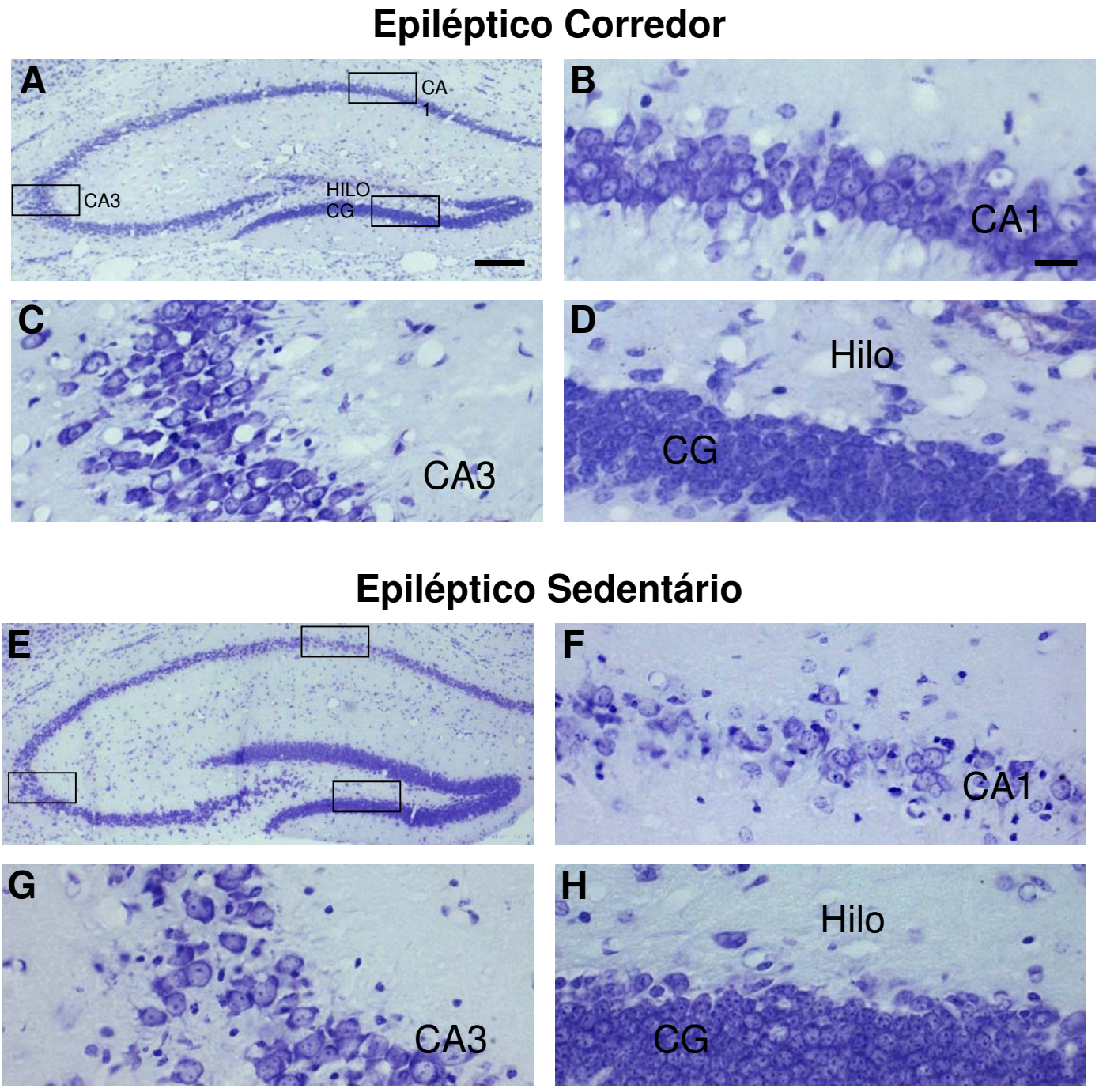

Figura 9. Avaliação da perda neuronal. A-D: Formação Hipocampal de animal do grupo Epiléptico Corredor. A – Imagem panorâmica da formação hipocampal. B e C – Detalhes das regiões CA1 e CA3, respectivamente, mostrando a baixa densidade celular no local da lesão. D – detalhe do giro denteado mostrando a região da lesão, evidenciada pela baixa densidade celular no hilo, e camada granular relativamente preservada. E-H: Formação Hipocampal de animal do grupo Epiléptico Sedentário. E – Imagem panorâmica da formação hipocampal; F e G – Detalhes das regiões CA1 e CA3, respectivamente, mostrando a baixa densidade celular no local da lesão. H – detalhe do giro denteado mostrando a região da lesão, evidenciada pela baixa densidade celular no hilo, e camada granular relativamente preservada. A e E, barra=500µm; B-D e F-H, barra=50 µm. (Violeta de Cresila)

4.4.2 Detecção de neurônios marcados pelo Fluoro Jade B

O processamento histoquímico para Fluoro Jade B dos cortes imediatamente adjacentes àqueles corados com cresil violeta revelou a presença de neurônios intensamente fluorescentes na formação hipocampal dos animais dos grupos ES e EC. Estes neurônios estavam presentes na camada granular e hilo do giro denteado e na camada piramidal das regiões CA1 e CA3. Contudo, em cada uma dessas estruturas o número de neurônios Fluoro Jade B positivo (FJB+) variou amplamente entre os animais do mesmo grupo.

Por sua vez, os animais dos grupos SS e SC não possuíam neurônios Fluoro Jade B positivo (FJB+) em nenhuma das estruturas avaliadas na formação hipocampal.

4.4.2.1 Giro denteado

Em ambos grupos ES e EC apenas um animal de cada um deles apresentou neurônios FJB+ na camada granular do giro denteado. Contudo, no animal do grupo EC o número de neurônios FJB+/mm^2 foi cerca de 10 vezes maior (1.821) que o verificado no animal do grupo ES (185). Esses mesmos animais apresentaram neurônios FJB+ no hilo do giro denteado, porém o número destes foi aproximadamente 4 vezes superior (1.451) no animal do grupo ES quando comparado ao registrado no animal do grupo EC (340). Outros dois animais, um de cada grupo, apresentaram igual número de neurônios FJB+/mm^2 (463) no hilo do giro denteado.

Considerando-se separadamente cada uma das regiões do giro denteado, os testes estatísticos não acusaram diferenças significativas quanto à média do número de neurônios FJB+/mm^2 entre os grupos ES e EC.

4.4.2.2 Camada piramidal

A análise da camada piramidal mostrou que todos os animais dos grupos ES e EC que apresentaram neurônios FJB+ na camada granular e no hilo do giro denteado também possuíam neurônios FJB+ em CA3 e/ou CA1. Porém, em cada um dos grupos houve um animal em cada que exibia neurônios FJB+ em CA3 sem, contudo, os possuir nas regiões do giro denteado referidas acima. Destaca-se que a presença de neurônios FJB+ em CA1 ocorreu em dois animais de cada grupo, sendo que no grupo EC eram os mesmos que possuíam esses neurônios em CA3. Interessantemente, no grupo ES um dos animais que exibia neurônios FJB+ em CA1 não os possuía em CA3, porém os possuía na camada granular e no hilo do giro denteado.

A contagem dos neurônios FJB+/mm^2 na camada piramidal mostrou que o número total de neurônios FJB+/mm^2 na região CA1 foi maior nos animais do grupo ES (6.636) quando comparada com a do grupo EC (2.778). Por outro lado, o número total desses neurônios presentes em CA3 dos animais dos ES (2.840) e EC (2.809) foi semelhante.

Considerando-se separadamente cada uma das regiões da camada piramidal, os testes estatísticos não acusaram diferenças significativas quanto à média do número de neurônios FJB+/mm^2 entre os grupos ES e EC (Figura 10, 11 e 12).

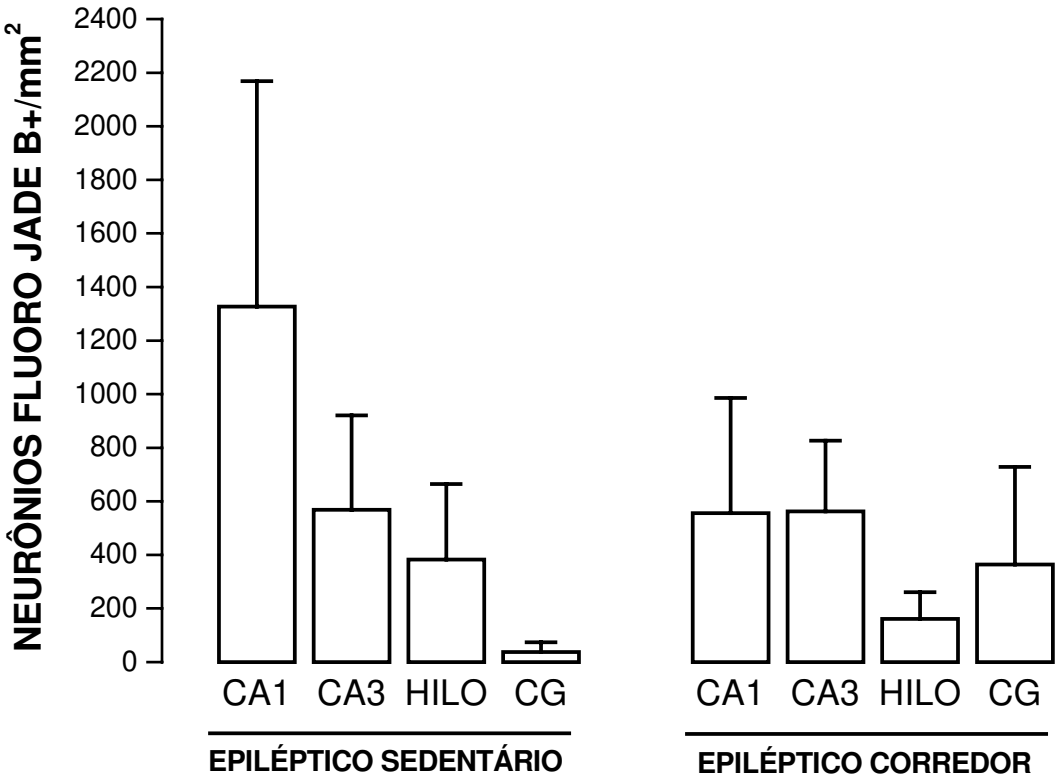

Figura 10. Número de neurônios em degeneração evidenciados pela marcação com Fluoro Jade B nas regiões da formação hipocampal avaliadas. CG – camada granular. Os valores estão expressos em média±E.P.M. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em quaisquer das estruturas analisadas.

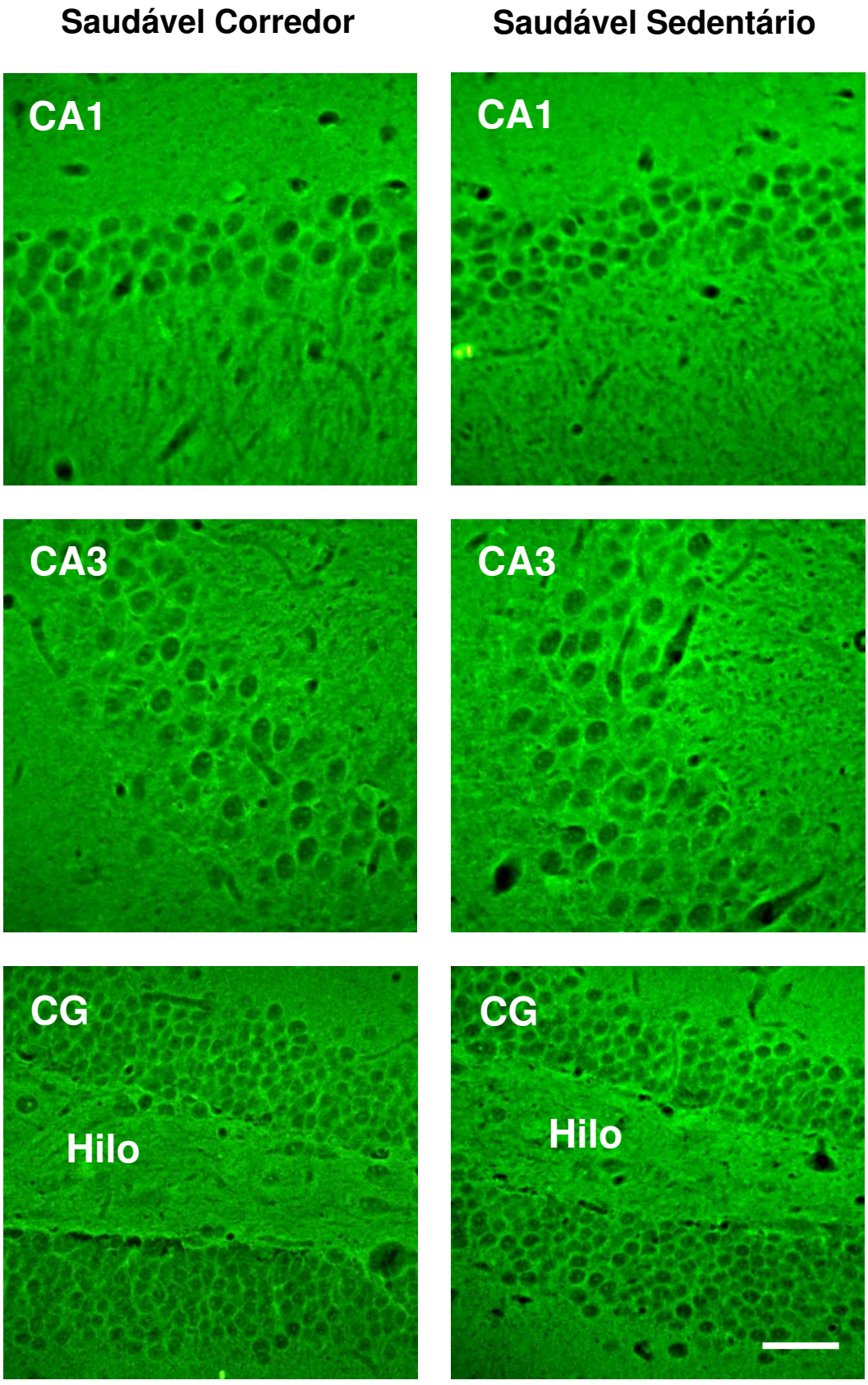

Figura 11. As colunas da esquerda e da direita são representativas da formação hipocampal de animais dos grupos Saudável Corredor e Saudável Sedentário, respectivamente. Animais de ambos grupos não apresentaram neurônios fluorescentes nas regiões CA1, CA3 e no hilo e camada granular (CG) do giro denteado, indicando a ausência de neurônios em degeneração. Barra=50µm.

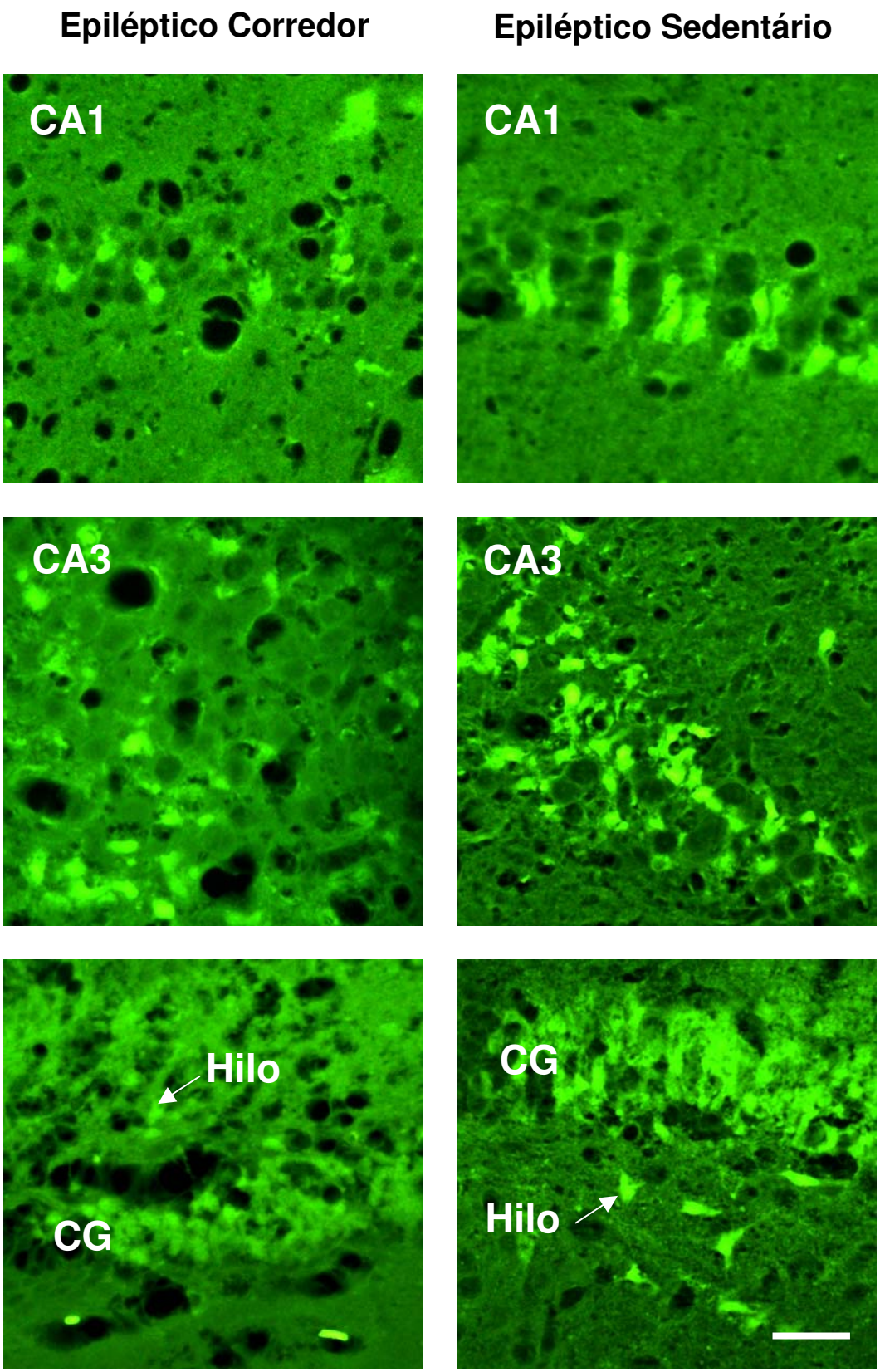

Figura 12. Células Fluoro-Jade B-positivas. A coluna da esquerda é representativa da formação hipocampal de animais do grupo Epiléptico Corredor exibindo neurônios fluorescentes nas regiões CA1, CA3 e no hilo e camada granular (CG) do giro denteado. A coluna da direita é representativa da formação hipocampal de animais do grupo Epiléptico Sedentário exibindo neurônios fluorescentes nas regiões CA1, CA3 e no hilo e camada granular (CG) do giro denteado. Barra=50µm

4.4.3 Avaliação da proliferação celular

A avaliação da proliferação celular através da detecção de células imunorreativas para PCNA presentes no giro denteando (camada granular, fronteira hilo-camada granular e camada molecular) mostrou que estas estavam presentes mormente na camada granular e na fronteira hilo-camada granular.

A média do número total de células imunorreativas para PCNA presentes no giro denteando dos animais do grupo ES (25±5,7; média±E.P.M.; $F(3,16)=3,002$; $p<0,05$) foi significativamente superior à registrada nos animais do grupo EC (6±3,9) e semelhante às dos grupos SS (12±4,5) e SC (11±4,4), que, por sua vez, não diferiram entre si. Por outro lado, o valor verificado nos animais do grupo EC não diferiu estatisticamente daqueles dos grupos SS e SC.

Conforme já referido, as regiões da camada granular e da fronteira hilo-camada granular foram as que principalmente contribuíram para o valor do número total de células imunorreativas para PCNA ($PCNA^+$). Contudo, é importante destacar que nos grupo ES e EC 40% das células $PCNA^+$ pertenciam à fronteira hilo-camada granular. (Figuras 13 e 14)

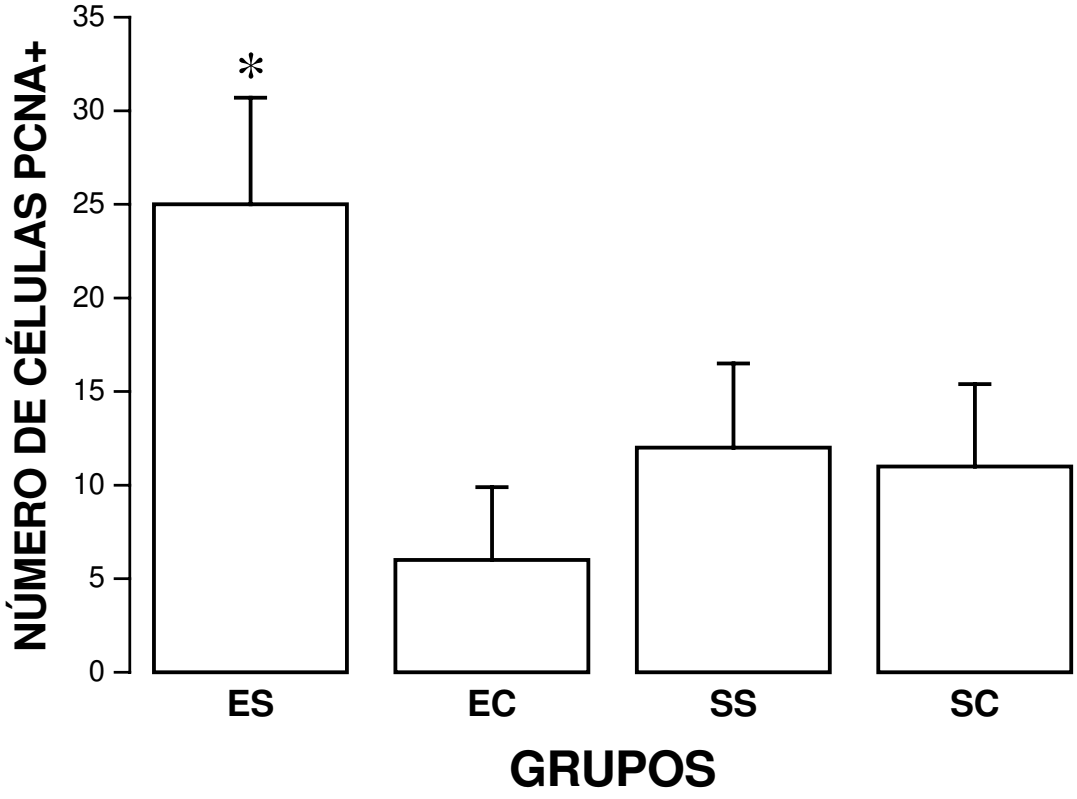

Figura 13. Número total de células imunorreativas para PCNA contadas em secções representativas do giro denteado da formação hipocampal. Os valores estão expressos em média±E.P.M. * indica diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo EC ($P<0.05$). ES – Epiléptico Sedentário; EC – Epiléptico Corredor; SS – Saudável Sedentário e SC – Saudável Corredor.

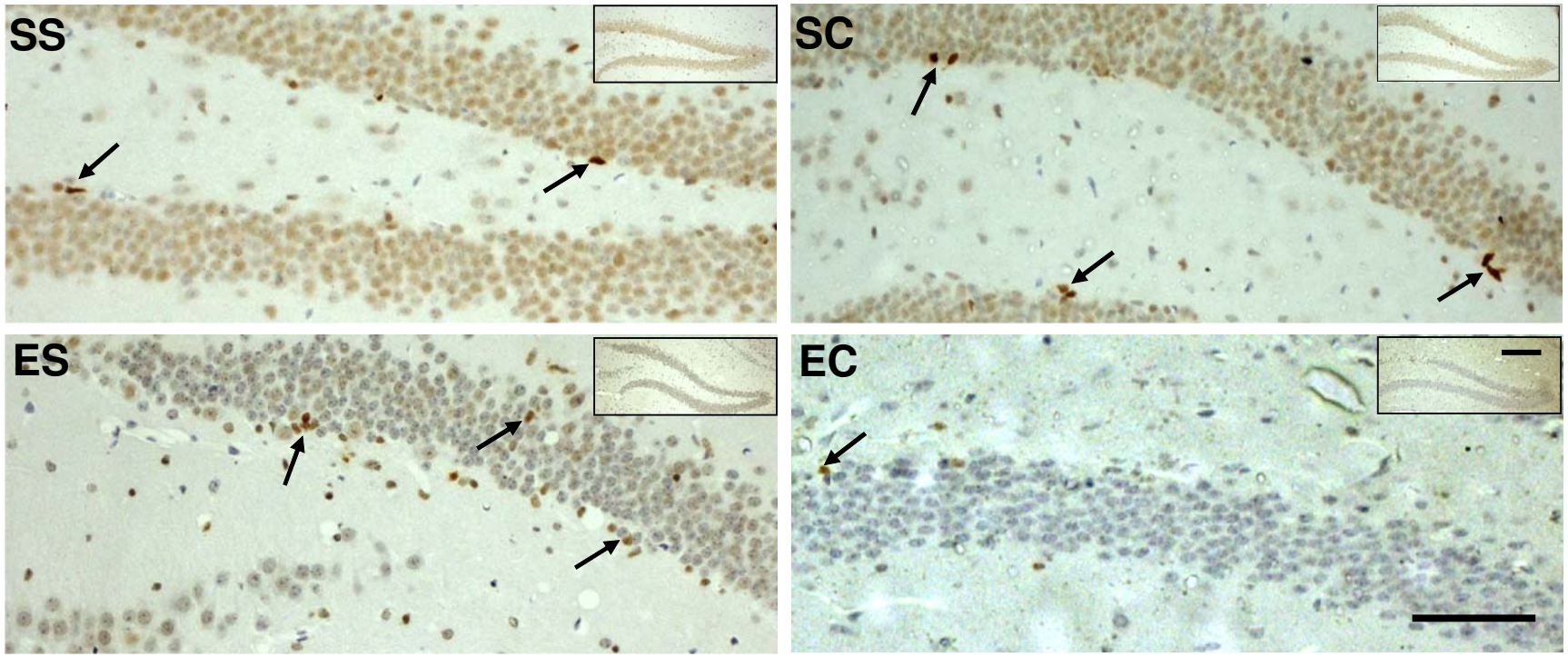

Figura 14. Células imunorreativas para PCNA. Imagem superior esquerda representativa do giro denteado de animais do grupo Saudável Sedentário mostrando poucas células PCNA+. Imagem superior direita representativa do giro denteado de animais do grupo Saudável Corredor mostrando várias células PCNA+. Imagem inferior esquerda representativa do giro denteado de animais do grupo Epiléptico Sedentário mostrando muitas células PCNA+. Imagem inferior direita representativa do giro denteado de animais do grupo Epiléptico Corredor mostrando raras células PCNA+ (Barra=200µm). Os retângulos no canto superior direito das imagens mostram a visão geral do giro denteado correspondente a cada caso (Barra=500µm).

5. Discussão

As alterações comportamentais observadas após a administração da pilocarpina e durante o *status epilepticus* foram similares àquelas previamente descritas em camundongos (TURSKI et al., 1984; SANTOS, 1995; CAVALHEIRO, et al., 1996; NASCIMENTO, 2004). Confirmando, deste modo, a reprodução do modelo experimental utilizado neste trabalho.

No presente estudo foi determinado o protocolo de atividade física voluntária, pois simula aspectos do comportamento humano, uma vez que os animais podem escolher quando e com que freqüência acessam a roda de atividade (VAYNMAN et al. 2004). Além disso, este protocolo evita as variáveis associadas ao estresse produzido pela atividade física forçada, as quais poderiam interferir nos resultados (COTMAN e BERCHTOLD, 2002).

Considerando o período de 28 dias em que os animais tiveram acesso à roda de atividade instalada em suas gaiolas, observou-se que aqueles pertencentes ao grupo saudável corredor (SC) correram em média 5,37±0,22 quilômetros por dia. Este volume de atividade física (VAF) foi coerente com os dados obtidos por Van PRAAG et al. (1999), os quais relataram que camundongos C57BL/6 correram em média 4,78±0,41 quilômetros por dia. Por outro lado os animais do grupo epiléptico corredor (EC) apresentaram um VAF diário médio inferior ao dos animais SC. Não há na literatura relatos referentes ao VAF em trabalhos envolvendo animais submetidos à epilepsia experimental. Estudos abordando modelos animais de epilepsia e ambiente enriquecido, que inclui dentre seus componentes o acesso voluntário a uma roda de atividade, não apresentam dados relativos ao comportamento locomotor dos animais (YOUNG et al., 1999; FAVERJON, et al. 2002).

RHODES et al. (2003), investigando a expressão da proteína *Fos* como marcador de atividade cerebral (DRAGUNOW e FAULL, 1989) constataram forte correlação entre VAF e atividade neural no giro denteado de camundongos com acesso à roda de atividade. Segundo os autores, estes dados podem refletir uma ativação do hipocampo em função do *input* sensitivo decorrente da atividade motora. No entanto, RHODES et al. (2003) sugerem que o hipocampo pode exercer uma importante função ativa na modulação do comportamento motor. Tal modulação influenciaria aspectos qualitativos da execução do movimento, tal como sua intensidade (ODDIE e BLAND, 1998). De fato, MORRIS e HAGAN (1983) verificaram que ratos com lesão hipocampal (fímbria-fórnix) foram capazes de saltar normalmente, contudo, não atingiram alturas facilmente alcançadas por ratos normais, refletindo menor intensidade da ação motora. Assim, RHODES et al. (2003) argumentaram que embora roedores com lesões hipocampais sejam capazes de se locomover sem prejuízos, eles não conseguem produzir movimentos intensos tipicamente associados com alguns tipos de ação motora, como saltos de grande amplitude e corrida rápida numa roda de atividade. Desta forma, podemos considerar que o menor VAF apresentado pelos animais do grupo EC se deva a sua dificuldade de manter uma atividade locomotora voluntária em alta velocidade na roda de atividade.

Analisando o comportamento locomotor dos animais ao longo de todo o período de atividade física, verificou-se que os saudáveis apresentaram um VAF alto no primeiro dia que decaiu nas 72 horas seguintes e, então, aumentou gradualmente até o final do período. Este aumento ao longo do período pode refletir uma melhora no condicionamento físico dos animais (ADLARD et al., 2004).

Quando analisados os animais epilépticos, verificou-se um padrão comportamental aparentemente oposto ao dos saudáveis no início, ou seja, pouca atividade no primeiro dia

seguido de um aumento nas 48 horas seguintes. No entanto, uma análise mais cautelosa pode revelar semelhanças no comportamento inicial dos animais de ambos grupos. Embora o acesso à roda de atividade tenha sido permitido aos animais somente 48 horas após o *status epilepticus*, com a finalidade de assegurar sua recuperação do quadro neurológico agudo que se estabelece, este período de recuperação varia entre 2 e 5 dias (CAVALHEIRO et al., 1996). Além disso, a determinação de uma espera de 48 horas antes de proporcionar acesso à roda de atividade foi baseada em observações prévias em nosso laboratório, segundo as quais, depois deste tempo os animais apresentavam autonomia para sobrevida. No entanto, a recuperação pode não ter sido plena para os camundongos acessarem a roda de atividade. Portanto, é possível que os animais ainda estivessem se recuperando nos dois primeiros dias. Considerando esta possibilidade, estes animais começaram a acessar a roda apenas no terceiro dia, que revela um VAF alto. Assim sendo, os animais epilépticos se comportaram no início de forma semelhante aos animais saudáveis. Também como para os saudáveis, seguiu-se uma queda no VAF dos epilépticos nos dias subseqüentes até o 9^{o} dia. Contudo, após este início similar, os epilépticos apresentam uma estabilização do VAF até o final do período, enquanto os saudáveis o aumentaram gradualmente conforme referido.

Ao longo dos testes no labirinto aquático de Morris pudemos observar que os animais epilépticos nadavam de forma similar aos animais saudáveis, não evidenciando prejuízo de mobilidade nas condições do teste. O mesmo foi relatado por outros autores que empregaram o labirinto aquático de Morris em modelos experimentais de epilepsia (FAVERJON et al., 2002).

Os animais dos grupos saudáveis, corredores (SC) e sedentários (SS), apresentaram desempenho semelhante entre si no labirinto aquático de Morris. Ambos grupos exibiram

valores de latência similares ao longo do teste, com uma queda significativa deste parâmetro entre a 1ª sessão e a 4º, dado indicativo de que os animais aprenderam a tarefa. Van PRAAG et al. (1999a) obtiveram resultados idênticos, não constatando diferenças no desempenho entre camundongos corredores e sedentários que realizaram um teste de labirinto aquático com 4 tentativas por sessão; exatamente como no presente trabalho. Contudo, estes mesmos autores observaram que com um protocolo de teste mais desafiador, apenas 2 tentativas por sessão, os animais corredores apresentaram desempenho significativamente melhor. Mais recentemente, em outros estudos utilizando o teste do labirinto aquático de Morris com o protocolo de 2 tentativas por sessão, também se constatou melhor desempenho de ratos corredores diante de seus correlatos sedentários (ADLARD et al., 2004; VAYNMAN, et al., 2004). É importante se destacar que os animais do grupo SC, a despeito da falta de diferença estatisticamente significante, exibiram valores médios de latência que tenderam a ser menores ao longo das sessões de teste comparados aos dos animais SS; indicando um potencial ganho funcional decorrente da atividade física. Diante desta tendência, é plausível supor que com o protocolo de 2 tentativas por sessão a diferença entre os grupos SC e SS se acentuassem, conforme constatado por Van PRAAG et al. (1999a).

Por sua vez, os animais epilépticos, corredores (EC) e sedentários (ES), revelaram importantes diferenças entre si no desempenho no labirinto aquático de Morris. Os animais EC tiveram melhor performance quando comparados aos ES, apresentando latência significativamente menor na 4ª sessão. Além disso, a queda observada nos valores de latência entre 1ª e a 4ª sessão foi estatisticamente significante nos EC, evidenciando portanto aprendizado. Mais ainda, similarmente ao ocorrido nos grupos saudáveis, também para os animais epilépticos os valores médios de latência dos corredores na 1ª, 2ª e 3ª

sessões tenderam a ser menores quando comparados aos dos sedentários. Estes dados são uma forte evidência do efeito positivo da atividade física sobre a função mnemônica dos animais estudados, sobretudo nos animais epilépticos.

No dia seguinte à última sessão de testes para memória de referência espacial realizou-se o teste para avaliação da retenção da memória espacial (*Probe Test*). Este teste, com duração total de três minutos, foi analisado em três fragmentos de um minuto cada. Assim, quanto maior o número de vezes que o animal entra no contador crítico durante o primeiro minuto, melhor é sua retenção de memória espacial. O fato de não encontrar a plataforma durante o primeiro minuto leva o animal a vasculhar o labirinto todo, diminuindo assim a freqüência de entradas no contador crítico nos próximos dois minutos. A extinção do comportamento inicial de entrar no contador crítico tem sido interpretada como um indicador de aprendizado a partir de pistas espaciais (SANTOS, 1999). No presente estudo constatamos que durante o 1º minuto os animais do grupo SC apresentaram um número significativamente maior de entradas no contador crítico comparados aos dois grupos epilépticos (EC e ES) e uma tendência para melhor desempenho com relação aos animais SS. Estes últimos, por sua vez, não diferiram dos animais epilépticos corredores, sendo melhores apenas que os epilépticos sedentários. Os epilépticos corredores, não foram diferentes comparados aos animais SS, como já referido, e também aos ES. Contudo, com relação aos animais ES, os animais EC apresentaram uma tendência a melhor performance. Analisando-se a fase final do teste, 2º e 3º minutos, apenas os animais corredores (SC e EC) apresentaram sinais de extinção do comportamento inicial. Em ambos grupos foi observada queda na freqüência de entradas no contador crítico entre o 1º e o 3º minutos, sendo estatisticamente significativa para o grupo SC. Desta forma, os dados do *Probe Test*

reforçam as evidências obtidas nos testes de memória de referência espacial de que a atividade física teve um efeito positivo sobre a função cognitiva.

A formação hipocampal recebe aferências colinérgicas provenientes da área septal. Adicionalmente há, ao menos em roedores, interneurônios colinérgicos nos circuitos intrínsecos da formação hipocampal. Tal inervação colinérgica incide, predominantemente no *stratum lacunosum moleculare* de CA3, *stratum piramidale* de CA1 e CA3 e *stratum moleculare* do giro denteado em camundongos C57BL/6 e ratos Sprague-Dawley (AZNAVOUR, 2002). A acetilcolina, através de receptores muscarínicos e nicotínicos, atua despolarizando neurônios piramidais glutamatérgicos e interneurônios GABAérgicos (McQUISTON e MADISON, 1999a, McQUISTON e MADISON, 1999b; JI e DANI, 2000; AZNAVOUR, 2002).

A pilocarpina é um potente agonista colinérgico muscarínico que, ao ativar receptores colinérgicos de neurônios hipocampais, despolarizando-os, desencadeia um processo de hiperatividade na circuitaria hipocampal. Este evento progressivamente evolui promovendo aumento da liberação de glutamato e ativação de receptores para glutamato do tipo NMDA (CAVALHEIRO, 1995; HAMILTON, et al., 1997). A conseqüente ativação do sistema glutamatérgico acarreta excessivo influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) aumentando sua concentração intracelular. Os altos níveis intracelulares de Ca^{2+} podem ativar proteases, lipases, fosfatases e endonucleases que diretamente danificam estruturas celulares ou induzem a formação de radicais livres oxidativos que são mediadores de morte celular. Portanto, a excessiva liberação sináptica de glutamato leva ao aumento do influxo de Ca^{2+} através dos receptores NMDA, podendo causar desequilíbrio na homeostase deste íon ativando processos intracelulares dependentes de cálcio que culminam em morte celular. Para tal fenômeno foi cunhado o termo excitotoxicidade referindo-se à neurodegeneração

mediada por receptores de aminoácidos excitatórios (OLNEY, 1969). Desta forma acredita-se que a morte celular observada no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em camundongos é decorrente da excitotoxicidade desencadeada pelos eventos acima descritos (TURSKI et al., 1984).

Uma vez que os íons cálcio são um componente crucial para o fenômeno da excitotoxicidade (ARUNDINE e TYMIANSKY, 2003), é de fundamental importância a capacidade celular de tamponamento e homeostase deste íon. Sendo assim, células dotadas de proteínas intracelulares ligantes de cálcio, como calbindina, parvalbumina e calretinina, têm menor suscetibilidade à neurodegeneração por excitotoxicidade (SYNTICHAKI e TAVERNARAKIS, 2003).

As células granulares do giro denteado possuem a proteína ligante de cálcio calbindina. Além disso, os interneurônios da camada granular também possuem parvalbumina e calretinina (MÁTYAS et al., 2004). Por outro lado, as células musgosas do hilo do giro denteado, que são o principal componente celular desta região, não apresentam proteínas ligantes de cálcio (FUJISE et al., 1998; MÁTYAS et al., 2004). Na região CA3 as células piramidais não possuem as proteínas ligantes de cálcio, enquanto interneurônios desta região expressam parvalbumina e calretinina. Na região CA1 também ocorrem interneurônios que expressam parvalbumina e calretinina, como na região CA3; além disso, ao contrário da região CA3, em CA1 aparecem neurônios piramidais superficiais que expressam calbindina (MÁTYAS et al., 2004).

Estas características referentes à presença de proteínas ligantes de cálcio em distintos tipos de células neuronais e regiões da formação hipocampal podem explicar o padrão de lesão histológica observado neste estudo através da análise dos cortes submetidos à técnica de coloração de Nissl com violeta de cresila. Observou-se que o hilo do giro

denteado apresentou os maiores escores de lesão dentre todas as regiões avaliadas; as camadas piramidais de CA3 e CA1 apresentarem importante grau de lesão; e a camada granular do giro denteado revelou-se relativamente preservada. Este padrão de perda neuronal foi semelhante ao previamente descrito em outros trabalhos com camundongos (TURSK et al., 1984; CAVALHEIRO et al., 1996; NASCIMENTO, 2004) e é coerente com a distribuição de proteínas ligantes de cálcio em cada uma destas regiões.

Contudo, quando comparados os escores médios de perda neuronal dos animais dos grupos EC e ES não foram detectadas, em quaisquer das estruturas da formação hipocampal analisadas, diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. FAVERJON et al. (2002) também não encontraram diferenças na extensão da perda celular nas regiões CA3, CA1 e no hilo do giro denteado de ratos neonatos submetidos a *status epilepticus* por injeção de lítio-pilocarpina e posteriormente mantidos em ambiente enriquecido (AE), tendo a roda de atividade como um dos seus componentes.

Por outro lado, YOUNG et al. (1999) constataram menor perda neuronal na região CA3 e no hilo de ratos expostos ao AE por três semanas antes da indução do *status epilepticus* por injeção de cainato. Nesse mesmo estudo os autores verificaram também que nos animais expostos ao AE houve uma maior expressão do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). YOUNG et al. (1999) argumentam que a resistência à lesão neuronal observada nos animais mantidos em AE poderia ser atribuída à neuroproteção proporcionada pelo aumento da expressão desses fatores neurotróficos. Os mesmos autores acrescentaram ainda que outras moléculas neurotróficas também poderiam contribuir para o efeito neuroprotetor do AE, tais como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), o fator de crescimento do nervo (NGF) e a neurotrofina-3 (NT-3), que se elevam em virtude de exercício físico.

É particularmente importante destacar no trabalho de YOUNG et al. (1999) o fato dos animais terem sido expostos ao AE antes da indução do *status epilepticus*, diferentemente do protocolo por nós empregado. De fato, no presente estudo a atividade física foi proporcionada aos animais 48 horas após a administração da pilocarpina. Tal estímulo pode não ter sido suficiente para impedir ou mesmo amenizar a evolução do processo de morte celular desencadeado pelo *status epilepticus*. Por outro lado, podemos supor que, não obstante os níveis dos fatores neurotróficos estivessem abaixo de valores necessários para neuroproteção por ocasião do *status epilepticus*, podem ter sido elevados no decorrer do período de atividade física, considerando nossos resultados comportamentais.

Para fins de avaliação do dano tecidual, além da coloração de Nissl com violeta de cresila, foi utilizado no presente estudo o Fluoro Jade B como um marcador de neurônios que estão em processo de degeneração (SCHMUED e HOPKINS, 2000). Embora a exata estrutura química do Fluoro Jade B ainda não seja conhecida, trata-se de um derivado de fluoresceína aniônica com afinidade para ligar-se a moléculas com cargas positivas, tais como as poliaminas, que são expressas por neurônios em degeneração (SCHMUED e HOPKINS, 2000).

Nossos dados relativos à marcação com Fluoro Jade B revelaram a presença de neurônios intensamente fluorescentes na formação hipocampal dos dois grupos submetidos ao *status epilepticus*, ES e EC. Contudo, quando comparados os números de neurônios Fluoro Jade B positivos por mm^2 dos animais de ambos grupos, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre eles para quaisquer das estruturas da formação hipocampal analisadas. Estes resultados corroboram aqueles revelados pela avaliação da perda neuronal, indicando que o estímulo da atividade física pode não ter sido

suficientemente benéfico a ponto de proteger os animais da neurodegeneração evidenciada pela marcação com Fluoro Jade B. Por outro lado, vale destacar que a literatura não traz relatos de estudos avaliando neurodegeneração através da marcação com Fluoro Jade B envolvendo modelos animais de epilepsia e manipulação ambiental, como atividade física ou ambiente enriquecido.

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) é uma proteína essencial para divisão celular, está estreitamente relacionada com a síntese de DNA durante a fase S do ciclo mitótico (MORRIS e MATHEWS, 1989). Em decorrência desta característica funcional, o PCNA é utilizado como um marcador de proliferação celular (RANKIN et al., 2004).

No presente trabalho foram detectadas células PCNA positivas no giro denteado dos camundongos de todos os quatro grupos estabelecidos no estudo. Entre os animais dos grupos saudáveis, corredores (SC) e sedentários (SS), não foi observada diferença estatisticamente significante na proliferação celular. YOUNG et al. (1999), também utilizando PCNA como marcador de proliferação celular, constataram que ratos mantidos em ambiente enriquecido apresentaram significantemente mais células imunorreativas para PCNA na camada granular do giro denteado, comparados aos animais controle. Outros estudos também estabeleceram que a atividade física estimula a neurogênese na camada granular do giro denteado de camundongos C57BL/6 (Van PRAAG et al., 1999a; Van PRAAG et al., 1999b). Contrastando com os trabalhos acima referidos, nossos resultados não revelaram aumentada proliferação celular nos animais corredores.

Estudos da proliferação celular basal no giro denteado da formação hipocampal em diversas linhagens isogênicas e não isogênicas de camundongos adultos mostraram que esse fenômeno é geneticamente influenciado (KEMPERMANN et al., 1997a;

KEMPERMANN e GAGE, 2002). Além disso, foi verificado que animais adultos da linhagem isogênica C57BL/6 quando submetidos a ambiente enriquecido não apresentaram modificação na proliferação celular no giro denteado da formação hipocampal. Embora a sobrevivência das células neogeradas, especialmente dos neurônios, tenha sido superior à dos animais controle criados em condições normais de biotério (KEMPERMANN et al., 1998b). Por outro lado, a exposição de camundongos adultos da linhagem isogênica 129/SvJ ao mesmo ambiente enriquecido provocou aumento significativo da proliferação e da sobrevivência celular nesses animais quando comparados aos animais controle (KEMPERMANN et al., 1998a).

Estes estudos sugerem que as características genéticas, além de influenciar proliferação celular basal no giro denteado, também interferem no efeito que o estímulo ambiental tem sobre a mesma.

Vale lembrar que nesses experimentos o ambiente enriquecido consiste de gaiolas com dimensões maiores que as comuns e é composto por diversos elementos, tais com tubos plásticos, materiais para construir ninhos, brinquedos diversos e uma roda de atividade. Esta última parece ser o elemento mais importante para a estimulação da neurogênese em camundongos adultos (Van PRAAG et al., 2000).

A linhagem empregada no nosso trabalho não é isogênica e, segundo nosso conhecimento, não existem estudos sobre proliferação celular basal no giro denteado de animais adultos desta linhagem, e nem como ela pode ser afetada pelo ambiente, em particular pela atividade física voluntária. Assim, é plausível considerar que a ausência de diferença na proliferação celular entre os animais dos grupos SS e SC tenha sido decorrente das características genéticas próprias da linhagem Swiss. Por outro lado é interessante ponderar que o paradigma de ambiente enriquecido classicamente empregado proporciona

estímulo ambiental inferior aquele do habitat selvagem de roedores (KEMPERMANN et al., 1997b, 2002). Deste modo, sendo nossos animais não isogênicos e possuindo, portanto, um *backgroud* genético mais próximo de animais selvagens, as condições proporcionadas em nosso experimento podem não ter sido suficientes para estimular a proliferação celular no giro denteado da formação hipocampal dos animais do grupo SC.

Entre os animais epilépticos, aqueles pertencentes ao grupo sedentário (ES) apresentaram significativamente maior número de células PCNA positivas comparados com os corredores (EC). Estes dados parecem controversos quando se consideram os achados de que a atividade física estimula a proliferação celular no giro denteado. Contudo, diversos trabalhos relataram a ocorrência de proliferação celular e neurogênese também em decorrência de crises epilépticas (PARENT et al., 1997; PARENT e LOWENSTEIN, 2002; PARENT, 2002; RIBAK e DASHTIPOUR, 2002). Neste contexto, é interessante notar que ARIDA et al. (1999), utilizando o modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos submetidos à atividade física após a indução do *status epilepticus*, constataram que os animais corredores tiveram uma redução na freqüência das crises recorrentes. Embora, no presente trabalho não tenham sido monitorados possíveis eventos de crises recorrentes, é possível que os animais do grupo ES, sem o estímulo da atividade física, tenham sofrido um maior número dessas crises, o que teria determinado uma maior proliferação celular. É importante considerar que tais crises podem de fato ter ocorrido, pois, embora o período de sobrevida após o *status epilepticus* estivesse compreendido dentro do chamado período silente do modelo experimental, este é relativamente amplo com duração média de 14,4±11,9 dias (CAVALHEIRO et al., 1996).

É importante destacar ainda que, em contraste com o trabalho de YOUNG et al. (1999), em nosso estudo não foi realizada marcação de fenótipo neuronal para as células PCNA positivas. Assim as interpretações referentes à ocorrência de neurogênese foram limitadas. Isto nos obriga a considerar a possibilidade de que a maior proliferação celular observada nos animais ES seja devida também à gliogênese (STEINER et al., 2004).

Os dados do presente estudo até aqui discutidos apontam para um ganho funcional, no que concerne à memória, para os animais epilépticos que foram submetidos à atividade física voluntária crônica. Este efeito positivo se manifestou a despeito de não terem sido constatadas diferenças na extensão e no padrão da perda celular entre os animais dos grupos EC e ES. FAVERJON et al. (2002), cujo trabalho revelou resultados semelhantes, sugerem que mesmo em um cérebro lesado, a manipulação ambiental pode promover recuperação ou compensação funcional. Desta forma, é possível considerar que a atividade física exerce seus efeitos influenciando, de algum modo, o complexo processo molecular subjacente aos fenômenos de aprendizagem e formação da memória.

Num sentido mais geral, aprendizagem pode ser considerada como o processo através do qual novas informações são adquiridas, enquanto que memória seria o processo em que tais informações são retidas (BAYLEI et al., 1996). Classicamente, a memória pode ser dividida em duas principais categorias, memória explícita ou declarativa, e memória implícita ou não declarativa. A memória explícita se refere ao conhecimento consciente acerca de pessoas, lugares e coisas, enquanto que a implícita é aquela relativa ao conhecimento inconsciente de habilidades motoras e outros comportamentos como condicionamento clássico, sensibilização e habituação (POLSTER et al., 1991). Por sua vez, a memória explícita depende de estruturas diencefálicas e do lobo temporal, como córtex entorrinal, subículo e hipocampo, enquanto que a memória implícita envolve as

mesmas vias de associação, motoras e sensitivas utilizadas na expressão dos processos de aprendizagem (SQUIRE, 1992). O processo de armazenamento das duas formas de memória, implícita e explícita, é gradual e comumente dividido em pelo menos dois estágios temporalmente distintos. Assim, têm-se memória de curto prazo, com duração de minutos a horas, e memória de longo prazo, perdurando por dias, semanas e mesmo por toda a vida (BAYLEI et al., 1996).

O armazenamento da memória de longo prazo para aprendizagem explícita, tanto para humanos quanto para animais experimentais, é criticamente dependente do hipocampo (SQUIRE, 1992). Adicionalmente, em roedores, a memória espacial é particularmente sensível a lesões na formação hipocampal (BLISS E COLLINGRIDGE, 1993). O processo de armazenamento da memória está associado a um programa celular de expressão gênica, alteração da síntese de proteína e formação de novas conexões sinápticas (BAYLEI et al., 1996). Diversos autores postulam que parte da via molecular necessária ao processo de consolidação da memória envolve proteínas ligantes do elemento de resposta do AMP cíclico (CREB; *cAMP-response element-binding protein*) (BAYLEI et al., 1996; YIN e TULLY, 1996; ABEL e KANDEL, 1998; SILVA et al., 1998; LAMPRECHT, 1999). O CREB é um fator de transcrição que, quando ativado por fosforilação, liga-se ao promotor CRE no DNA, ativando a expressão de genes envolvidos com as alterações estruturais subjacentes ao processo de armazenamento da memória a longo prazo (SILVA et al., 1998). Deste modo, o aumento da fosforilação do CREB está relacionado com a plasticidade sináptica necessária à formação de memória (BAYLEI et al., 1996). O mecanismo básico proposto tem início com o aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico, que, por sua vez, ativa a subunidade catalítica da proteína quinase A dependente de AMP cíclico

(MAPK); esta proteína se desloca até o núcleo celular e, então, fosforila o CREB, ativando-o (ABEL e KANDEL, 1998).

A atividade física induz aumento na expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (NEEPER et al., 1996; NEEPER et al., 1997; VAYNMAN et al., 2003, 2004; ADLARD et al., 2004). Além disso, tem sido demonstrado que o BDNF está particularmente associado ao processo de aprendizagem e memória hipocampal (MU et al., 1999; ZHOU et al., 2000). ADLARD et al. (2004) apresentaram dados correlacionando a aumentada expressão de BDNF ao melhor desempenho de ratos no labirinto aquático de Morris. Corroborando os achados de ADLARD et al. (2004), VAYNMAN et al. (2004) verificaram que os ratos que tiveram acesso a uma roda de atividade apresentaram maior expressão de BDNF, CREB e sinapsina I, além de maior nível de CREB fosforilado. Interessantemente, neste mesmo estudo os autores verificaram que os animais corredores tratados com uma molécula quimérica (TrkB-IgG), que impede a ação do BDNF, apresentaram pior desempenho no labirinto aquático que os animais corredores controle. Estes dados se constituem numa forte evidência de que a eficácia da atividade física sobre a plasticidade sináptica e função cognitiva seja mediada pela ação do BDNF, através de sua associação com o fator de transcrição CREB.

Detalhando o envolvimento do BDNF nos processos de memória, VAYNMAN et al. (2004) propuseram que neurônios pertencentes a circuitos hipocampais liberam BDNF nas sinapses e este, através do seu receptor de membrana TrkB, desencadeia nas células pós-sinápticas uma cascata de eventos intracelulares que culminam na ativação da via MAPK-CREB. Portanto, é possível que os efeitos positivos da atividade física sobre a memória, relatados em diversos estudos referidos neste texto e de fato constatados no presente trabalho, sejam mediados pelo sistema BDNF-CREB. Adicionalmente,

VAYNMAN et al. (2004) expõem outros mecanismos prováveis mediados pelo BDNF que podem contribuir para a melhora da memória através da atividade física. Segundo os autores, o aumento da produção de BDNF induzido pelo exercício físico determinaria um aumento dos estoques e da liberação de glutamato por meio de dois mecanismos cooperativos e paralelos. Primeiramente, o BDNF se ligaria ao seu receptor TrkB da célula pré-sináptica onde está ancorada a fosfolipase C que ativa a calmodulina quinase CaMKII, a qual regula os níveis de sinapsina I. Esta molécula estabelece a reserva de vesículas dos neurotransmissores ancorando-as ao citoesqueleto de actina (TAKEI et al., 1995). Pelo segundo mecanismo o BDNF ativaria a MAPK, também via receptor TrkB, que fosforilaria a sinapsina I desencadeando a mobilização das vesículas sinápticas da reserva para liberação dos neurotransmissores. Desta forma, o aumento da liberação de glutamato levaria a um incremento do influxo de íons cálcio nos neurônios pós-sinápticos, através de receptores NMDA, e à ativação da CaMKII que, por sua vez, também ativaria a via MAPK-CREB. Adicionalmente, TAO et al. (1998) reportam que, além de regular a expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica, o CREB também tem como alvo o gene do próprio BDNF. Desta forma, vale destacar que estes mecanismos se sustentariam reciprocamente, mantendo o efeito do exercício físico sobre a plasticidade sináptica (VAYNMAN et al., 2003, 2004).

É importante considerar que os estudos realizados por VAYNMAN et al., (2004) sobre a associação da atividade física, BDNF, CREB e memória utilizaram animais saudáveis, sem qualquer lesão no sistema nervoso central. Contudo, é plausível supor que a melhor performance dos animais epilépticos corredores no labirinto aquático verificada no presente estudo envolva o sistema BDNF-CREB. Considerando esta hipótese, e a despeito de não termos observado diferenças significativas no padrão da lesão histológica entre os grupos EC e

ES, podemos considerar que a circuitaria hipocampal remanescente nos camundongos do grupo EC foi funcionalmente otimizada pelo estímulo da atividade física.

Os nossos resultados e os dados da literatura justificam estudos futuros empregando-se um protocolo experimental no qual se proporcione atividade física voluntária aos animais antes da indução do *status epilepticus* por pilocarpina. Tal protocolo permitiria a investigação da ocorrência de neuroproteção promovida pela manipulação ambiental, similarmente ao relatado por YOUNG et al. (1999) quando proporcionaram aos animais um ambiente enriquecido previamente à indução de *status epilepticus* por cainato. Em particular, considerando as implicações que a otimização do sistema BDNF-CREB pode ter sobre a memória em quadros epilépticos, julgamos extremamente interessante pesquisar a expressão de BDNF e a ativação do CREB no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina associado com atividade física.

Considerando o conjunto de evidências experimentais e dados clínicos de que o exercício físico traz benefícios a pacientes com epilepsia, parece justificável encorajá-los a praticar atividade física regular (NAKKEN et al., 1990; ROTH et al., 1994). Contudo, se fazem ainda necessários estudos com pacientes com epilepsia engajados em programas sistemáticos de exercício físico. Tais estudos, associados aos realizados com modelos experimentais, poderiam contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos neurológicos subjacentes aos efeitos benéficos do exercício físico sobre essa população. Variáveis como intensidade, volume, freqüência e modalidade do exercício físico devem ser consideradas nesse tipo de estudo.

Finalmente, o maior e mais sólido conhecimento da relação epilepsia-exercício possibilitaria estabelecer estratégias adequadas para a elaboração de um programa de treinamento físico seguro, que poderia ser recomendado especialmente a estes pacientes, minimizando os riscos e acentuando os benefícios.

6. Conclusões

1. O *status epilepticus* induzido pela pilocarpina causa significativa redução do volume da atividade física voluntária realizada pelos camundongos na roda de atividade.

2. A atividade física voluntária realizada pelos camundongos após a indução de *status epilepticus* determinou o seu melhor desempenho no labirinto aquático de Morris quando comparado ao dos animais epilépticos sedentários, sugerindo que a atividade física contribuiu para preservação da sua memória espacial.

3. O padrão histológico da lesão hipocampal e a ocorrência de degeneração neuronal não diferiram entre os animais corredores e sedentários após cinco semanas do *status epilepticus*. Este resultado sugere que fenômenos de plasticidade neural de natureza molecular, não detectáveis através das técnicas morfológicas empregadas, sejam responsáveis pelo melhor desempenho dos animais corredores no labirinto aquático de Morris.

4. A avaliação do número de células imunorreativas para PCNA sugere que a atividade física voluntária realizada pelos animais que tiveram *status epilepticus* produziu um efeito inibidor sobre a proliferação celular no giro denteado da formação hipocampal. Contudo, para uma melhor análise da relação entre *status epilepticus*, atividade física e proliferação celular, devem ser realizadas investigações sobre o fenótipo das células geradas.

5. Embora extrapolações para o âmbito clínico de resultados obtidos em estudos com modelos experimentais exijam cautela, nossos resultados corroboram a hipótese de que atividade física adequadamente prescrita pode exercer importante ação profilática e terapêutica em pacientes com epilepsia.

7. Referências Bibliográficas

ABEL, T.; KANDEL, E. R. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. **Brain Research Reviews**, 26: 360-378, 1998.

ADLARD, P. A.; PERREAU, V. M.; ENGESSER-CESAR, C.; COTMAN, C. W. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. **Neuroscience Letters**, 363: 43-48, 2004.

ANDERSON, M. F.; ABERG, M. A. I.; NILSSON, M.; ERIKSSON, P. S. Insulin-like growth factor and neurogenesis in the adult mammalian brain. **Developmental Brain Res,** 134: 115-122, 2002.

ANG, E. T.; WONG, P. T. H.; MOOCHHALA, S.; NG, Y. K. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? **Neuroscience,** 118: 335-345, 2003.

ARIDA, R. M.; VIEIRA, A. J.; CAVALHEIRO, E. A. Effect of physical exercise on kindling development. **Epilepsy Research,** 30: 127-132, 1998.

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

ARUNDINE, M.; TYMIAANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, 34: 325-337, 2003.

AZNAVOUR, N.; MECHAWAR, N.; DESCARRIES, L. Comparative analysis of cholinergic innervation in the dorsal hippocampus of adult mouse and rat: a quantitative immunocytochemical study. **Hippocampus**, 12: 206-217, 2002.

BABB, T. L.; BROWN, W. J. Pathological findings in epilepsy. In: Engel, J. J. (ed.) **Surgical treatment of the epilepsies.** Raven Press, New York, 1987, pp. 511-540.

BAYLEI, C. H.; BARTSCH, D.; KANDEL, E. R. Toward a molecular definition of long-term memory storage. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 134445-13452, 1996.

BERNADO, L. S.; PRINCE, D. A. Acetylcholine induced modulation of hippocampal pyramidal neurons. **Brain Res,** 211: 227-234, 1981.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A sinaptic model of memory: long-term potentiation of hippocampus. **Nature**, 361: 31-39, 1993.

BORGES, K.; GEARING, M.; McDERMOTT, D. L.; SMITH, A. B.; ALMONT, A. G.; WAINER, B. H.; DINGLEDINE, R. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. **Experimental Neurology,** 182: 21-34, 2003.

CARRO, E.; NUÑEZ, A.; BUSIGUINA, S.; TORRES-ALEMÁN, I. Circulating Insuline-Like Growth Factor I Mediates Effects of Exercise on the Brain. **J. Neuroscience,** 20 (8): 2926-2933, 2000.

CARRO, E.; TREJO, J. L.; BUSIGUINA, S.; TORRES-ALEMÁN, I. Circulating Insuline-Like Growth Factor I Mediates the Protective Effects of Physical Exercise against Brain Insults of Different Etiology and Anatomy. **J Neuroscience,** 21(15): 5678-5684, 2001.

CAVALHEIRO, E. A.; LEITE, J. P.; BORTOLOTTO, Z. A.; TURSKI, W. A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Eplepsia,** 32 (6): 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci,** 16: 33-37, 1995.

CAVALHEIRO, E. A.; SANTOS, N. F.; PRIEL, M. R. The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia,** 37(10): 1015-1019, 1996.

CENDES, F.; KOBAYASHI, E. Epilepsia do Lobo Temporal. In: GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. **Epilepsia**, 3ª Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 2000, pp. 201-213.

CLIFFORD, D. B.; OLNEY, J. W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R. C.; ZORUMSKI, C. F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience,** 23: 953-968, 1987.

COLCOMBE, S. J.; ERICKSON, K. I.; RAZ, N.; WEBB, A. G.; COHEN, N. J.; McAULEY, E.; KRAMER, A. F. Aerobic fitness reduces brain tissue loss in aging humans. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci,** 58(2): 176-180, 2003.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neuroscience,** 35(6), 295-301, 2002.

DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of *c-fos* as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of Neuroscience Methods**. 29: 261-265, 1989.

DUMAN, R. S.; MALBERG, J.; THOME, J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry,** 46: 1181-1191, 1999.

DUMAN, R. S.; NAKAGAWA, S.; MALBERG, J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. **Neuropsychopharmacology,** 25: 836-844, 2001.

ENGEL, J. J. Epileptic syndromes. In: **Seizures and Epilepsy.** Philadelphia: F. A. Davis Company, 195-201, 1989.

ENGEL, J. J. Update on surgical treatment of the epilepsies. **Neurology.** 43: 1612-1617, 1993.

ENGEL, J. J. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res,** 26: 141-150, 1996.

FAVERJON, S.; SILVEIRA, D. C.; FU, D. D.; CHA, B. H.; AKMAN, C.; HU, Y.; HOLMES, G. L. Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats. **Neurology,** 59: 1356-1364, 2002.

FRANKLIN, K. B. J.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press, San Diego, 1997.

FUJISE, N.; LIU, N. Y.; HORI, N.; KOSAKA, T. Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus: II. Mossy cells, with special reference to their dorsoventral difference in calretinin immunoreactivity. **Neuroscience**, 82(1): 181-200, 1998.

GLOOR, P. Mesial temporal sclerosis: historical background and an overview from a modern perspective. In: Luders, H. (ed.) **Epilepsy surgery,** Raven Press, New York, 1991, pp. 909-917.

GÓMEZ-PINILLA, F.; SO, V.; KESSLAK, J. P. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associted with exercise. **Neuroscience,** 85(1): 53-61, 1998.

GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. Considerações gerais. In: GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. **Epilepsia**, 3ª Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 2000, pp. 1-10.

GUNDERSEN, H. J.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, 96: 379-394, 1988.

HAMILTON, S. E.; LOOSE, M. D.; QI, M.; LEVEY, A. I.; HILLE, B.; STANLEY, M.; IDZERDA, R. L.; NATHANSON, N. M. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 13311-13316, 1997.

HEBB, D. O. The Organization of Behaviour. Wiley, New York, 1949. *Apud* Van PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Neuroscience,** 1: 191-198, 2000.

ISAACS, K. R.; ANDERSON, B. J.; ALCANTARA, A. A.; BLACK, J. E.; GREENOUGH, W. T. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. **J Cereb Blood Flow Metab,** 12, 110-119, 1992.

ISOKAWA, M. Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patientes with temporal lobe epilepsy. **Brain Reseach,** 744: 339-343, 1997.

JI, D.; DANI, J. A. Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activition of nicotinic receptors on hippocampal interneurons. **J Neurophysiol**, 83(5): 2682-2690, 2000.

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

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hipocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 386: 493-495, 1997b.

KEMPERMANN, G.; BRANDON, E. P.; GAGE, F. H. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Current Biology**, 8: 939-942, 1998a.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **J Neuroscience**, 18(9): 3206-3212, 1998b.

KEMPERMANN, G.; Van PRAAG, H.; GAGE, F. H. Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. **Progress Brain Reseach,** 127: 35-47, 2000.

KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis. **Developmental Brain Research**, 134: 1-12, 2002.

KEMPERMANN, G.; GAST, D.; GAGE, F. H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Ann Neurol**, 52:135-143, 2002.

KRAMER, A. F.; HAHN, S.; COHEN, N.J.; BANICH, M. T.; McAULEY, E.; HARRISON, C. R.; CHASON, J.; VAKIL, E.; BARDELL, L.; BOILEAU, R. A.; COLCOMBE, A. Aging, fitness and neurocognitive function. **Nature,** 400: 418-419, 1999.

MORRIS, G. F.; MATHEWS, M. B. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. **J Biological Chemistry**, 264(23): 13856-13864, 1989.

LAMPRECHT, R. CREB: a message to remember. **Cell Mol Life Sci**, 55: 554-563, 1999.

LAURIN, D.; VERREAULT, R.; LINDSAY, J.; MacPHERSON, K.; ROCKWOOD, K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch Neurol,** 58: 498-504, 2001.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z.; BENGZON, J.; ELMER, E.; KOKAIA, M. Neurotrophins and brain insults. **Trends Neuroscience**, 17: 490-496, 1994.

LOTHMAN, E. W.; REMPE, D. A.; MANGAN, P. S. Changes in excitatory neurotransmission in the CA1 region and dentate gyrus in a chronic model of temporal lobe epilepsy. **J Neurophisiol,** 74: 841-848, 1995.

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

MATYAS, F.; FREUND, T. F.; GULYÁS, A. I. Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of the mouse strains used in transgenic technology. **Hippocampus**, 14:460-481, 2004.

McNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J Neuroscience,** 14: 3413-3425, 1994.

McQUISTON, A. R.; MADISON, D. V. Muscarinic receptor activity has multiple effects on the resting membrane potentials of CA1 hippocampal interneurons. **J Neuroscience**, 19: 5693-5702, 1999a.

McQUISTON, A. R.; MADISON, D. V. Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. **J Neuroscience**, 19: 2887-2896, 1999b.

MEECKE, H. J.; VEITH, G. Hippocampal sclerosis in epilepsy. In: Luders, H. (ed.) **Epilepsy surgery,** Raven Press, New York, 1991, pp. 705-715.

MELLO, L. E.; CAVALHEIRO, E. A.; TAN, A. M.; PRETORIUS, J. K.; BABB, T. L.; FINCH, D. M. Granule cell dispersion in relation to mossy fiber sprouting, hippocampal cell loss, silent period and seizure frequency in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res,** (Suppl) 9: 51-59, 1992.

MORRIS, R. G. M.; HAGAN, J. J. Hippocampal electrical activity and ballistic movement. In: Seifert, W. ed . Neurobiology of the hippocampus. London: Academic Press, 1983.

MU, J. S.; LI, W. P.; YAO, Z. P.; ZHOU, X. F. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. **Brain Reseach**, 835: 259-265, 1999.

NAKKEN, K. O.; BJORHOLT, P. G.; JOHANNESSEN, S. I.; LOYNING, T.; LIND, E. Effect of physical training on aerobic capacity, seizure occurrence, and serum level of antiepileptic drugs in adults with epilepsy. **Epilepsia,** 31(1): 88-94, 1990.

NASCIMENTO, A. L. Avaliação Temporal de Neurônios Fluoro Jade B positivos na Formação Hipocampal de camundongos após indução do *Status Epilepticus* por pilocarpina. Campinas, 2004, 70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

NEEPER, S. A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. W. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res,** 726: 49-56, 1996.

NEEPER, S. A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. W. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**, 373: 109, 1997.

ODDIE, S. D.; BLAND, B. H. Hippocampal formation theta activity and movement selection. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, 22 (2): 221-231, 1998.

OLNEY, J. W. Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, 164: 719-721, 1969.

ONISHI, B. K. A. Coloração de Nissl por Violeta de Cresila. In: Xavier, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso.** 1ª Ed., Editora Plêiade, São Paulo, 1999, pp. 93-104.

PARENT, J. M.; YU, T. W.; LEIBOWITZ, R. T.; GESCHWIND, D. H.; SLOVITER, R. S.; LOWENSTEIN, D. H. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **J Neuroscience,** 17(10): 3727-3738, 1997.

PARENT, J. M. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. **Epilepsy Res,** 50: 179-189, 2002.

PARENT, J. M.; LOWENSTEIN, D. H. Seizure-induced neurogenesis: are more neurons good for an adult brain? **Progress Brain Reseach,** 135: 121-131, 2002.

POLSTER, M. R.; NADEL, L.; SCHASCTER, D. L. Cognitive neuroscience analyses of memory. A historical perspective. **Journal of Cognitive Neuroscience**, 3: 95-117, 1991.

RANKIN, S. L.; PARTLOW, G.D.; McCURDY, R. D.; GILES, E. D.; FISHER, K. R. S. The use of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry with a unique functional marker to detect postnatal neurogenesis in paraffin-embedded sections of the mature pig brain. **Brain Research Protocols**, 13:69-75, 2004.

RHODES, J. S.; GARLAND, T.; GAMMIE, S. C. Patterns of brain activity associated with variation in voluntary wheel-running behavior. **Behavioral Neuroscience,** 17 (6): 1243-1256, 2003.

RIBAK, C. E.; DASHTIPOUR, K. Neuroplasticity in the damaged dentate gyrus of the epileptic brain. **Progress Brain Reseach,** 136:319-328, 2002.

ROTH, L. D.; GOODE, K. T.; WILLIANS, V. L.; FAUGHT, E. Physical exercise, stressful life experience, and depression in adults with epilepsy. **Epilepsia,** 35(6): 1248-1255, 1994.

SANABRIA, E. R. G.; CAVALHEIRO, E. A. Epileptogênese: Contribuição dos modelos experimentais. In: GUERREIRO, C. A. M.; GUERREIRO, M. M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. **Epilepsia**, 3ª Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 2000, pp. 29-57.

SANTOS, N. F. **Desenvolvimento do modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em camundongos.** São Paulo, 1995, 61 p. Dissertação (Mestrado em Neurociência). UNIFESP – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

SANTOS, A. M. G. **Aprendizagem e Memória no Labirinto Aquático de Morris**. In: Xavier, G. F. Técnicas para o estudo do sistema nervoso. 1ª Ed., Editora Plêiade, São Paulo, 1999, pp. 131-154.

SCHINDER, A. F.; POO, M. M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. **Trends Neuroscience**, 23: 639-645, 2000.

SCHUMED, L. C.; HOPKINS, K. J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. **Brain Research,** 874: 123-130, 2000.

SILVA, A. J.; KOGAN, J. H.; FRANKLAND, P. W. CREB and memory. **Ann Rev Neurosci**, 21: 127-148, 1998.

SLOVITER, R. S. The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol,** 35: 640-654, 1994.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys and humans. **Psychol Rev**, 99: 195-231, 1992.

STEINER, B.; KRONENBERG, G.; JESSBERGER, S.; BRANDT, M. D.; REUTER, K. KEMPERMANN, G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesisin mice. **Glia**, 46(1): 41-52, 2004.

SYNTICHAKI, P.; TAVERNARAKIS, N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? **Nature Reviews Neuroscience**, 4: 672-684, 2003.

TAKEI, Y.; HARADA, A.; TAKEDA, S.; KOBAYASHI, K.; TERADA, S.; NODA, T.; TAKA HIROKAWA, N. Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. **J Cell Biol**, 131: 1789-1800, 1995.

TAO, X.; FINKBEINER, S.; ARNOLD, D. B.; SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. Ca^{2+} influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. **Neuron**, 20: 709-726, 1998.

TAUCK, D.; NADLER, J. V. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. **J Neuroscience,** 5: 1016-1022, 1985.

TREJO, J. L.; CARRO, E.; TORRES-ALEMÁN, I. Circulating Insuline-Like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus. **J Neuroscience,** 21(5): 1628-1634, 2001.

TREJO, J. L.; CARRO, E.; NUNEZ, A.; TORRES-ALEMÁN, I. Sedentary life impair self-reparative processes in the brain: the role of serum insulin-like growth factor I. **Rev. Neurosc,** 13(4): 365-74, 2002.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res,** 9: 315-335, 1983a.

TURSKI, W. A.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. **Experientia,** 39: 1408-1411, 1983b.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; BORTOLOTTO, Z. A.; MELLO, L. M.; SCHWARZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: electroencephalographic and morphologicals analysis. **Brain Research**, 321: 237-253, 1984.

Van PRAAG, H.; CHRISTIE, R. B.; SEJNOWSKI, T. J.; GAGE, F. H. Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci USA,** 96(23): 13427-13431, 1999a.

Van PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H.; Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience,** 2(3): 266-270, 1999b.

Van PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Neuroscience,** 1: 191-198, 2000.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Interplay betweenBDNF and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic plasticity. **Neuroscience**, 122: 647-657, 2003.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **European J Neuroscience,** 20: 2580-2590, 2004.

YIN, J. C. P.; TULLY, T. CREB and the formation of long-term memory. **Current Opinion Neurobiology**, 6: 264-268, 1996.

YOUNG, D.; LAWLOR, P. A.; LEONE, P.; DRAGUNOW, M.; DURING, M. J. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizure and is neuroprotective. **Nat Med,** 5(4): 448-453, 1999.

ZHOU, J.; ZHANG, F.; ZHANG, Y. Corticosterone inhibits generation of long-term potentiation in rat hippocampus slice: involvement of brain-derived neurotrophic factor. **Brain Research**, 885: 182-191, 2000.

Anexos

Tabela 1. Volume de atividade física na deambulação em kilômetros ao longo do período de 28 dias.

	KM/DIA													
ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1SC	5,10	3,99	3,17	1,55	1,22	1,06	0,20	0,05	4,73	4,81	4,49	4,20	5,68	6,17
2SC	7,20	3,98	2,63	2,50	1,74	2,15	2,09	2,69	3,86	3,67	6,30	5,81	6,66	6,76
3SC	3,90	2,27	4,04	4,10	3,59	5,54	4,67	5,35	4,54	4,98	3,90	4,47	3,98	4,40
4SC	4,55	3,37	3,16	3,88	4,68	4,37	4,12	6,34	5,82	4,16	7,17	8,12	7,32	7,83
5SC	6,04	4,64	5,10	6,05	6,90	7,82	9,27	8,76	8,98	8,08	8,72	8,81	9,83	9,40
6SC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,51	2,67
7SC	6,21	4,42	4,31	3,83	9,45	5,03	5,24	5,61	5,17	5,99	5,32	5,57	9,95	4,70
8SC	6,66	3,57	3,87	4,39	5,29	4,61	4,57	5,25	5,01	4,15	3,49	3,33	2,98	3,25
1EC	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
2EC	0,24	0,73	6,19	3,92	5,55	1,92	0,47	0,07	0,05	0,13	0,91	0,05	0,07	0,17
3EC	0,01	0,73	4,01	2,68	1,07	0,42	0,71	0,53	0,11	0,40	0,55	0,52	0,32	0,13
4EC	0,04	0,07	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,17	0,00	1,57	0,01	0,00
5EC	0,59	3,82	5,21	5,39	5,30	5,47	5,19	4,69	3,68	3,52	4,25	4,31	2,85	4,01
6EC	0,03	2,57	3,01	4,25	3,86	3,44	2,55	3,16	0,00	3,81	1,95	2,96	0,01	0,02
7EC	4,06	4,16	4,79	4,69	4,95	5,83	5,59	5,86	6,80	5,18	5,70	4,94	5,96	5,17
8EC	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

	KM/DIA													
ANIMAL	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1SC	6,26	6,91	7,08	8,19	6,53	8,51	8,69	7,32	8,52	7,10	7,48	7,21	8,69	7,99
2SC	6,83	5,57	5,40	6,17	7,42	7,31	7,72	6,93	8,07	5,43	5,39	4,06	6,83	6,64
3SC	2,73	3,52	4,30	3,92	3,69	4,41	3,84	3,10	3,64	3,40	2,82	3,02	3,38	3,28
4SC	7,52	8,37	11,16	9,64	10,30	11,19	10,56	10,86	11,94	11,72	11,58	10,78	10,93	10,62
5SC	9,04	9,57	9,61	9,30	8,56	9,58	9,67	9,34	9,53	9,57	10,19	10,60	9,79	9,31
6SC	3,73	2,96	3,03	3,17	1,82	0,00	0,00	0,00	3,23	2,87	1,80	2,24	3,60	3,15
7SC	4,92	5,62	5,65	5,73	5,98	5,73	6,56	6,82	6,65	7,20	11,43	12,82	5,64	6,89
8SC	2,98	4,54	3,34	4,22	4,34	3,63	3,53	5,67	3,90	3,59	3,32	4,86	4,37	4,46
1EC	0,42	0,85	0,92	0,87	0,37	1,34	2,22	2,91	2,98	2,68	2,31	3,19	2,98	2,81
2EC	0,14	0,74	0,47	0,41	0,82	0,93	1,78	1,48	1,29	0,63	0,52	0,77	1,39	0,69
3EC	0,00	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,01	0,01	0,00	0,07	0,01
4EC	0,01	0,37	0,00	0,03	0,06	0,03	0,02	0,07	1,32	0,61	0,18	0,92	1,69	1,06
5EC	1,78	3,16	2,83	4,15	3,61	3,24	2,73	2,81	2,38	1,45	1,87	2,34	2,31	1,42
6EC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,06
7EC	4,76	4,26	3,78	4,50	3,79	3,96	3,90	4,48	5,60	5,07	4,39	5,06	6,31	5,59
8EC	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01

SC – sudável corredor, EC – epiléptico corredor.

Tabela 2. Valores médios da latência para encontrar a plataforma em cada sessão do teste

ANIMAL	LATÊNCIA (Seg)			
	Sessão 1	**Sessão 2**	**Sessão 3**	**Sessão 4**
1 SS	58,25	94	102	33,25
2 SS	66	70,5	33,5	24,75
3 SS	79,75	25,25	22,25	32,75
4 SS	87	77	63,25	53,5
5 SS	76,25	39,5	48,25	34,5
6 SS	61,25	65,5	59,75	61,5
7 SS	86	34,25	21,75	26
8 SS	96	73,5	91	20,5
1 ES	120	120	92,25	99,5
2 ES	120	120	120	120
3 ES	120	120	120	120
4 ES	120	120	85	120
5 ES	120	120	120	120
6 ES	96	120	120	120
7 ES	120	120	120	120
8 ES	120	120	120	120
1 SC	120	31,25	7,75	5,25
2 SC	120	101	94,5	54
3 SC	106	14,25	25,25	17
4 SC	99	53	15,5	10
5 SC	69	78	58,75	51
6 SC	100,75	17	27,25	10,5
7 SC	120	120	71,25	20,75
8 SC	44,75	27,75	42	28,25
1 EC	115,75	76,5	103,25	29
2 EC	75,5	41,75	38,5	33,5
3 EC	120	97,25	120	120
4 EC	100,5	84,5	78,5	99,5
5 EC	120	120	120	120
6 EC	120	119,25	51,5	45
7 EC	120	120	101,5	75,75
8 EC	94,75	78	48,5	97,5

do labirinto aquático de Morris.

SS–saudável sedentário, ES–epiléptico sedentário, SC–saudável sedentário, EC–epiléptico sedentário.

ANIMAL	1º BIN	2º BIN	3ºBIN
1 SS	8	5	2
2 SS	8	8	6
3 SS	4	4	4
4 SS	11	8	9
5 SS	0	4	2
6 SS	8	9	6
7 SS	7	9	5
8 SS	1	2	1
1 ES	1	0	0
2 ES	6	9	3
3 ES	1	0	0
4 ES	1	2	2
5 ES	2	0	1
6 ES	0	0	0
7 ES	1	0	0
8 ES	0	1	4
1 SC	12	9	8
2 SC	7	5	6
3 SC	12	8	7
4 SC	9	8	4
5 SC	3	2	1
6 SC	10	4	2
7 SC	11	12	10
8 SC	5	4	6
1 EC	6	0	4
2 EC	2	4	1
3 EC	3	4	1
4 EC	11	8	2
5 EC	0	1	0
6 EC	1	1	2
7 EC	2	1	0
8 EC	6	3	0

Tabela 3. Número de entradas no contador crítico em cada BIN ao longo do *probe test*. SS–saudável sedentário, ES–epiléptico sedentário, SC–saudável sedentário, EC–epiléptico sedentário.

Tabela 4. Valores dos escores atribuídos à lesão histológica, evidenciada pela coloração

ANIMAL	LESÃO (escore)			
	CA1	**CA3**	**HILO**	**CG**
1 ES	1	2	3	0
2 ES	0	2	3	0
3 ES	1	2	2	2
4 ES	0	2	2	0
5 ES	3	2	3,5	0
1 EC	0	0	2	0
2 EC	2	4	2	2
3 EC	0	0	1	0
4 EC	1,5	1,5	2	2
5 EC	4	2	3	1

com violeta de cresila, nas regiões da formação hipocampal avaliadas.
ES – epiléptico sedentário, EC – epiléptico corredor, CG – camada granular.

Tabela 5. Número de neurônios em degeneração evidenciados pela marcação com Fluoro Jade B nas regiões da formação hipocampal avaliadas.

ANIMAL	NÚMERO DE CÉLULAS FJ B +/mm2			
	CA1	CA3	HILO	CG
1 ES	0	0	0	0
2 ES	0	0	0	0
3 ES	2623,5	0	1450,6	185,2
4 ES	0	1605	0	0
5 ES	4012,3	1234,5	462,9	0
1 EC	0	462,9	0	0
2 EC	2222,2	1111,1	339,5	1820,9
3 EC	0	0	0	0
4 EC	555,5	1234,5	462,9	0
5 EC	0	0	0	0

ES – epiléptico sedentário, EC – epiléptico corredor, CG – camada granular.

Tabela 6. Número total de células imunorreativas para PCNA contadas em secções representativas do giro denteado da formação hipocampal.

ANIMAL	NÚMERO DE CÉLULAS PCNA +			
	CG	HILO/CG	CM	TOTAL
1 SS	13	3	0	16
2 SS	24	1	0	25
3 SS	15	0	0	15
4 SS	1	0	0	1
5 SS	3	0	0	3
1 ES	11	6	0	17
2 ES	13	1	0	14
3 ES	8	27	3	38
4 ES	12	4	0	16
5 ES	28	12	0	40
1 SC	9	7	0	16
2 SC	0	0	0	0
3 SC	14	2	0	16
4 SC	1	0	0	1
5 SC	20	2	0	22
1 EC	0	0	0	0
2 EC	0	0	0	0
3 EC	10	7	2	19
4 EC	0	0	0	0
5 EC	7	3	1	11

SS–saudável sedentário, ES–epiléptico sedentário, SC–saudável sedentário, EC–epiléptico sedentário.