

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FERNANDA CAMPOS PELAGIO



Participação do óxido nítrico no modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina e sua relação com o efeito da atividade física voluntária sobre a memória espacial de camundongos

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Fernanda Campos Pelagio
e aprovada pela Comissão Julgadora.

A handwritten signature in blue ink that appears to read "Fernanda Campos Pelagio".

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

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P361p	Pelagio, Fernanda Campos Participação do óxido nítrico no modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina e sua relação com o efeito da atividade física voluntária sobre a memória espacial de camundongos / Fernanda Campos Pelagio. – Campinas, SP: [s.n.], 2006. Orientador: Francesco Langone. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Epilepsia. 2. Atividade física. 3. Pilocarpina. 4. Óxido nítrico. 5. Memória espacial. I. Langone, Francesco. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
--------------	--

(scs/ib)

Título em inglês: Nitric oxide involvement in the experimental epilepsy induced by pilocarpine and its relationship with the voluntary physical activity effects on mice spatial memory.

Palavras-chave em inglês: Epilepsy; Physical activity; Pilocarpine; Nitric oxide; Spatial memory.
Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Francesco Langone, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Simone Aparecida Teixeira.

Data da defesa: 01/12/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 01 de dezembro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)



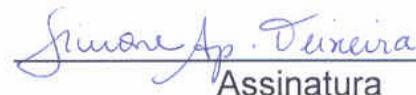
Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes de Moraes Ferrari



Assinatura

Profa. Dra. Simone Aparecida Teixeira



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada



Assinatura

Profa. Dra. Anna Maria Fernandes



Assinatura

“Onde quer que eu esteja Senhor, em um vale ou alta montanha, o que faz o meu dia ter cor é a beleza da Tua companhia. Não importa o lugar, se comigo o Senhor está, com muito ou pouco sou feliz. Não importa o que está do lado de fora, És o meu tesouro e estás dentro de mim. Tua presença, Tua presença faz toda a diferença. Tua presença, Tua presença transforma o meu deserto em um jardim secreto, lugar de intimidade Contigo, Tu és tudo o que eu preciso. Eu prefiro estar num deserto e ter o Senhor bem por perto. Se guiado por Teu espírito sou, não importa o lugar onde estou, eu não temerei.”

(Ana Paula Valadão Bessa)

Obrigada amado Senhor Jesus! Muito obrigada pela grande vitória conquistada. Tu és a Estrela da Manhã que reina em meu coração, a Força que me sustenta, a minha Torre Forte. Em Teus braços posso descansar e caminhar na certeza de que todas as coisas cooperam para o meu bem, pois eu te amo. Obrigada por me fazer crescer e ter a consciência de que eu não sou nada sem Ti. Assim como entreguei a minha vida a Ti, entreguei também a realização deste projeto. E Tu, mais uma vez, mostrou-me a Tua eterna fidelidade. Obrigada por nunca desistir de mim e sempre me tratar com grande amor e infinita misericórdia. Ofereço esta grande conquista a Ti para que mais uma vez Seu nome seja glorificado.

Agradecimentos

Agradeço ao meu amado esposo Vitor pelo cuidado, atenção, paciência e grande amor. Por transmitir-me segurança e carinho durante toda a jornada em que estive tão distante. Muito obrigada pelas palavras de encorajamento e infinitas horas em que permaneceste em oração. Meu amado, esta é a nossa vitória. Glória a Deus!

Aos meus pais Euclides e Maria de Lourdes pelo maravilhoso apoio, encorajamento e grandioso amor. Muito obrigada por acreditarem na minha constante dedicação a este projeto. Por suportar a distância e esperar pacientemente por este momento. Pelas intensas orações que, indiscutivelmente, foram recebidas por Deus. Amo vocês! Recebam esta vitória como prova da minha eterna gratidão.

Às minhas irmãs Luciana, Rafaela e Camila pelo imenso carinho e constante incentivo. Vocês são muito especiais e muito abençoadas por Deus. Agradeço ao Senhor por estreitar os nossos laços fraternais e fortalecer o cordão de três dobras.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francesco Langone pela disposição em me ensinar o que é ser um pesquisador e compartilhar parte do seu rico conhecimento acadêmico e científico. Pela sua amizade, paciência, dedicação e, especialmente, por acreditar na minha sincera disposição e desejo de realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari por disponibilizar o espaço e a infra-estrutura do seu laboratório para a realização dos testes comportamentais e demais procedimentos experimentais. Obrigada pela amizade, carinho e pelo agradável convívio.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará por abrir as portas de seu laboratório e permitir a realização das análises referentes ao óxido nítrico. Agradeço também pela disposição em auxiliar-me na interpretação e discussão destes resultados.

À Dra. Simone Aparecida Teixeira por se dispor a ensinar-me e auxiliar-me na realização das análises referentes ao óxido nítrico. Obrigada “Simon” por sua sincera amizade, carinho e agradável companhia. Sua participação foi determinante para o enriquecimento deste trabalho. Receba meus sinceros agradecimentos.

Ao Sr. Eduardo Veiga pela disposição em auxiliar na manutenção dos equipamentos para proporcionar a atividade física aos animais, os quais foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA/MA, Campinas), Paulinho e Israel, por serem tão prestativos em todos os momentos em que solicitei os animais utilizados neste trabalho.

Ao colega César Renato Sartori por me ensinar o modelo de epilepsia induzida por pilocarpina em camundongos e auxiliar-me nos demais procedimentos experimentais. Saiba que sua ajuda foi fundamental para a elaboração deste trabalho.

Ao colega André Luiz do Nascimento pela disposição em auxiliar-me durante todo o período do mestrado e também pela parceria na elaboração de projetos paralelos a este trabalho.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia Alexandre, André Vieira, César, Cristiane, Débora, Fábio, Fernanda, Gustavo e Rafael pela memorável convivência. Obrigada pelos momentos de descontração e pelo apoio durante toda a construção deste trabalho.

Aos amigos Alexandre e Simone Rezende pela valiosa amizade e constante carinho. Obrigada pelo inestimável apoio e por compartilhar momentos de efêmeras tristezas e grandes alegrias, com muitas gargalhadas.

À amiga Cristiane não só pela preciosa ajuda durante a realização deste trabalho, mas também pelos valiosos momentos que passamos juntas. Obrigada pelo seu carinho e amizade.

À colega Michele Peres por me ajudar durante a realização do water maze e por me oferecer sua amizade. Obrigada pelo grande apoio.

Aos colegas do laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento Elaine, Fernando, Magda e Maria Isabel pelo maravilhoso apoio na qualificação e divertidos momentos que passamos juntos.

Aos admiráveis amigos Cinthia, Ivanira e José de Oliveira, Maria Cláudia e Mário Campos, Maria Lucília e Ronaldo Araújo, Andréa e Alexandre Chagas, Adriana e Onestaldo Alfaro, Cida Pelim, Vera Miranda, Aline Claro, Eli Cristina pelo apoio, amor e pelas preciosas orações. Vocês foram demais, muito obrigada!

Por fim agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a consumação deste trabalho.

Agradecimentos Institucionais

Agradeço á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por conceder a bolsa de mestrado.

Ao Laboratório de Radicais Livres –ICB1 da USP por fornecer o espaço e a infra-estrutura indispesáveis para a realização de procedimentos experimentais evolvidos neste trabalho.

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

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

Lista de tabelas e figuras

Figura 1 - Representação esquemática das reações catalisadas pelas NOS	8
Figura 2 - Ativação da nNOS no SNC	12
Tabela 1 - Grupos e Procedimentos Experimentais	25
Figura 3 - Gaiolas equipadas com roda de atividade	28
Figura 4 - Labirinto Aquática	31
Tabela 2 - Escores utilizados na avaliação do grau de lesão neuronal	34
Tabela 3 - Gel de Corrida	37
Tabela 4 - Gel de Concentração	38
Figura 5 - Gráfico dos valores de atividade física diária (VAF)	42
Figura 6 - Gráfico dos valores médios de latência para encontrar a plataforma	44
Figura 7 - Freqüência de entradas no contador crítico durante <i>probe test</i>	45
Figura 8 - Escores atribuídos às lesões histológicas evidenciadas pela coloração com violeta de cresila	47
Figura 9 - Avaliação da perda neuronal: região CA1	48
Figura 10 - Avaliação da perda neuronal: região CA3	50
Figura 11 - Avaliação da perda neuronal: região do Giro Denteado	52
Figura 12 - Imunomarcação para nNOS na região CA1	55
Figura 13 - Imunomarcação para nNOS na região CA3	57
Figura 14 - Imunomarcação para nNOS na região CA3 próxima ao Giro Denteado	59
Figura 15 - Imunomarcação para nNOS na região do Giro Denteado	61
Figura 16 (A) - Western blot representativo da proteína nNOS	64
Figura 16 (B) - Gráfico das intensidades relativas das bandas da proteína nNOS	64
Figura 17 (A) - Western blot representativo da proteína nNOS	65
Figura 17 (B) - Gráfico das intensidades relativas das bandas da proteína nNOS	65
Figura 18 - Gráfico da atividade da NOS dependente de Ca^{2+}	67
Figura 19 - Gráfico da atividade da NOS independente de Ca^{2+}	68

Tabela 5 - Volume de atividade física médio diário ao longo de 28 dias	111
Tabela 6 - Valores médios da latência durante o teste do labirinto aquático	112
Tabela 7 - Número de entradas no contador crítico durante o <i>probe test</i>	113
Tabela 8 - Valores dos escores atribuídos às lesões histológicas	114
Tabela 9 - Valores da atividade da NOS dependente de Ca ²⁺	115
Tabela 10 - Valores referentes à atividade da NOS independente de Ca ²⁺	116
Tabela 11 - Valores referentes à intensidade relativa das bandas de nNOS detectadas por western blot	117

Lista de Abreviaturas

ANOVA - Análise de variância

Akt - Proteína quinase serina-treonina

BH₄ - Tetrahidrobiopterina

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

CaM - Calmodulina

CAPON - C-terminal PDZ ligand of nNOS

CAT - Catalase

CREB - cAMP response element binding protein

Ct- Grupo controle

CtC - Grupo controle corredor (animais controle que desenvolveram atividade física espontânea)

CtS - Grupo controle sedentário (animais controle que não desenvolveram atividade física espontânea)

DAB - Diaminobenzidina

dNOS - Atividade da NOS dependente de cálcio

EGTA - Ácido etileno glicol-bis (β-amino éter) N, N, N', N'-tetracético

ELT - Epilepsia do lobo temporal

ELTM - Epilepsia mesial do lobo temporal

EPM - Erro padrão da média

EROS - Espécies reativas de oxigênio

eNOS - Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase

FAD - Flavina Adenina dinucleotídeo

FH - Formação hipocampal

FMN - Flavina mononucleotídeo

GPX - Glutationa peroxidase

GR - Glutationa redutase

GTP - Guanosina trifosfato

iNOS - Isoforma induzível da óxido nítrico sintase

kDa - Kilo Dalton

LA - Labirinto aquático

L-NAME - N-nitro-L-arginina metil éster

LTD - Depressão a longo prazo
LTP - Potenciação a longo prazo
MAPK- Mitogen-activated protein kinase
mtNOS - Isoforma mitocondrial da óxido nítrico sintase
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
NO - Óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase
NOSIP - Proteína de interação da NOS
nNOS - Isoforma neuronal da óxido nítrico sintase
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NHA - N-ω-hidroxi-L-arginina
NMDA - N-metil D-aspartato
NMDAR - Receptores de NMDA
P - Pilocarpina
PBS - Phosphate-buffered saline (tampão fosfato salino)
PC - Grupo pilocarpina corredor (animais submetidos ao SE por pilocarpina e que desenvolveram atividade física espontânea)
PLC-γ - Fosfolipase C-γ
PIN - Proteína inibitória da isoforma neuronal da NOS
PI3-K - Fosfatidilinositol-3 quinase
PR - Pilocarpine runner
PS - Grupo pilocarpina sedentário (animais submetidos ao SE por pilocarpina e que não desenvolveram atividade física espontânea)
PSD-95 - Proteína de densidade pós-sináptica
RCD - Derivados de carbonila reativos
ROS - Reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)
RNS - Reactive nitrogen species (espécies reativas de nitrogênio)
SE - *Status epilepticus*
SDS-PAGE - Sodium dodecyl-sulfate poliacrylamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamina em condições denaturantes – dodecil sulfato de sódio)
SNC - Sistema nervoso central
SOD - Superóxido dismutase
TEMED - N, N, N', N'- tetrametil-etileno-diamino
Tris - Tris-[Hidroximetil] aminometano

TrkB - Receptor tirosina quinase B

VAF – Volume de atividade física

VDCCs - Canais de cálcio voltagem dependente

WM - Water Maze

Sumário

Resumo	<i>xvi</i>
Abstract	<i>xvii</i>
1. Introdução	1
2. Objetivos	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1 Animais e grupos experimentais	25
3.2 Indução do <i>status epilepticos</i>	26
3.3 Condições de atividade física	26
3.4 Teste do Labirinto Aquático	29
3.5 Análise histológica e imunoistoquímica	32
3.5.1 Perfusion e obtenção dos cortes histológicos	32
3.5.2 Coloração de Nissl com violeta de cresila e avaliação da perda neuronal	33
3.5.3 Imunoistoquímica para isoforma neuronal da NOS	34
3.6 Análise bioquímica e molecular	35
3.6.1 Dissecção do hipocampo	35
3.6.2 Análise da atividade de NOS	35
3.6.3 Análise da expressão protéica da nNOS	36
3.7 Testes estatísticos	39
4. Resultados	41
4.1 Alterações comportamentais resultantes da administração de pilocarpina	41
4.2 Volume de atividade física (VAF)	41
4.3 Teste do Labirinto Aquático	43
4.3.1 Memória de referência espacial	43
4.3.2 <i>Probe Test</i>	45
4.4 Análise histológica	46
4.4.1 Coloração de Nissl e avaliação da perda neuronal	46
4.4.1.1 Giro denteado	46
4.4.1.2 Camada piramidal	47
4.4.2 Avaliação Imunoistoquímica	54
4.5 Expressão protéica da NOS neuronal	63
4.6 Atividade de Óxido Nítrico Sintase	66
4.6.1 NOS dependente de Ca^{2+}	66
4.6.2 NOS independente de Ca^{2+}	66
5. Discussão	69
6. Conclusões	89
7. Referências Bibliográficas	91
Anexos	111

Resumo

A atividade física contribui positivamente para a plasticidade cerebral facilitando processos neuroadaptativos e neuroprotetores. Diversos estudos relatam os efeitos positivos da prática de atividade física sobre os processos de aprendizado e memória. Indução de *status epilepticus* (SE) por pilocarpina provoca lesão na formação hipocampal e distúrbios de memória. O óxido nítrico (NO) tem participação nos processos neurais de aprendizado e memória. Recentemente, evidências apontam para uma provável participação do NO nos mecanismos intracelulares de pró-sobrevivência ativados pela atividade física. Por outro lado, diversos estudos sugerem um possível envolvimento do NO na fisiopatologia da epilepsia. Entretanto, estes estudos são controversos e não esclarecem o papel do NO nas crises epiléticas. Assim, o presente trabalho investigou a participação do óxido nítrico no modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina e sua relação com o efeito da atividade física voluntária sobre a memória espacial. Camundongos Swiss adultos foram submetidos à indução SE por pilocarpina (P) e então sacrificados: 1 dia (1d), 7 dias (7d), 21 dias (21d) e 35 dias (35d) após SE. Os animais controles (Ct) foram tratados com salina e sacrificados nos mesmos tempos. Os animais anestesiados e em seguida sacrificados 35d após SE foram denominados: controle corredor (CtC), pilo corredor (PC), controle sedentário (CtS) e pilo sedentário (PS). Dois dias após SE, os animais do grupo PC e CtC tiveram acesso livre à roda de corrida durante 28 dias. Após este período, os animais dos grupos CtS, CtR, PS e PR foram testados no labirinto aquático (LA) para avaliação da memória de referência espacial. Quatro animais dos grupos CtS, CtC, PS e PC foram perfundidos com paraformaldeído e os cérebros removidos e processados histologicamente. Cortes frontais do cérebro (5 μ m) foram obtidos para avaliar a lesão tecidual (coloração de Nissl) e analisar a distribuição dos neurônios nitrérgicos (nNOS) na formação hipocampal dorsal. Outros cinco animais de cada grupo foram decapitados, o hipocampo rapidamente dissecado e congelado em nitrogênio líquido. Homogenato de hipocampo foi utilizado para a avaliação da atividade da NOS dependentes (dNOS) e independente de Ca²⁺ (iNOS), pela técnica da [3H]-L-Arginina e para a análise da expressão protéica da nNOS por *Western blotting*. Os animais dos grupos PS e PC apresentaram lesão neuronal e neurodegeneração que não diferiram entre sedentários e corredores. Os animais do grupo PC apresentaram desempenho no teste do LA superior ao registrado no PS e similar ao registrado nos CtS e CtC. Os grupos que sofreram indução de SE apresentaram redução da atividade da dNOS 1 dia após SE que se acentuou com o tempo. A expressão da nNOS reduziu 1 e 7 dias após o SE quando comparado ao grupo controle. A atividade da iNOS não se alterou 1 dia e 7 dias após SE, mas exibiu significativo aumento no grupo P21d quando comparado com respectivo controle. A atividade da dNOS nos grupos PS e PC não diferiram e foram inferiores às observadas nos CtS e CtC. A expressão da nNOS não diferiu entre os grupos CtS, CtC, PS e PC, contudo o grupo PC apresentou uma tendência à redução da expressão da nNOS. Por fim, nossos resultados mostraram que os efeitos positivos da atividade física sobre a memória dos animais PC resultou da ativação de mecanismos moleculares talvez não diretamente mediados por NO. Além disso, nossos dados confirmam a importante participação do NO nos mecanismos fisiopatológicos da epilepsia e mostraram que as isoformas da NOS responsáveis pela sua produção são diferentemente afetadas pelo SE.

Abstract

Physical activity contributes to brain plasticity, facilitating neuroadaptive and neuroprotective processes. Many studies show the positive effects of physical activity practice in process of learning and memory. Pilocarpine-induced *status epilepticus* (SE) causes injury in hippocampal formation and disturbance in memory. Nitric oxide (NO) participates in neural processes of learning and memory. Recently, evidences showed a probable involvement of NO in pro-survival intracellular mechanisms activated by physical activity. On the other hand, several studies have suggested a possible role of NO in epilepsy pathophysiology. However, these studies have produced controversial results and do not explain the role of NO in epileptic seizures. Therefore, the present work investigated NO participation in experimental model of epilepsy induced by pilocarpine in mice and its relationship with voluntary physical activity effects on spatial memory. Swiss adult mice were submitted to pilocarpine-induced SE (P) and sacrificed after 1 day (1d), 7 days (7d), 21 days (21d) or 35 days (35d). Control animals (Ct) were treated with saline and sacrificed in the same time point. The animals sacrificed 35d after SE were named as control runner (CtR), pilo runner (PR), control sedentary (CtS) and pilo sedentary (PS). Two days after SE, the animals of PR and CtR group had access to a running wheel for 28 days. After that, CtS, CtR, PS and PR group's animals were tested in water maze (WM) for the referential spatial memory evaluation. Four animals of CtS, CtR, PS and PR groups were perfused with paraformaldehyde and their brains were removed and processed for paraffin embedding. Frontal sections of brains (5 μ m) were obtained for analysis of tissue damage (Nissl staining) and nitrergic neurons distribution (nNOS) in dorsal hippocampal formation. Moreover, hippocampus from five animals of each group were rapidly dissected and frozen in liquid nitrogen. Homogenates of hippocampus were used to evaluate the activity of calcium-dependent (dNOS) and calcium-independent (iNOS) NOS isoforms by [3H]-L-Arginine's technique and the neuronal NOS (nNOS) expression by *Western blotting*. Animals of PS and PR groups showed neuronal damage and neurodegeneration that did not differ between sedentaries and runners. In WM test, animals of PR group had better performance than PS and similar performance to the registered in CtS and CtR. Pilo's group showed a reduction of dNOS activity 1 day after SE, this reduction increased along the time. Moreover, nNOS expression reduced 1 day and to 7 days after SE when compared to control groups. iNOS activity did not change at 1 day and 7 days after SE, but it increased in P21d group when compared with respective control group. dNOS activity results were similar between PS e PR groups and these were lower than CtS and CtR. nNOS expression was similar in the CtS, CtR, PS and PR groups. However, PR group showed a shift to reduction of nNOS expression. Finally, our data showed that positive effects of physical activity on memory in PR group resulted from molecular mechanisms activation that maybe are not directly mediated by NO. Moreover, our work confirm the important of NO participation in epilepsy pathophysiological mechanisms and also showed that NOS isoforms responsible for NO production are differently affected by SE.

1. Introdução

1.1 Epilepsia: conceito, características e classificação

A epilepsia corresponde a um grupo de doenças que têm em comum crises epilépticas recorrentes as quais ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril. Tais crises podem assumir um caráter focal, quando há a disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo, ou serem generalizadas ao acometer uma área mais extensa envolvendo simultaneamente os dois hemisférios cerebrais. Em geral, as crises epiléticas são ocasionadas por descargas elétricas anormalmente intensas, síncronas e transitórias das células nervosas, sendo que as alterações comportamentais associadas às mesmas dependem do tipo de neurônio acometido. Contudo, 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).

As epilepsias e síndromes epilépticas classificam-se de acordo com as semelhanças no tipo de crise, idade de início, sinais clínicos associados, histórico familiar, achados neurológicos e prognóstico. Desta forma, são descritos no mínimo dezoito tipos diferentes de epilepsias e síndromes epilépticas que constam do quadro de classificação internacional. É importante reforçar que graças à melhor caracterização clínico-vídeo-eletroencefalográfica e ao conhecimento da história natural de muitas formas clínicas tornou-se 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).

Em particular, ELT apresenta grande importância clínica em razão da alta prevalência e gravidade, além de ser relativamente resistente ao tratamento medicamentoso

(GUEDES et al., 2006). Os pacientes portadores da ELT freqüentemente apresentam histórico familiar de epilepsia e antecedente de convulsão febril prolongada na infância. Na maioria das vezes, essa síndrome inicia-se na infância, embora sua manifestação possa ocorrer em qualquer idade. Aproximadamente 50% dos adultos portadores da epilepsia apresentam ELT, contudo o controle eficaz e completo das crises por meio do tratamento clínico ocorre em menos da metade desses indivíduos. Em geral, a ELT manifesta-se por crises parciais simples e complexas recorrentes, sendo raras as crises com generalização secundária (crises tônico-clônicas), e usualmente acometem as estruturas mesiais do lobo temporal. Em um segundo momento, é habitual existir um período silencioso, sem ocorrência de crises ou com crises de fácil controle. Tal fase estende-se das manifestações iniciais até o período no qual ocorrem crises espontâneas freqüentes ou refratárias à medicação (ENGEL, 1989; GUERREIRO et al., 2000).

Dentre as características clínicas, é comum aos pacientes com epilepsias mesiais do lobo temporal (ELTM) a ocorrência da aura que consiste em sintomas vegetativos, tais como o mal estar epigástrico e psíquico incluindo emoções como o medo, podendo ocorrer ainda sensações olfatórias ou gustativas. Tal fenômeno clínico advém imediatamente antes do início da crise propriamente. As crises parciais complexas geralmente possuem duração de 1 a 2 minutos e iniciam-se com parada de atividade e olhar fixo, sendo comuns automatismos orais. Na fase pós-ictal o paciente pode apresentar desorientação, amnésia do evento, postura distônica de mão (contralateral ao foco epileptogênico), alucinações visuais complexas, déficit de memória recente e afasia, se as crises tiverem início no hemisfério dominante (ENGEL, 1993; GUERREIRO et al., 2000).

É importante destacar que tanto os estudos de caráter clínico como os experimentais convergem sua atenção para a ELT principalmente quando associada à esclerose mesial

temporal (EMT). Esta abordagem justifica-se pela alta prevalência e pela resistência ao tratamento medicamentoso, como já mencionado. A EMT, incluindo a esclerose hipocampal, consiste na alteração patológica mais comum encontrada na ELT e é caracterizada pela perda específica de neurônios no hipocampo, giro parahipocampal e amígdala, com subsequente proliferação glial (GUEDES et al., 2006). Detalhadamente, observa-se a redução da densidade neuronal com um padrão característico, envolvendo predominantemente as regiões CA1, CA3, CA4 e giro dentado da formação hipocampal (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; GUEDES et al., 2006).

O aumento da suscetibilidade do tecido nervoso às crises epiléticas está relacionado a uma anormalidade no sistema de neurotransmissão, devido ao aumento da transmissão excitatória, ou pela diminuição da transmissão inibitória, ou por ambos. Em consequência, a neurotransmissão inadequada resulta em modificações importantes no metabolismo da célula neuronal representadas por alterações enzimáticas, ativação e fosforilação de proteínas envolvidas na sinaptogênese e na expressão gênica. Assim, inúmeros fatores podem estar envolvidos nas alterações neuroquímicas da ELT, tais como: neurotransmissão aminoacidérgica, proteínas ligantes de cálcio, enzimas como a ATPase Na^+/K^+ , fatores de transcrição, dentre outros (NAFFAH-MAZZACORATTI, 1998).

1.2 Modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina

Os modelos em animais fornecem dados inestimáveis a fim de proporcionar uma melhor compreensão da fisiopatologia das epilepsias. É notável a relevância destes modelos, pois demonstram uma epileptogenicidade similar à encontrada no tecido “epiléptico” em humanos (AVOLI et al., 2005). Diversos modelos em animais que reproduzem a ELT têm sido desenvolvidos em mamíferos com a finalidade de fornecer dados comportamentais, eletroencefalográficos e histológicos compatíveis com esta condição em humanos (LOTHMAN et al., 1995; ENGEL, 1996; ISOKAWA, 1997; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000). A maioria destes modelos tem como denominador comum a indução inicial do *status epilepticus* (SE) que pode ocorrer através de agentes farmacológicos ou por estimulação elétrica. Assim, denominam-se agudos os modelos nos quais o animal apresenta crises convulsivas somente durante a vigência do agente indutor, enquanto que os crônicos são caracterizados pela recorrência das crises em intervalos variados de tempo após a indução e podem acompanhar toda a vida do animal (NAFFAH-MAZZACORATTI, 1998; SANABRIA & CAVALHEIRO, 2000).

Dentre os modelos crônicos, destaca-se o modelo induzido pela administração de pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico, em ratos e camundongos que reproduz com grande fidelidade a ELT humana (CAVALHEIRO, 1995; CAVALHEIRO et al., 1996). Após um pré-tratamento com metilescopolamina para diminuição dos efeitos colinérgicos periféricos, a injeção intraperitoneal de 300-380 mg/kg de pilocarpina nesses animais induz uma série de alterações comportamentais e eletroencefalográfica. Tais alterações evoluem para um estado de crises contínuas (clônicas) que caracterizam o *status epilepticus* (SE) e podem durar 24 horas (fase aguda). Em um segundo momento, segue-se

uma fase silenciosa, com duração de 4 a 44 dias, durante a qual há a normalização das alterações comportamentais e eletroencefalográficas. Finalmente, com a ocorrência da primeira crise espontânea, inicia-se a fase crônica, na qual as crises recorrem com uma freqüência de 2 a 15 por mês, durante toda a vida do animal (CAVALHEIRO, 1995; CAVALHEIRO et al., 1996; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

Portanto, acredita-se que, inicialmente, o efeito epileptogênico agudo da pilocarpina seja decorrente do bloqueio de correntes de potássio, em consequência da ativação de receptores muscarínicos que leva à facilitação de descargas tipo “burst” pelos neurônios hipocampais (BERNADO e PRINCE, 1981). Por efeito, tal mecanismo poderia levar à ativação secundária do sistema glutamatérgico e, finalmente, à excitotoxicidade na formação hipocampal e em outras estruturas (TURSKI, et al., 1984). O insulto excitotóxico secundário à hiperatividade neuronal induzida por um tempo prolongado, além de provocar morte de neurônios em áreas susceptíveis, induz uma cascata de eventos moleculares e estruturais que culminam em modificações nas propriedades intrínsecas neuronais, bem como das redes neuronais, tornando-as epileptogênicas (SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000).

Diversos estudos anatomo-patológicos deste modelo demonstram que o tratamento com pilocarpina, associado ao *status epilepticus* (SE), resulta em seletiva perda celular hipocampal com características semelhantes às observadas na esclerose hipocampal humana, além de atingir outras estruturas neurais, tais como complexo amigdalóide, córtex entorrinal e neocôrte (TURSKI et al., 1983a; AL-NOORI et al., 1998). Portanto, é possível evidenciar várias alterações como anormalidades dendríticas e axonais acompanhadas da perda de neurônios, reação gliótica, reorganização sináptica e neurogênese no giro denteadoo (CLIFFORD et al., 1987; MELLO et al., 1992; PARENT et al., 1997; GUEDES et al., 2006).

Em particular, a perda neuronal é principalmente evidenciada na região hipocampal CA1 e CA3 e no hilo do giro denteado, embora esta também ocorra em outras regiões encefálicas (TURSKI et al., 1983b; BORGES et al., 2003). Além disso, vários estudos supõem que a morte neuronal no hilo (células musgosas) do giro denteado seja fundamental para a reorganização sináptica local determinando a ocorrência de crises recorrentes. O rearranjo nas conexões locais 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; BORGES et al., 2003). Outra hipótese 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 sobre estas células permite com que as mesmas promovam excessivos disparos resultando, assim, na hiperexcitabilidade (SLOVITER, 1994; McNAMARA, 1994). A ocorrência de neurogênese ectópica de células granulares, em função das crises, também parece contribuir para a hiperexcitabilidade e o estabelecimento da condição crônica, bem como das crises recorrentes. Assim, as novas células formadas migrariam para outras regiões do giro denteado além da camada granular, como hilo e camada molecular, onde estabeleceriam conexões aberrantes responsáveis pela hiperexcitabilidade (PARENT et al., 1997; PARENT e LOWENSTEIN, 2002; PARENT, 2002; RIBAK e DASHTIPOUR, 2002; GUEDES et al., 2006).

Embora todas as células hipocampais sejam excitadas durante as crises, a morte neuronal parece ser seletiva sugerindo que algumas populações neuronais sejam mais vulneráveis que outras. Tal vulnerabilidade parece estar relacionada com a ausência de proteínas tamponadoras de Ca^{++} no citoplasma da célula. Segundo Cavalheiro e Bentivoglio

(1991), o hipocampo de animais submetidos ao modelo da pilocarpina mostrou uma severa diminuição das proteínas calbindina e parvalbumina durante a fase crônica do modelo. Assim, na ausência destas proteínas, há concentrações excessivas de Ca^{++} que, por sua vez, promove a ativação de inúmeras proteases e lipases envolvidas com a morte neuronal seletiva pós-injúria (NAFFAH-MAZZACORATTI, 1998).

Todas as alterações neuropatológicas já descritas são compatíveis com a esclerose hipocampal e reforçam as semelhanças do modelo animal com a ELT humana. Logo, o desenvolvimento de epilepsia do lobo temporal parece estar fortemente associado à perda neuronal na formação hipocampal (SANABRIA e GUERREIRO, 2000; BORGES et al., 2003).

1.3 O óxido nítrico: características gerais

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio e uma das menores moléculas sinalizadoras com atividade biológica, pois é relativamente instável e apresenta propriedades que facilitam sua difusão através das membranas celulares sem o auxílio de transportadores específicos (MAYER e HEMMENS, 1997). Devido a sua natureza gasosa, ele não é vesiculado e, portanto, sua liberação não segue os padrões mais tradicionais como processos de exocitose dependentes de cálcio (GARTHWAITE, 1991; MONCADA et al., 1991; BREDT e SNYDER, 1992; 1994; DAWSON e SNYDER, 1994). Esse mensageiro parácrino alcança seu alvo através de difusão simples e não existem descritos sistemas de recaptação que possam regular sua disponibilidade. Acredita-se que sua degradação aconteça pela interação do NO com oxigênio ou ânions superóxidos, o que limita sua existência em poucos segundos (DAWSON e SNYDER, 1994).

1.3.1 Biosíntese do óxido nítrico

A síntese de NO é intermediada por um grupo de enzimas genericamente chamadas de óxido nítrico sintases (NOS) a partir do aminoácido L-arginina (L-Arg). Tais sintases catalisam a oxidação de uma molécula de L-Arg pelo oxigênio molecular com formação do N-ω-hidroxi-L-arginina, como produto intermediário, e L-citrulina e uma molécula de NO como produto final (PALMER et al., 1988; STUEHR et al., 1991; MARLETTA, 1994). Esta oxidação envolve a transferência de cinco elétrons e ocorre em duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-Arg para gerar o N-ω-hidroxi-L-arginina (NHA) com a transferência de dois elétrons. Esta reação utiliza NADPH e oxigênio e, provavelmente, envolve o grupo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão de NHA em NO e citrulina. Nesta etapa, Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH₄) são utilizadas como co-fatores na reação (Figura1) (MARLETTA, 1994; GROVES e WANG, 2000; TEIXEIRA, 2001; DUSSE et al.; 2003).

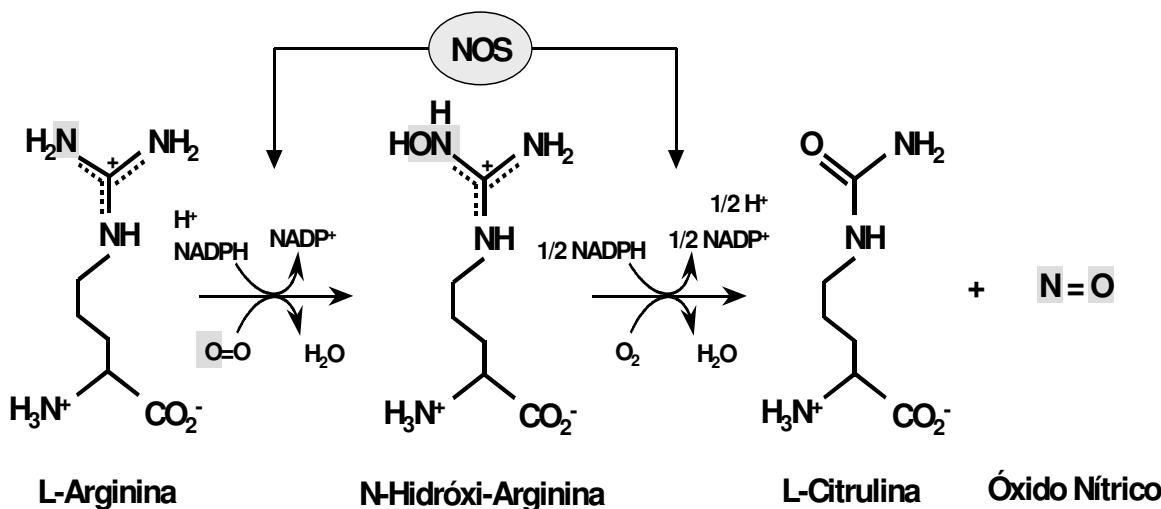


Figura 1. Representação esquemática das reações catalisadas pelas NOS (GROVES e WANG, 2000).

A NOS é uma proteína dimérica e o monômero de suas isoformas possui massa molecular que varia de 135 a 164 kDa. Estas enzimas são designadas NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), NOS induzida (iNOS) e NOS mitocondrial (mtNOS), sendo que esta última é uma variante da nNOS presente na membrana mitocondrial interna (BREDT e SNYDER, 1990; ELFERING et al., 2002; GUIX et al., 2005). A nNOS é expressa em tecido nervoso, tanto em neurônios adultos como nos neurônios em desenvolvimento e também em astrócitos. A eNOS é principalmente expressa no endotélio, mas também pode ser encontrada em neurônios e miócitos cardíacos (MARDEN et al., 1993; BREDT e SNYDER, 1994b; ABE et al., 1997; CORK et al.; 1998; GUIX et al., 2005). Estas duas isoformas são identificadas como constitutivas, ou seja, presentes em condições fisiológicas e reguladas pelo íon Ca^{2+} , enquanto que a iNOS é expressa em macrófagos, astrócitos e microglia em resposta a estímulos de natureza inflamatória ou imunológica. Destaca-se que as isoformas constitutivas geram um aumento do NO em poucos minutos, enquanto a produção de NO pela NOS induzível pode durar horas ou dias (MONCADA et al., 1991; GALEA et al., 1992; LEE et al., 1993; IADECOLA et al., 1995; TEIXEIRA, 2001; MUNGRUE et al., 2003, EBADI e SHARMA, 2003; GUIX et al., 2005).

1.3.2 - Regulação da atividade da NOS

Em razão de sua natureza gasosa e sua alta capacidade de difusão, a formação do NO deve ser rigorosamente controlada para que haja especificidade em sua sinalização. Sobre este aspecto, a família de enzimas sintetizadoras de NO realmente dispõem de uma grande variedade de mecanismos regulatórios que incluem interações com proteínas e

modificações transcricionais, pós-transcricionais, traducionais e pós-traducionais que controlam a biosíntese de NO (STAMLER e MEISSNER, 2001; BREDT, 2003; PEIXOTO, 2004).

A iNOS é tipicamente regulada (estimulada) por citocinas, através de mecanismos transcricionais (ENDO et al., 1994). Nas cavéolas sarcoplasmáticas, a eNOS é modificada através miristoilação em um mecanismo de co-tradução e por palmitoilação em um mecanismo de pós-tradução (SASA, 1997).

A função reguladora da atividade da nNOS é conferida, principalmente, ao Ca^{+2} citosólico livre, o qual estimula a enzima por meio de sua interação com a calmodulina. À chegada do potencial de ação, os canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem que se encontram no neurolema são ativados com subsequente liberação de cálcio dos estoques intracelulares. O aumento da concentração do Ca^{+2} citosólico acima de 40nM promove a ligação da calmodulina à nNOS ativando a enzima. Entretanto, quando as concentrações de Ca^{+2} diminuem, este se dissocia da calmodulina que, consequentemente, se dissociará da nNOS (KNOWLES et al., 1989; SHENG et al., 1992; ESPLUGUES, 2002; GUIX et al., 2005). Por outro lado, a regulação da nNOS também pode se concretizar via fosforilação, onde a redução da atividade catalítica desta isoenzima é mediada por quinases, tais como: proteína quinase dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), proteína quinase C, ou proteína quinase II dependente de Ca^{+2} /calmodulina (SCHMIDT et al., 1992; BREDT et al., 1992; HAYASHI et al., 1999; KOMEIMA et al., 2000; ESPLUGUES, 2002; LEDO et al., 2004; GUIX et al., 2005).

No SNC, a síntese do NO parece ser predominantemente regulada pelo influxo de Ca^{+2} via canais dependentes de receptor, em particular após a estimulação pós-sináptica de

receptores NMDA (NMDARs), pelo neurotransmissor excitatório glutamato. Alguns splicings da NOS neuronal apresentam domínio PDZ em sua porção terminal, com exceção das variantes β e γ (ALDERTON et al., 2001; ESPLUGUES et al., 2002). Tal domínio promove uma interação da nNOS com uma proteína de densidade pós-sináptica PSD-95 que, por sua vez, também se liga ao motivo Ser/Thr-X-Val (tSXV) do receptor NMDA. A PSD-95 é membro de uma grande família de proteínas de densidade pós-sináptica que, quando ligadas aos receptores NMDA, podem ancorá-los no citoesqueleto. A ligação da nNOS com a PSD-95 se faz de forma direta através da interação PDZ-PDZ e envolve o segundo domínio PDZ da proteína (PDZ2). Esta proximidade da nNOS com o receptor NMDA conferida pela interação com a proteína PSD-95 facilitará a exposição direta desta isoenzima ao influxo de Ca^{+2} , ativando-a (Figura 2) (KORNAU et al., 1995; CHRISTOPHERSON et al., 1999; SATTLER et al., 1999; TOMITA et al., 2001; ESPLUGUES, 2002).

As interações entre o NO e os receptores NMDA são particularmente interessantes por três razões. Primeiramente, semelhante ao NMDAR, o NO aumenta sua atividade em condições neuropatológicas incluindo isquemia, trauma, demências associadas ao HIV e pode ser responsável, em parte, pelos processos de apoptose e necrose neuronal nas condições mencionadas. Segundo, a ativação do NMDAR estimula a atividade da NOS neuronal resultando no aumento do NO endógeno no tecido cerebral. Por fim, a atividade do NMDAR é inibida pelo NO endógeno e espécies relacionadas ao mesmo caracterizando um *feedback* negativo em razão da excessiva atividade dos canais associados ao NMDAR (GARTHWAITE et al., 1988; BREDT e SNYDER, 1992; LIPTON et al., 1993; DAWSON et al., 1991 e 1993; CHOI et al., 2000).

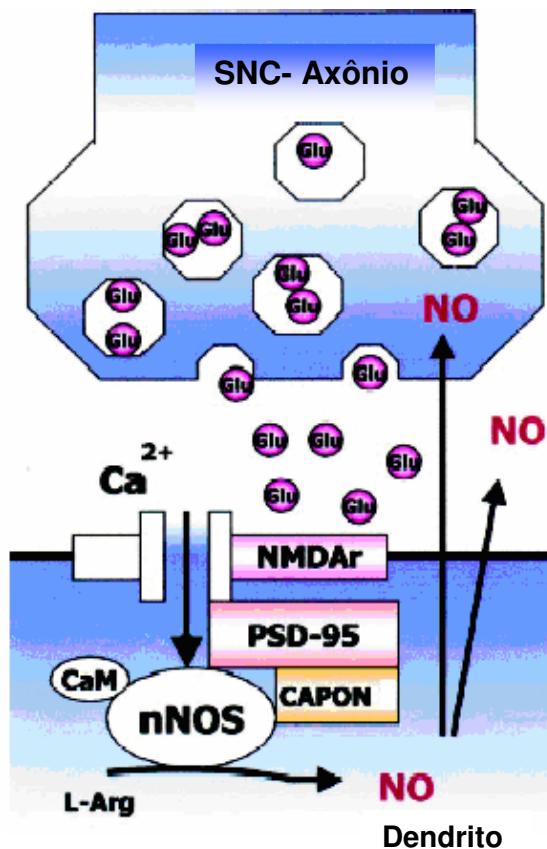


Figura 2. Ativação da nNOS no SNC. A liberação de glutamato ativa NMDAR e o consequente influxo de Ca^{2+} pelos canais iônicos ativa a nNOS, que por sua vez esta “ligada” ao receptor via proteína de densidade pós-sináptica PSD-95. A proteína CAPON está associada à regulação da produção de NO nos neurônios via nNOS (ESPLUGUES, 2002).

Um dos mecanismos de controle dos canais associados ao NMDAR e outros canais iônicos de membrana envolve a modulação direta pelo NO por um mecanismo molecular independente de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), contudo ainda desconhecido (MANZONI et al., 1992; STAMLER et al., 1997). Estudos realizados por Choi e colaboradores (2000) revelam que estes canais são modulados tanto pelo NO endógeno, por um mecanismo regulatório pós-transcricional, quanto pelo NO exógeno. A modulação por

meio endógeno resulta da S-nitrosilação de um resíduo de cisteína crítico (Cys 399) localizada na subunidade NR2A do NMDAR e, uma vez que esta subunidade se encontra mutada, o efeito endógeno do NO é perdido. A subregulação da atividade do NMDAR pela reação do NO endógeno com o grupo tiol de um resíduo de cisteína propõe que a justaposição desta proteína no espaço da submembrana de densidade pós-sináptica pode facilitar a inibição por *feedback* (CHOI et al., 2000).

Assim como a bioatividade do NO controla a atividade dos canais iônicos por *feedback*, existem proteínas que potencialmente regulam o acoplamento da nNOS com o NMDAR.. A proteína CAPON, por exemplo, possui um motivo ligante do domínio PDZ em sua porção C-terminal o qual interage com domínio PDZ da nNOS. Uma vez ligada à nNOS esta proteína ancora a NOS neuronal a outras macromoléculas regulando a formação de NO nos neurônios do SNC e direcionando o NO para alvos específicos (JAFFREY et al., 1998 e 2001; ESPLUGUES, 2002). Além da CAPON, a nNOS também pode interagir com a proteína inibidora da nNOS (PIN) (JAFFREY e SNYDER, 1996; ESPLUGUES, 2002).

1.3.3 - Aspectos fisiológicos do NO: atuação no sistema glutamatérgico

Em condições fisiológicas, o NO é produzido em baixas concentrações ($<1\mu\text{M}$) e assume o estado redox não nocivo ao metabolismo celular, ativando cascatas de segundos mensageiros distintas das cascatas responsivas ao estresse oxidativo (TAMIR et al., 1993 e 1996; NAKAYA et al., 2000; HAN et al., 2002). Concentrações fisiológicas de NO também levam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS ou EROs), contudo as doses são tão mínimas que são incapazes de sobreviver ao mecanismo de resistência celular. Embora fisiologicamente todas as células aeróbias gerem espécies radicalares, as

abundantes defesas antioxidantes dos organismos previnem o dano celular causado por EROS (PEIXOTO, 2004; BISHOP e ANDERSON, 2005).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR). As superóxido dismutases (CuZnSOD e MnSOD), por exemplo, convertem o superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tornando o superóxido inacessível ao NO para a formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (BECKMAN et al., 1994; GONZALES-ZULUETA et al., 1998; PEIXOTO, 2004; BISHOP e ANDERSON, 2005).

Várias ações fisiológicas do NO são mediadas por alterações nos níveis de GMPc, devido à ativação da guanilato ciclase (GC) resultante da ligação do NO ao grupo heme desta enzima (MONCADA et al., 1991; GRIFFITH e STUEHR, 1995). A ativação da GC resulta na conversão do GTP em GMPc que é o segundo mensageiro celular na via de sinalização do NO (STAMLER e MEISSNER, 2001; PEIXOTO, 2004; GUIX et al., 2005).

O NO age como neurotransmissor e/ou neuroregulador tanto no SNC quanto no SNP por um mecanismo dependente de GMPc. A ação da nNOS no SNC tem sido associada à percepção de dor, controle do sono, apetite, termoregulação, desenvolvimento neural e plasticidade sináptica (MONCADA et al., 1991; BREDT e SNYDER, 1994a; DINERMAN et al., 1994; HUANG, 1999; PRAST e PHILIPPU, 2001; CHENG et al., 2003; MONTI e JANTOS, 2004; GUIX et al., 2005). Devido a sua natureza difusional, o NO também tem uma ação retrógrada através de um halo de dispersão de cerca de 300 μm (DAWSON e SNYDER, 1994; ARANCIO et al., 1996). Essa ação interfere em diversas etapas do funcionamento neuronal, em especial nos neurônios que expressam receptores de

glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Esse tipo de receptor apresenta uma forte relação de interdependência com o NO, seja em sua ação pós-sináptica ou na síntese do próprio NO (GARTHWAITE et al., 1989; GARTHWAITE, 1991).

A ativação de NMDAR leva à consequente ativação da nNOS, a qual pode garantir neuroproteção através do bloqueio das caspases (KHALDI et al., 2002). A ativação da nNOS, via NMDAR, tem o seu pico durante 5-15 minutos e retorna aos níveis basais após 60 min., em sua maioria devido a exaustão de substrato, em diversas regiões cerebrais tais como hipocampo, estriato, hipotálamo e *locus coeruleus* (FEDELE et al., 2001; TRABACE et al., 2004). A ativação do receptor NMDA produz um incremento transiente do cálcio citosólico que leva a um aumento transiente da produção do NO (LUO e VINCENT, 1994). Essa forte interdependência entre o receptor NMDA e NO sugere uma grande participação desse gás nos processos biológicos nos quais esse receptor tem ação preponderante, como nos mecanismos de potenciação a longo-prazo (LTP), comuns em áreas corticais e no hipocampo, e de depressão a longo-prazo (LTD), presente no cerebelo (GARTHWAITE et al., 1989; ARANCIO et al., 1996).

Trabalhos do grupo de Eric Kandel mostraram que a difusão do NO produzido em neurônios pós-sinápticos afeta retrogradamente o terminal pré-sináptico e prolonga a LTP correlacionando-a com respostas comportamentais específicas que são dependentes desses fenômenos, como aprendizado e memória (ARANCIO et al., 1996). Corroborando fortemente essa hipótese, a investigação do efeito da administração sistêmica de inibidores da NOS sobre a aquisição de memória espacial por roedores mostrou que reduzir a produção de NO gera déficits significativos no desempenho desses animais em testes

específicos (TOYODA et al., 1996; HOLSCHER et al., 1996; PRENDERGAST et al. 1997; QIANG et al., 1997).

Em particular, é interessante destacar que a administração de 7-nitroindazole (7-NI), um inibidor seletivo da isoforma neuronal da NOS, dificultou o aprendizado de camundongos para navegação espacial no labirinto aquático e no labirinto radial (HOLSCHER et al., 1996). Mais recentemente, Weitzdoerfer e colaboradores (2004) mostraram que camundongos knock-out para nNOS também apresentam menor performance na navegação espacial no labirinto aquático, reforçando a idéia do NO como agente modulador dos circuitos glutamatérgicos envolvidos no processamento cognitivo.

1.3.4 – Óxido Nítrico e neurotoxicidade

Em contraste a sua ação neuromoduladora, o NO também pode ser nocivo ao SNC e assim contribuir para a neurotoxicidade da célula. Tal mensageiro gasoso assume uma identidade neurotóxica a partir do momento em que sua produção passa a ser excessiva, ou seja, atinge valores superiores a $1\mu\text{M}$ ($>1\mu\text{M}$). A intensa produção de NO pode ser justificada, em parte, pela ativação da nNOS em consequência à persistente estimulação dos NMDARs ou pela indução da iNOS por citocinas ou endotoxinas (CHABRIER et al., 1999). Em condições patológicas, o NO e o superóxido são produtos resultantes da excitotoxicidade e também da ativação de macrófagos, microglia e astrócitos, por intermédio da iNOS (SHARMA et al., 1996; WINKLER et al., 1998; BISHOP e ANDERSON, 2005).

Em particular, o NO é especialmente nocivo devido a produção de EROS e formação de peroxinitrito. O NO reage com o ânion superóxido (O_2^-) formando o peroxinitrito (ONOO^-) levando à rápida oxidação de grupos sulfidrilas e tioésteres, bem

como nitração e hidroxilação de compostos aromáticos como tirosina. Pode-se considerar que o peroxinitrito é a molécula que une o estresse oxidativo desencadeado pelo vazamento de elétrons na cadeia respiratória, ao estresse nitrosativo, provocado pelo aumento da produção de NO. Dentre os alvos mais importantes das EROs e RNS estão as membranas celulares e intracelulares, com o início e a propagação da peroxidação lipídica; as proteínas, que sofrem maior ataque proteolítico devido a sua carbonilação; e as moléculas do DNA (nuclear e mitocondrial), com o aparecimento de quebras e/ou ligações cruzadas com proteínas, eventualmente irreversíveis, (IMLAY e LINN, 1988; FARBER et al., 1990; PEIXOTO, 2004).

1.4 Epilepsia e Óxido Nítrico

A constatação da participação do NO nos processos cognitivos fez diversos autores considerarem sua importância nos distúrbios de aprendizado e memória freqüentemente associados a crises epilépticas. De fato, têm-se evidências experimentais e clínicas inequívocas que o *status epilepticus* (SE) pode causar danos cerebrais, sendo o hipocampo particularmente vulnerável (MELDRUM e BRIERLEY, 1973; MELDRUM, 1978; DODRILL e WILENSKY, 1990; VAN ESCH et al., 1996; SANKAR et al., 1998 e 2000; ALLDREDGE e LOWENSTEIN, 1999).

Quanto à participação do NO nas crises epilépticas, diversos autores observaram que a administração de inibidores específicos não seletivos da NOS, como o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), potencializou significativamente as crises epilépticas induzidas por ácido cainico ou pilocarpina em roedores, atribuindo ao NO um papel anti-convulsivante (STARR e STARR, 1993; PENIX et al., 1994; MAGGIO et al., 1995).

Corroborando essa hipótese, Noyan e Gulec (2000) observaram que o tratamento prévio de ratos com L-arginina reduziu significativamente a ocorrência de SE induzido por lítio-pilocarpina. Por outro lado, Przegalinski et al. (1996) relataram que a administração de L-NAME ou de 7-nitroindazole (7-NI; inibidor seletivo da nNOS) potencializou a ocorrência de crises convulsivas induzidas por NMDA em camundongos. Contudo, essas drogas não tiveram qualquer efeito sobre a severidade das crises convulsivas quando induzidas por pilocarpina, pentilenetetrazol, ou mesmo por estimulação elétrica. Além disso, outros autores atribuíram ao NO um papel pró-convulsivante com base na constatação que a administração de inibidores seletivos da nNOS atenuou as crises induzidas por pilocarpina em camundongos (VAN LEEUWEN et al., 1995; DZOLJIC et al., 1997). Essa controvérsia se torna ainda interessante se considerarmos que os efeitos desses inibidores podem variar segundo as doses e os modelos experimentais de epilepsia, como reportado por Del-Bel et al. (1997).

Além da administração de inibidores da NOS em animais, outras abordagens têm sido adotadas a fim de averiguar o estresse oxidativo na epilepsia. Desta forma, diversos estudos têm objetivado investigar os níveis de peroxidação lipídica, a participação das enzimas antioxidantes e a formação de nitrito com a finalidade de elucidar, detalhadamente, o papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) nesta injúria. Um estudo realizado por Freitas e colaboradores (2005), no modelo da pilocarpina, verificou um aumento nos níveis de peroxidação lipídica nas regiões do hipocampo e córtex frontal após o SE em ratos. Ainda neste modelo, os mesmos pesquisadores constataram que o SE altera a defesa antioxidante no cérebro de ratos e aumenta a atividade da enzima catalase no hipocampo. Corroborando com estes achados, Dal-Pizzol e colaboradores (2000) observaram que o SE

induzido por cainato também eleva os níveis de peroxidação lipídica sugerindo que as espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas nos danos neuronais.

1.5 Atividade física: implicações na plasticidade e neuroproteção

O termo plasticidade cerebral corresponde à capacidade do cérebro de modificar sua organização, tanto de elementos constitutivos como de conectividade, e sua função em consequência à sua interação com estímulos ambientais (VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005). Este processo plástico envolve diversos substratos anatômicos, tais como regiões sinápticas, neuritos e até mesmo todo o neurônio (VAN PRAAG et al., 2000; COTMAN E BERCHTOLD, 2002). Tal fenômeno parece estar 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 caracterizada como um importante estímulo para a plasticidade cerebral (KEMPERMANN et al., 2000; VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005; DISHMAN et al., 2006). Diversos estudos, tanto clínicos como em animais, demonstram os inúmeros benefícios que a prática da atividade física exerce sobre a função neuronal. Tais benefícios englobam o aumento da sobrevivência neuronal e da resistência cerebral a diferentes insultos, promoção da angiogênese, estímulo da neurogênese, fortalecimento da LTP 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). É importante ressaltar que estes efeitos positivos envolvem, especialmente, a formação hipocampal, uma região cerebral classicamente relacionada com plasticidade, aprendizagem e memória (SQUIRE, 1992).

Embora o efeito neuroprotector da atividade física seja evidente, os mecanismos neurofisiológicos subjacentes às alterações morfo-funcionais observadas na formação hipocampal, em decorrência da mesma, ainda não estão completamente elucidados. Diversos estudos elegem os fatores neurotróficos como prováveis mediadores dos efeitos positivos da atividade física sobre o cérebro (ANG et al. 2003; DING et al.; 2004; LI et al.; 2004; GRIESBACH, et al.; 2004; DISHMAN et al., 2006). Através de sinalização extracelular, os fatores neurotróficos exercem uma função reguladora sobre a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células nervosas durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. Por outro lado, no organismo adulto, estas moléculas estão envolvidas 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; VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005).

Recentemente, Cotman e Berchtold (2002) destacaram importantes efeitos positivos da prática regular de atividade física sobre o sistema nervoso em humanos e em modelos animais. Dentre os efeitos positivos referidos estão os aumentos nos níveis de diversos fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a melhora no desempenho cognitivo, em especial na aprendizagem e memória, funções classicamente relacionadas com a formação hipocampal. Além do BDNF, a atividade física promove um aumento da expressão de outros fatores tróficos, tais como: 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) (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).

Em particular, o BDNF parece ser especialmente suscetível à regulação pela atividade física, tanto na sua expressão quanto na liberação (LU e CHOW, 1999; SCHINDER e POO, 2000; VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005). Membro da família das neurotrofinas, o BDNF desempenha um importante papel no crescimento, desenvolvimento, manutenção e função de diversos sistemas neuronais, destacando-se a sua imprescindível participação na plasticidade sináptica e neurogênese na formação hipocampal (FH) (LESSMANN et al., 2003; VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005). Um estudo realizado por VAYNMAN e colaboradores (2004) constatou que a melhora nos processos de aprendizagem e memória induzidas pela prática da atividade física é dependente do aumento nos níveis de BDNF. Além disso, estes pesquisadores verificaram que, além do BDNF, o exercício aumenta a expressão do RNAm da sinapsina I, uma proteína que regula o desenvolvimento de neuritos, a formação e manutenção de estruturas pré-sinápticas e a formação de novas sinapses.

1.6 Atividade Física e Epilepsia

A recomendação da atividade física como intervenção terapêutica ou preventiva em pacientes portadores da epilepsia tem suas controvérsias (HOWARD et al., 2004). Desta

forma, diversos estudos têm buscado avaliar os efeitos da atividade física sobre as crises epiléticas, em particular na ELT (ARIDA et al., 1999; ARIDA et al., 2004).

Um estudo realizado por Arida e colaboradores (1999), utilizando o modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina em ratos, revelou efeitos positivos do exercício físico diretamente sobre a epilepsia, não permitindo o aumento da freqüência de crises recorrentes. Por sua vez, Young et al. (1999) apresentaram dados demonstrando que o ambiente enriquecido reduziu a morte celular apoptótica espontânea no hipocampo de ratos, suprimiu as crises induzidas por cainato e protegeu contra lesão excitotóxica. Corroborando com estes achados, Gobbo e O'Mara (2005) verificaram que a atividade física resultou na melhora da função cognitiva, notadamente mnemônica, em animais submetidos à indução de crises por ácido cainico, um modelo de injúria neuronal.

Recentemente, Faverjon e colaboradores (2002) mostraram que ratos que tiveram SE por pilocarpina e expostos a um ambiente enriquecido, que inclui acesso a uma roda de atividade espontânea, apresentaram melhor desempenho no teste do labirinto aquático e aumento da taxa de neurogênese no giro denteadoo da formação hipocampal em comparação aos animais sedentários. Nesta linha, são muito sugestivos os achados de Farmer e colaboradores (2004), os quais mostraram que camundongos que realizaram atividade física voluntária exibiram aumento na expressão de BDNF e de subtipos de receptores específicos para glutamato. Tais alterações podem estar associadas ao aumento da neurogênese e à redução do limiar para a geração de LTP, também verificadas por esses autores. Um estudo realizado em nosso laboratório verificou que camundongos que tiveram SE por pilocarpina e desenvolveram atividade física voluntária em roda de corrida apresentaram melhor

desempenho no teste do labirinto aquático, quando comparado ao dos animais que tiveram SE e permaneceram sedentários (SARTORI, 2005).

Não existem evidências claras quanto aos efeitos a curto e longo prazo da atividade física sobre a epileptogênese. No entanto, pacientes portadores de epilepsia podem colher benefícios da participação em um programa de atividade física adequado, com a melhora da capacidade funcional orgânica geral e psicológica, com a diminuição dos níveis de depressão, condição muito comum entre pacientes epilépticos (NAKKEN et al., 1990; ROTH et al., 1994; ARIDA et al., 2004).

Apesar dos vários estudos já realizados, os mecanismos subjacentes aos efeitos positivos creditados ao exercício físico em animais e humanos portadores de epilepsia não são ainda bem compreendidos. Atualmente, nenhum estudo sistemático foi realizado focando o envolvimento do NO nesse contexto. Assim, considerando os dados até aqui referidos, julgamos relevante investigar se, e como, a síntese do NO pode estar relacionada com os efeitos benéficos da prática regular de exercício físico sobre a melhora da capacidade cognitiva em animais com epilepsia.

2. Objetivos

Geral

Investigar a participação do óxido nítrico no modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina e sua relação com o efeito da atividade física voluntária sobre a memória espacial de camundongos.

Específicos

- 1 – Analisar a expressão da isoforma neuronal da NOS após a indução do *status epilepticus*.
- 2 – Avaliar a atividade das isoformas da NOS dependente e independente de cálcio após a indução do *status epilepticus*.
- 3- Avaliar o efeito da atividade física voluntária realizada por camundongos durante quatro semanas após *status epilepticus* sobre:
 - 3.1 - seu desempenho no labirinto aquático
 - 3.2 - a distribuição de neurônios nitrérgicos no hipocampo
 - 3.3 - a expressão da isoforma neuronal da NOS no hipocampo
 - 3.4 - a atividade das isoformas da NOS dependente e independente de cálcio no hipocampo

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com idade de 10 a 12 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 de doze horas de claro e escuro, e temperatura (21°C), recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais foram divididos em grupos que tiveram *status epilepticus* (SE) induzido com pilocarpina (P) e animais controle (Ct) que receberam apenas solução salina. Parte desses animais foi subdividida de acordo com os diferentes tempos de sacrifício após SE e seus respectivos controles: 1 dia (1d), 7 dias (7d), 21 dias (21d) e 35 dias (35d). Os animais que tiveram sobrevida de 35 dias foram subdivididos em grupos que realizaram atividade física espontânea ou corredores (C) e em grupos que não realizaram atividade física espontânea ou sedentários (S). Assim, os grupos de 35 dias foram denominados: controle corredor (CtC), pilocarpina corredor (PC), controle sedentário (CtS) e pilocarpina sedentário (PS).

Tabela 1 - Grupos e Procedimentos Experimentais

Grupos (n)	Atividade na Roda de Corrida	Teste do Labirinto Aquático	Histologia Imunoistoquímica para nNOS	Atividade Enzimática da NOS	Expressão Protéica da nNOS	Tempo de Sobrevida
Ct1d (5)	-	-	-	X	X	1 dia
Ct7d (5)	-	-	-	X	X	7 dias
Ct21d (5)	-	-	-	X	X	21 dias
P1d (5)	-	-	-	X	X	1 dia
P7d (5)	-	-	-	X	X	7 dias
P21d (5)	-	-	-	X	X	21 dias
CtS (11)	-	X	X	X	X	35 dias
CtC (11)	X	X	X	X	X	35 dias
PS (11)	-	X	X	X	X	35 dias
PC (11)	X	X	X	X	X	35 dias

3.2 Indução do *status epilepticus*

Para a indução do SE nos camundongos, inicialmente estes receberam uma dose de metilescopolamina (0,01% em solução salina; 1mg/kg s.c.), a fim de minimizar os efeitos colinérgicos periféricos da pilocarpina. Após trinta minutos, foi administrada uma dose de pilocarpina (4% em solução salina; 340 mg/kg i.p.) e monitorada a ocorrência do SE em cada animal. Este foi definido como crises clônicas generalizadas e ininterruptas, que persistiram por um período mínimo de 30 minutos antes de seu término espontâneo (OLNEY et al., 1969; TURSKI et al., 1983b; CAVALHEIRO et al., 1991; SANABRIA E CAVALHEIRO, 2000).

Imediatamente após o início do SE os animais foram monitorados por 6 horas e somente aqueles que apresentaram SE ininterrupto durante esse período foram incluídos nos grupos experimentais.

Os animais pertencentes aos grupos controles (Ct1d, Ct7d, Ct21d, CtS e CtC) receberam duas doses de solução salina (NaCl 0,9%), em substituição às drogas aplicadas nos animais dos grupos submetidos à indução do SE (P1d, P7d, P21d, PS e PC).

3.3 Condições de atividade física

Os animais dos grupos P que tiveram sobrevida de 1d, 7d, 21d após o SE e seus respectivos controles, bem como os animais dos grupos CtS e PS foram mantidos durante todo o experimento em gaiolas individuais para camundongo (29cm x 18cm x 12cm). Os animais dos grupos corredores (CtC e PC) foram transferidos para gaiolas individuais com dimensões maiores (40cm x 32cm x 16cm) e equipadas com uma roda de atividade, à qual tinham livre acesso (Figura1). Esta roda era de livre curso e a atividade dos animais foi

monitorada através de um conta-giros eletrônico instalado no eixo da mesma. O conta-giros foi 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.

A transferência dos camundongos para as gaiolas experimentais descritas acima foi feita 48 horas após a indução do SE, ou da administração de solução salina, nos animais dos grupos PC e CtC, respectivamente. De acordo com nossas prévias observações, este tempo de espera é necessário para que o animal se recupere do quadro neurológico agudo que se instala com o SE. O período de permanência dos animais nas gaiolas experimentais foi de 28 dias. Após esse período, os camundongos dos grupos CtS, CtC, PS e PC foram submetidos ao teste do Labirinto Aquático durante 5 dias para avaliação da memória espacial, conforme descrito abaixo.

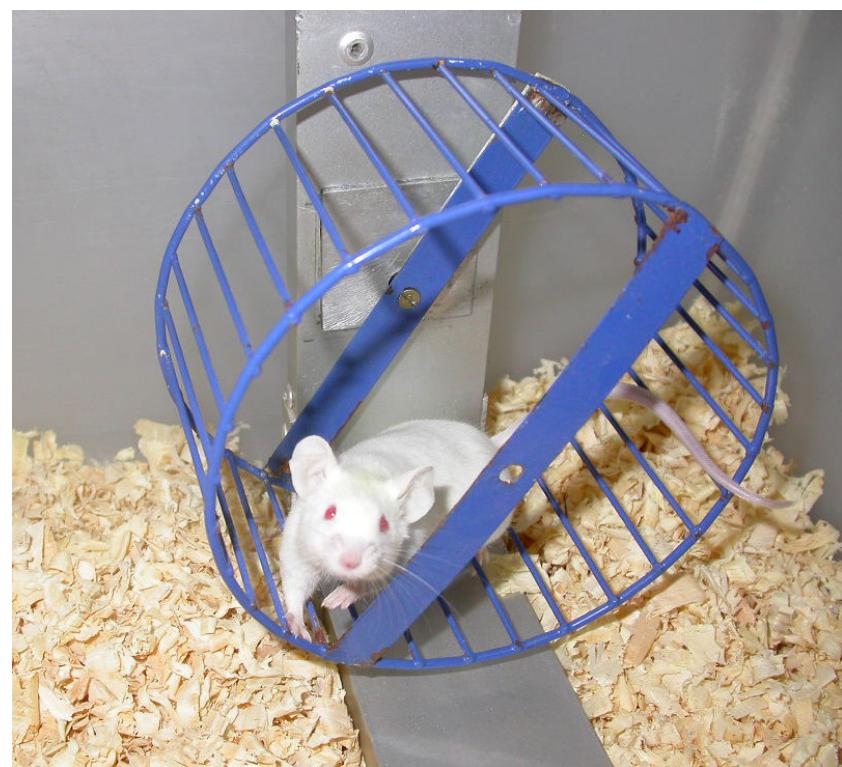


Figura 3. Gaiolas equipadas com roda de atividade. Os animais submetidos a um protocolo de atividade física (grupos CtC e PC) foram mantidos por 28 dias em gaiolas com dimensões de 40cm x 32cm x 16cm, equipadas com uma roda de atividade, à qual tinham livre acesso. Esta roda era de livre curso e a atividade dos animais foi avaliada através de um conta-giros eletrônico instalado no eixo da mesma.

3.4 Teste do Labirinto Aquático

Os testes do Labirinto Aquático foram realizados em uma piscina circular com 120cm de diâmetro e 50cm de altura, preenchida com água a $26\pm1^{\circ}\text{C}$ até 45cm (Figura2). Foram acrescentados à água 30ml de tinta branca não tóxica para que a mesma ficasse opaca. No interior da piscina foi colocada uma plataforma circular de acrílico, com 9cm de diâmetro, a aproximadamente 1,5cm abaixo da superfície da água. 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 paredes da sala de teste foram distribuídas diferentes figuras (círculo, quadrado, triângulo e estrela) utilizadas como pistas espaciais.

Para a avaliação da memória de referência espacial a plataforma permaneceu numa posição fixa em um dos quadrantes da piscina, ao longo de todo o período de testes. Para cada tentativa, 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. Para cada animal foram realizadas quatro tentativas por sessão, sendo uma sessão por dia. Em cada tentativa o animal foi liberado em pontos de partida diferentes e aleatórios e aproximadamente eqüidistantes com relação à plataforma. Foi atribuído ao animal um tempo máximo de 2 minutos para que o mesmo encontrasse a plataforma, onde permaneceria por 10 segundos e, então seria retirado pelo experimentador. Caso o animal não encontrasse a plataforma em 2 minutos, ele era colocado sobre a mesma pelo experimentador. A latência ou o tempo gasto pelo animal para encontrar a plataforma foi

empregado como um índice de aprendizagem do animal no teste. A mesma 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 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 aprendizagem ou memória espacial (*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, denominada contador crítico, com dimensão três vezes maior que o da plataforma. A duração do teste foi de um minuto e a freqüência de entrada do animal no contador crítico foi analisada posteriormente em vídeo. O examinador desenhou na tela do monitor um círculo de diâmetro correspondente ao contador e assim pode visualizar e registrar a freqüência de entrada do animal na área de interesse.

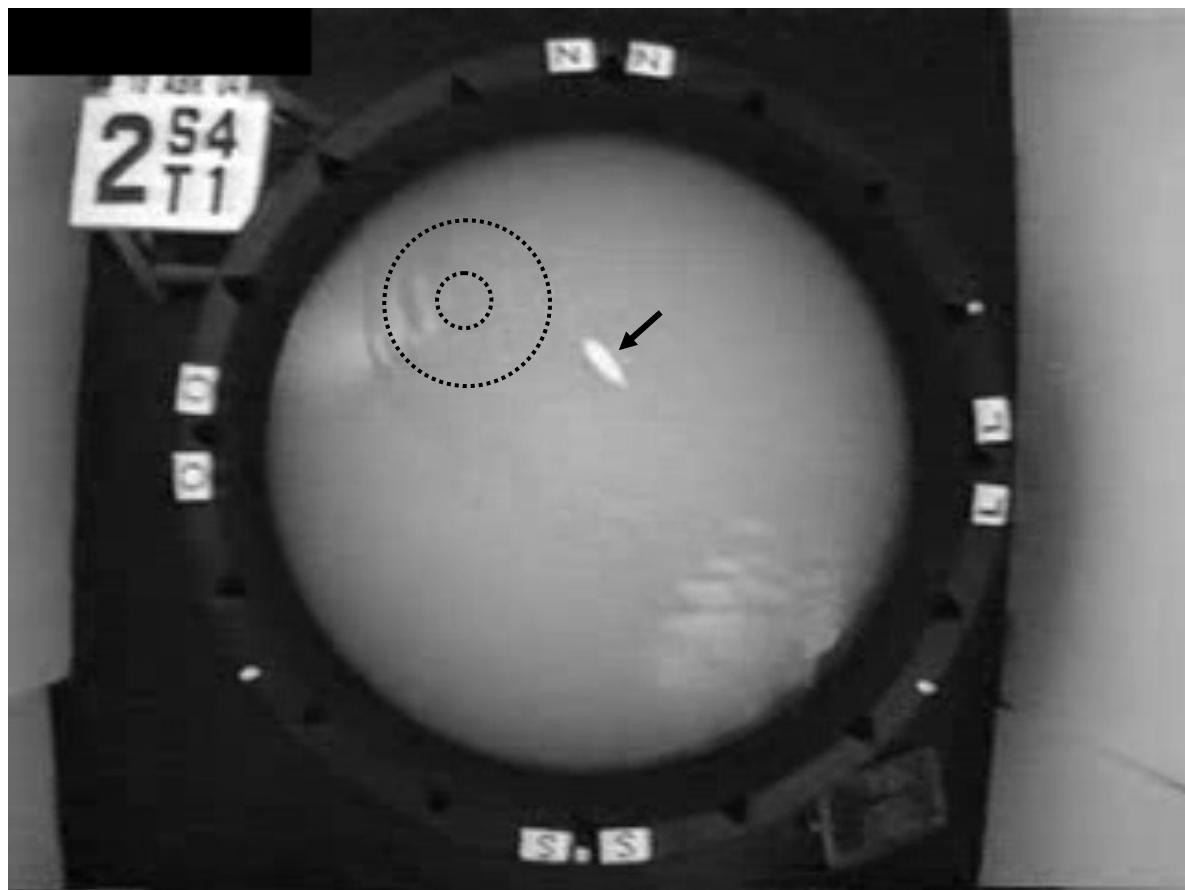


Figura 4. O Labirinto Aquático consistiu de uma piscina circular com 120cm de diâmetro e 50cm de altura, preenchida com água opaca até 45cm. Uma plataforma circular de acrílico (representada na figura pelo círculo pequeno) com 9cm de diâmetro, foi colocada a aproximadamente 1,5cm abaixo da superfície da água. O círculo maior representa a área correspondente ao contador crítico. A seta indica o camundongo em teste.

3.5 Análise histológica e imunoistoquímica

3.5.1 Perfusão e obtenção dos cortes histológicos

Após o período correspondente de sobrevida, os animais dos grupos CtS, CtC, PS e PC foram anestesiados com Pentobarbital sódico 3% (0,1ml/20g, i.p.), submetidos à toracotomia e perfundidos transcardiacamente com 100ml de solução heparinizada (0,2ml/500ml de salina) de cloreto de sódio 0,9%, seguido de 120ml 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 os encéfalos foram mantidos em geladeira 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 5 μ m de espessura, de orientação coronal, da região do encéfalo entre 1,00mm e 3,50mm posterior ao bregma (FRANKLIN e PAXINOS, 1997), empregando-se micrótomo Leica (modelo RM2125RT). Os cortes foram recolhidos diretamente sobre lâminas gelatinizadas, coletando-se cinco cortes seqüenciais, dispostos cada um em uma lâmina diferente, e desprezando-se os oito cortes subseqüentes. Este procedimento foi realizado sucessivamente até que se completassem cinco cortes por lâmina. Assim, foram obtidas cinco séries distintas de cortes histológicos. Séries adjacentes de cortes contendo a formação hipocampal foram submetidas à coloração de Nissl com violeta de cresila e à reação imunoistoquímica com anticorpo anti-nNOS, respectivamente.

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 uma. Os cortes foram então diafanizados em xilol através de duas passagens de 5 minutos cada uma, 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 denteadoo. Essa avaliação foi realizada na porção da formação hipocampal dorsal compreendida entre 1,58mm e 1,79mm posterior ao bregma, em ambos os hemisférios. Foram utilizados cinco cortes seriais para cada animal distanciados 60 μm entre si. Atribuiu-se um escore para cada uma das regiões acima referidas em ambos os hemisférios dos cinco cortes, conforme a Tabela 2. Os valores dos escores de cada região foram ordenados para o cálculo da mediana 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.

Somente os cortes dos animais pertencentes ao grupo controle sedentário, tinham sua identidade conhecida do experimentador, pois foram utilizados como referência para caracterizar o padrão de 100% de neurônios saudáveis (escore 0). Estes eram analisados sempre e imediatamente antes da análise dos cortes pertencentes aos animais dos outros grupos experimentais.

Tabela 2 - Escores utilizados na avaliação do grau de lesão neuronal.

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%

3.5.3 Imunoistoquímica para isoforma neuronal da NOS

Para a análise da distribuição dos neurônios nitrérgicos os cortes foram inicialmente desparafinizados em xilol e re-hidratados em bateria de álcoois e por fim lavados em água destilada. Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram incubados em solução de H₂O₂ (3%) e metanol por 15 minutos. A recuperação do antígeno foi realizada empregando-se solução Tris-HCl 50mM (pH 9,5) e uréia (5%) em forno de microondas (900W) por 10 minutos. A seguir, o bloqueio dos grupos aldeídos feito com tampão Tris-Gli 0,1M por 30 minutos, seguido do bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de leite em pó desnatado (5%) em tampão PBS (pH 7,4) e soro de cabra (1:6) por 3 horas. Os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-nNOS (policlonal produzido em coelho; Dako, cat. nº Z0334) diluído (1:50) em tampão de bloqueio, no interior de câmara úmida por 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário (1:200; Rockland, 611-1602) por 1 hora à temperatura ambiente. A

imunorreatividade foi amplificada com o kit ABC (complexo avidina-biotina) por 1 hora e revelada pela reação com H₂O₂ e DAB (diaminobenzidina). Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris e montados com Entelan (Merck).

3.6 Análise bioquímica e molecular

3.6.1 Dissecção do hipocampo

Para as análises de expressão protéica e de atividade da NOS no hipocampo, os camundongos foram decapitados, com auxílio de uma guilhotina, e o hipocampo rapidamente dissecado sobre uma placa de Petri resfriada com gelo picado. Imediatamente a seguir foi pesado, congelado em nitrogênio líquido conservados em biofreezer a -80°C até o seu processamento.

3.6.2 Análise da atividade de NOS

Para a medida da atividade das isoformas dependentes (nNOS e eNOS) e independente (iNOS) de cálcio, foram empregados os procedimentos estabelecidos no Laboratório de Farmacologia Bioquímica dos Radicais Livres da USP sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará.

Inicialmente, os hipocampos foram pesados e homogeneizados em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCl 50mM, pH 7.4) contendo 1 mM de PMSF e 1mM de L-citrulina. Desse homogenato, 50µL foram incubados na presença de NADPH (1,0mM), CaCl₂ (2,0mM) e 10µM de L-arginina contendo 100.000cpm de [2,3,4,5-³H] L-arginina mono hidrocloreto em um volume final de 100µl a temperatura ambiente (25 - 27°C)

durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (sem PMSF e L-citrulina). Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1ml de tampão HEPES 20mM, pH 5.4 contendo 1mM de EGTA e 1mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (5' a 10.000 rpm) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em viais de cintilação. As colunas foram lavadas com 1ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados aos anteriores. Após a adição de 10ml de líquido de cintilação a radioatividade foi medida durante 1min. em espectrômetro de cintilação. As contagens foram corrigidas por subtração do “branco” (onde o homogenato de tecido foi adicionado após o tampão HEPES). Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à atividade total (os conteúdos destes tubos receberam $[2,3,4,5-^3\text{H}]$ L-arginina mono hidrocloreto diretamente nos viais de cintilação) pela fórmula:

$$\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times (\text{dpm amostra} - \text{dpm branco}) / \text{dpm totais} / 30$$

O valor 1000 corresponde à quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação, em pmols, e 30 é o tempo de incubação, em minutos.

Paralelamente, em cada ensaio foram realizados controles farmacológicos da atividade enzimática que consistem na omissão do CaCl_2 e na adição de 1mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS) e na adição de 1mM de L-NAME (inibição específica para as NOS).

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando-se kit comercial (Bio Rad, EUA). A atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína.

A atividade da NOS dependente de Ca^{2+} foi obtida pela subtração da atividade independente de Ca^{2+} (que possui EGTA no meio de incubação) da atividade total.

3.6.2 Análise da expressão protéica da nNOS

Cento e trinta microlitros das amostras de homogenato de hipocampo (concentração de proteínas totais = 5mg/ml) foram diluídas com 30 μ l de tampão de Laemmli (0,0625M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptopetanol) e fervidas durante 10min.

Após centrifugação a 13.000rpm, (5min.; IEC Centra M2/EUA), 45 μ g de proteínas das amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio (SDS- PAGE; Laemmli, 1970).

Os géis de concentração e de corrida foram preparados conforme descrito nas tabelas a seguir:

Tabela 3: Gel de corrida

Reagente	Gel 7% (ml)
H_2O dest.	5,560
Glicerol 50%	0,095
TRIS 1,5M- pH 8,8	2,800
Acrilamida 30% + Bis-acrilamida 0,8%	2,600
SDS 10%	0,112
TEMED	0,010
Persulfato de amônio 10%	0,030

Tabela 4: Gel de concentração

Reagentes	Gel 3% (ml)
H ₂ O dest.	3,150
TRIS 1,5M- pH 8,8	1,250
Acrilamida 30% + Bis-acrilamida 0,8%	0,500
SDS 10%	0,050
TEMED	0,006
Persulfato de amônio 10%	0,025

Para a composição do tampão utilizado na corrida eletroforética utilizamos os seguintes reagentes: TRIS (25Mm), glicina (192mM) e SDS (0,1%) ajustado para pH 8,3.

A separação das proteínas foi realizada à intensidade de corrente constante (40mA), durante aproximadamente duas horas, resultando em valores de voltagem variando entre 100 a 180V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforeticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, aplicando-se uma amperagem de 150mA (voltagem ~40V) durante 2 horas. A composição do tampão empregado na transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose é a seguinte: TRIS (25mM), glicina (192mM), SDS (0,1%) e etanol (18%). Para comprovar a eficiência da transferência, os géis foram corados com corante Commassie blue (solução à 0,1% de Commassie brilliant blue em solução aquosa de ácido acético 5% contendo 25% de etanol), e as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (solução à 2% de corante Ponceau em solução aquosa contendo 30% de ácido tricloro acético e 30% de ácido sulfosalicílico). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma solução a 0,2% de caseína dissolvida em tampão TBS-t pH 7,4 (20mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl contendo 0,1% de Tween-20) sob

agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 15-18 horas, a 4°C com anticorpo primário anti-nNOS (1:1000; coelho; policlonal; Tranduction Lab., EUA), diluídos em tampão TBS-t.

Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários (1:3000, cabra, anti-coelho, Bio Rad, EUA) conjugados com fosfatase alcalina (AP), durante 2 horas em temperatura ambiente.

Em seguida, as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas foram reveladas mediante kit de revelação por quimioluminescência (Lummiphos, Pierce, EUA). As imagens foram captadas mediante sistema ChemiImager (Alpha Innotech, EUA). O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (faixa: 7 a 205 kDa, Bio Rad, EUA).

A intensidade das bandas, considerada como grau de expressão da proteína, foi determinada por análise densitométrica mediante o uso de software Sigma Gel (Sigma Chem. Co., EUA), e os valores foram expressos em porcentagem.

3.7 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 de 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 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 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 atividade da NOS foram expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de ANOVA de um critério seguido do teste de Student - Newman - Keuls para múltiplas comparações.

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad InStat (versão 3.00) considerando significantes os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Alterações comportamentais resultantes da administração de pilocarpina

Após 10 minutos da administração da pilocarpina os animais apresentaram alterações comportamentais características que culminaram no *status epilepticus* (SE). Em um primeiro momento, 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. Em seguida, houve uma progressão destes sinais clínicos com a aparição de tremores generalizados, clonia nas extremidades do corpo e breves crises convulsivas. Por fim, 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 $29,23 \pm 1,05$ minutos (média ± E.P.M.; n=37). Tais crises mantiveram-se com a mesma intensidade por pelo menos 30 minutos e diminuíram gradualmente ao longo do período de monitoramento (6 horas), podendo se tornar parciais, porém ininterruptas.

4.2 Volume de atividade física (VAF)

Durante o período de 28 dias todos os animais controle corredores (CtC) e pilo corredores (PC) acessaram voluntariamente a roda de corrida, predominantemente no período noturno compreendido entre 19h e 7h. Entretanto, observou-se que o volume de atividade física, diário, dos animais controle (CtC) difere do VAF diário dos animais experimentais (Pilo).

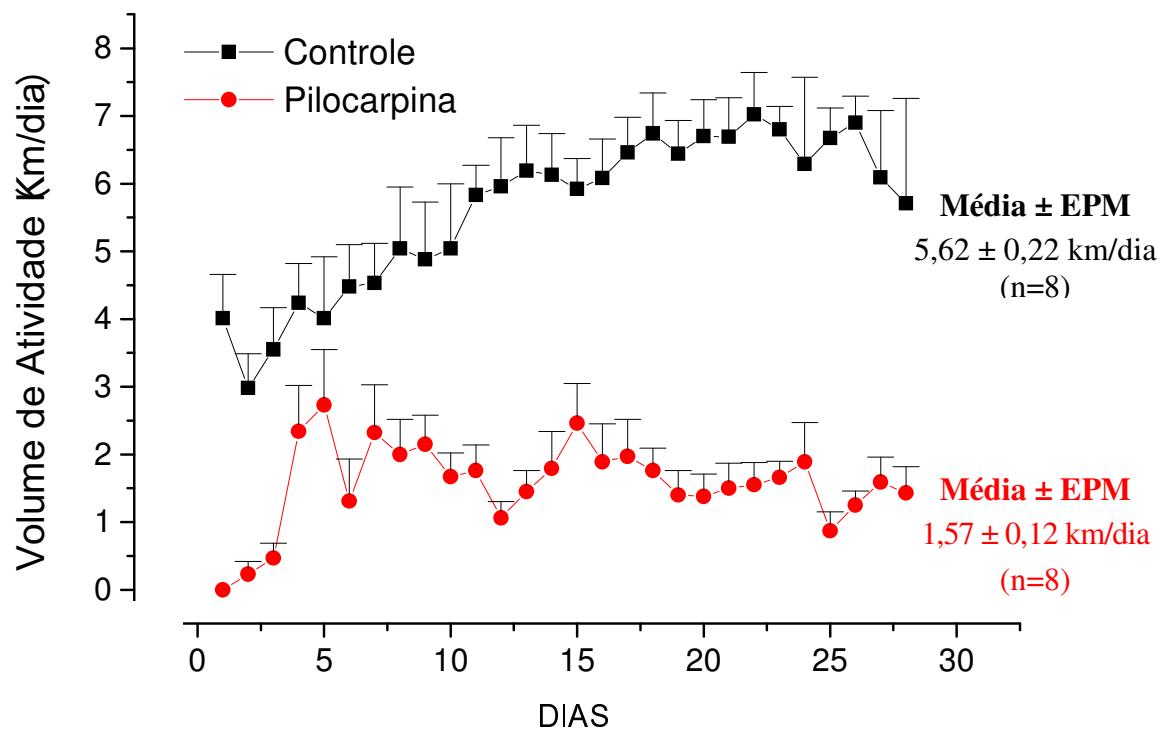


Figura 5. Valores do volume de atividade física diária (VAF) dos animais dos grupos CtC (Controle) e PC (Pilo) na roda de corrida durante 28 dias. Notar que os animais PC tiveram significativo aumento do VAF entre o 1º e o 5º dia e a seguir uma estabilização dos seus valores, contrariamente ao observado nos animais CtC. Os valores estão expressos em média±E.P.M.

Os animais CtC apresentaram 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 $4,01 \pm 0,65$ km/dia, caindo para $2,98 \pm 0,51$ km/dia ao final das 48 horas seguintes, e aumentando gradativamente até o atingir o valor máximo de $7,02 \pm 0,62$ km/dia final no 22º dia de treinamento. O VAF médio do grupo CtC, considerando-se todo o período de 28 dias, foi de $5,62 \pm 0,22$ km/dia (n=8) (Figura 5).

Por sua vez, os animais PC não apresentaram atividade na roda de corrida durante as primeiras 24 horas. Interessantemente, durante as seguintes 120 horas houve acentuado aumento do VAF, que atingiu o valor de $2,73 \pm 0,82$ km/dia ($p < 0,05$). Este pico de atividade foi seguido de brusca diminuição para $1,31 \pm 0,62$ km/dia no 6º dia, e aumento do VAF para $2,32 \pm 0,71$ ao final do 7º dia. A partir do 8º dia ($2,00 \pm 0,52$ km/dia) houve a manutenção da VAF até o final do período de 28 dias ($1,68 \pm 0,57$ km/dia). O VAF médio do grupo PC, considerando todo o período, foi de $1,57 \pm 0,12$ km/dia (n=8) e significativamente inferior ao registrado nos animais do grupo CtC ($p < 0,001$) (Figura 5).

4.3 Teste do Labirinto Aquático

4.3.1 Memória de referência espacial

O Teste do Labirinto Aquático, que avalia a memória de referência espacial, revelou que os animais controle apresentaram melhor desempenho comparado aos animais tratados com pilocarpina. Os grupos CtC e CtS apresentaram comportamento semelhante durante todo o teste. A latência média destes dois grupos diminuiu gradativamente e apresentou diferenças significativas entre a 1ª e a última sessão para ambos os grupos (CtS: 1ª sessão= $81,52 \pm 6,66$; 4ª sessão= $55,57 \pm 12,66$; CtC: 1ª sessão= $93,95 \pm 9,5$; 4ª sessão= $51,25 \pm 13,34$; $p < 0,05$). Por sua vez, os animais do grupo PC apresentaram melhor desempenho comparado aos animais do grupo

PS. Tal melhora tornou-se evidente na 2^a, 3^a e 4^a sessões, onde a latência dos animais PC foi significativamente menor que a dos animais PS (PC: 2^a sessão=85,98±8,81; 3^a sessão=76,36±10,14; 4^a sessão=74,7±9,5; PS: 2^a sessão=120±0; 3^a sessão=111,45±4,95; 4^a sessão=110,84±4,92; p<0,05). Além disso, somente nos animais do grupo PC houve diferença significativa entre as latências registradas na 1^a e a 4^a sessões (1^a sessão=102,84±5,64; 4^a sessão=74,7±9,5; p<0,05) (Figura 6).

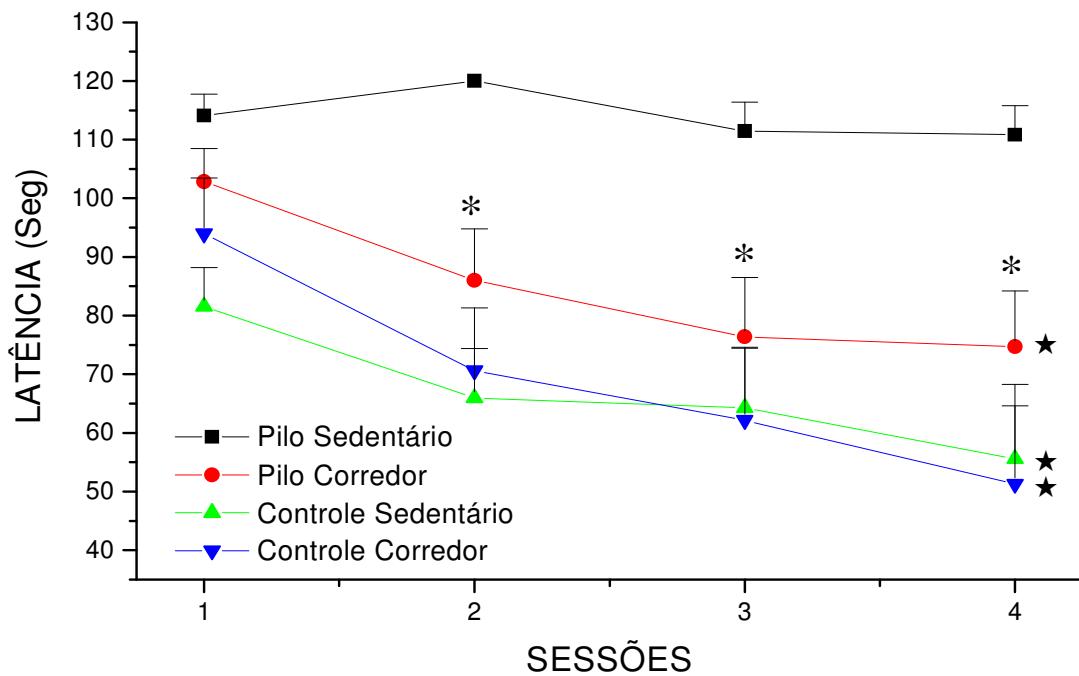


Figura 6. Valores médios da latência para encontrar a plataforma. Notar que os animais do grupo PC apresentaram melhor desempenho comparado aos animais do grupo PS a partir da 2^a sessão (* p<0,05). Notar também que o valor da latência na sessão 4 foi significativamente inferior quando comparada à registrada na sessão 1 nos grupos CtS, CtC e PC (★ p<0,05). Os valores estão expressos em média±E.P.M.

4.3.2 Probe Test

A memória espacial foi avaliada através da freqüência de entradas dos animais no contador crítico durante um minuto. Durante este período, os animais controle corredores entraram um número significativamente maior de vezes no contador crítico que os animais pilo sedentários ($CtC=5,36\pm0,97$; $PS=2,09\pm0,86$; $p<0,05$) e controle sedentários ($CtC=5,36\pm0,97$; $CtS=3,0\pm1,03$; $p<0,05$). Embora não tenham sido detectadas diferenças estatisticamente significantes entre a freqüência de entradas dos animais dos grupos corredores (CtC e PC), os animais saudáveis tenderam a cruzar um maior número de vezes os limites do contador crítico ($CtC=5,36\pm0,97$; $PC=3,73\pm0,9$) (Figura 7). Já os grupos sedentários (CtS e PS) apresentaram comportamentos semelhantes.

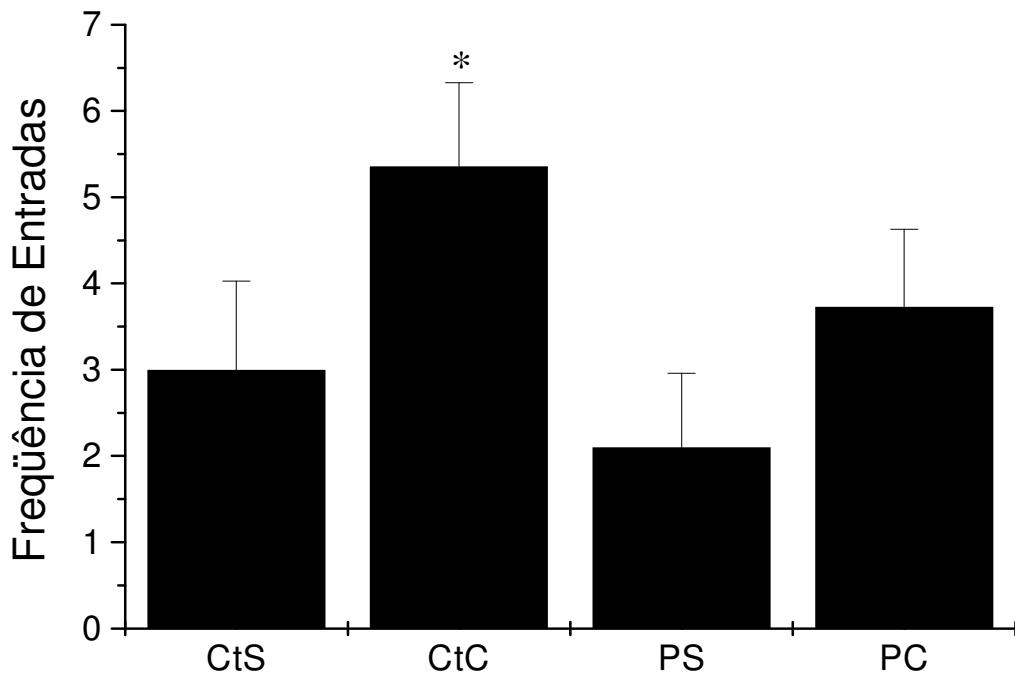


Figura 7. Freqüência de entradas no contador crítico durante o *probe test*. Notar que os animais CtC apresentaram freqüência de entradas significativamente maior que os animais dos grupos PS e CtS ($*p<0,05$). Os valores estão expressos em média±E.P.M.

4.4 Análise histológica

4.4.1 Coloração de Nissl e avaliação da perda neuronal

A avaliação da perda neuronal realizada através da coloração de Nissl evidenciou lesões na formação hipocampal dos animais pertencentes aos grupos PS e PC. Tais lesões foram caracterizadas por perda de neurônios na camada granular e hilo do giro denteado e na camada piramidal das regiões CA1 e CA3. Ainda nestas regiões pôde-se observar a presença de neurônios retraídos e com núcleos intensamente corados. Por outro lado, nos animais dos grupos CtS e CtC 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 os grupos PS e PC. No grupo PS dois animais apresentaram lesão com o escore 1 ou 0, e o valor da mediana do grupo foi igual a 0,5 (n=3). O mesmo ocorreu com o grupo PC, entretanto o escore atribuído à lesão foi igual a 1 ou 2, e o valor da mediana do grupo foi igual a 1. Contudo, a diferença entre os escores dos grupos PS e PC não foi estatisticamente significante.

Diferentemente da camada granular, o hilo do giro denteado apresentou os maiores escores de lesão entre todas as regiões avaliadas. Os animais pertencentes ao grupo PS apresentaram escores entre 3 e 4, sendo que a mediana foi igual a 4. Já no grupo PC, os animais tiveram lesões com escore entre 2 e 4, e a mediana desse grupo foi igual a 3,5. No entanto, a diferença entre os escores registrados nos grupos PS e PC não foi estatisticamente significante.

4.4.1.2 Camada piramidal

Todos os animais do grupo PS apresentaram lesões na região CA1 com escore entre 0 e 2 e a mediana igual a 1. Entretanto, no grupo PC os animais apresentaram lesões com escores entre 0 e 1, e a mediana foi igual a 0,5. A camada piramidal da região CA3 apresentou lesões com escore entre 1 e 4, e a mediana igual a 2, nos animais do grupo PS. Por sua vez, nos animais do grupo PC a intensidade da lesão variou entre os escores 0 e 4, sendo a mediana igual a 1,5.

A análise estatística revelou que não houve diferença estatisticamente significante entre os escores registrados nos grupos PS e PC, em ambas as regiões CA1 e CA3. (Figuras 8, 9, 10 e 11)

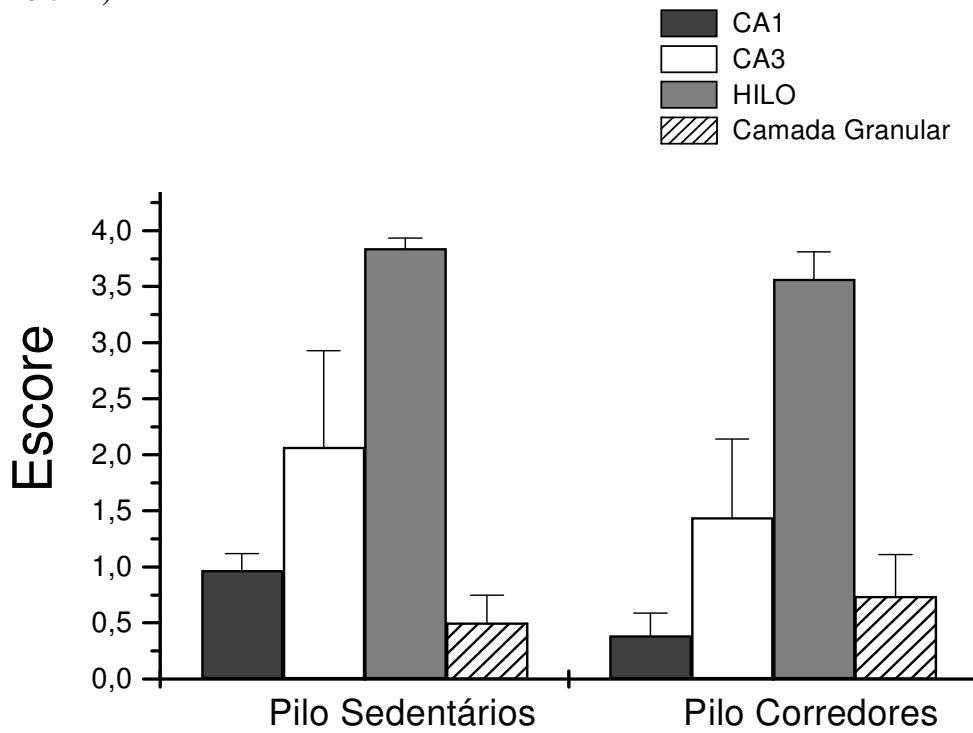


Figura 8. Escores atribuídos às lesões histológicas evidenciadas pela coloração com violeta de cresila nas regiões da formação hipocampal avaliadas. Os valores estão expressos em média±E.P.M. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos em quaisquer das estruturas analisadas.

Figura 9. Avaliação da perda neuronal na região CA1. A-H: Região de CA1 na Formação Hipocampal de animais dos grupos Controle Sedentário, Controle Corredor, Pilo Sedentário e Pilo Corredor. A-D: Imagem panorâmica da região CA1. E e F – Detalhes da região CA1 de animais do grupo Controle Sedentário e Controle Corredor, respectivamente, mostrando aspecto histológico normal, sem sinais de perda celular. G e H – Detalhes da região CA1 de animais do grupo Pilo Sedentário e Pilo Corredor, respectivamente, mostrando a baixa densidade celular no local da lesão evidenciada somente no grupo Pilo Sedentário. A-D, barra=25 μ m; E-H, barra=15 μ m. (Violeta de Cresila)

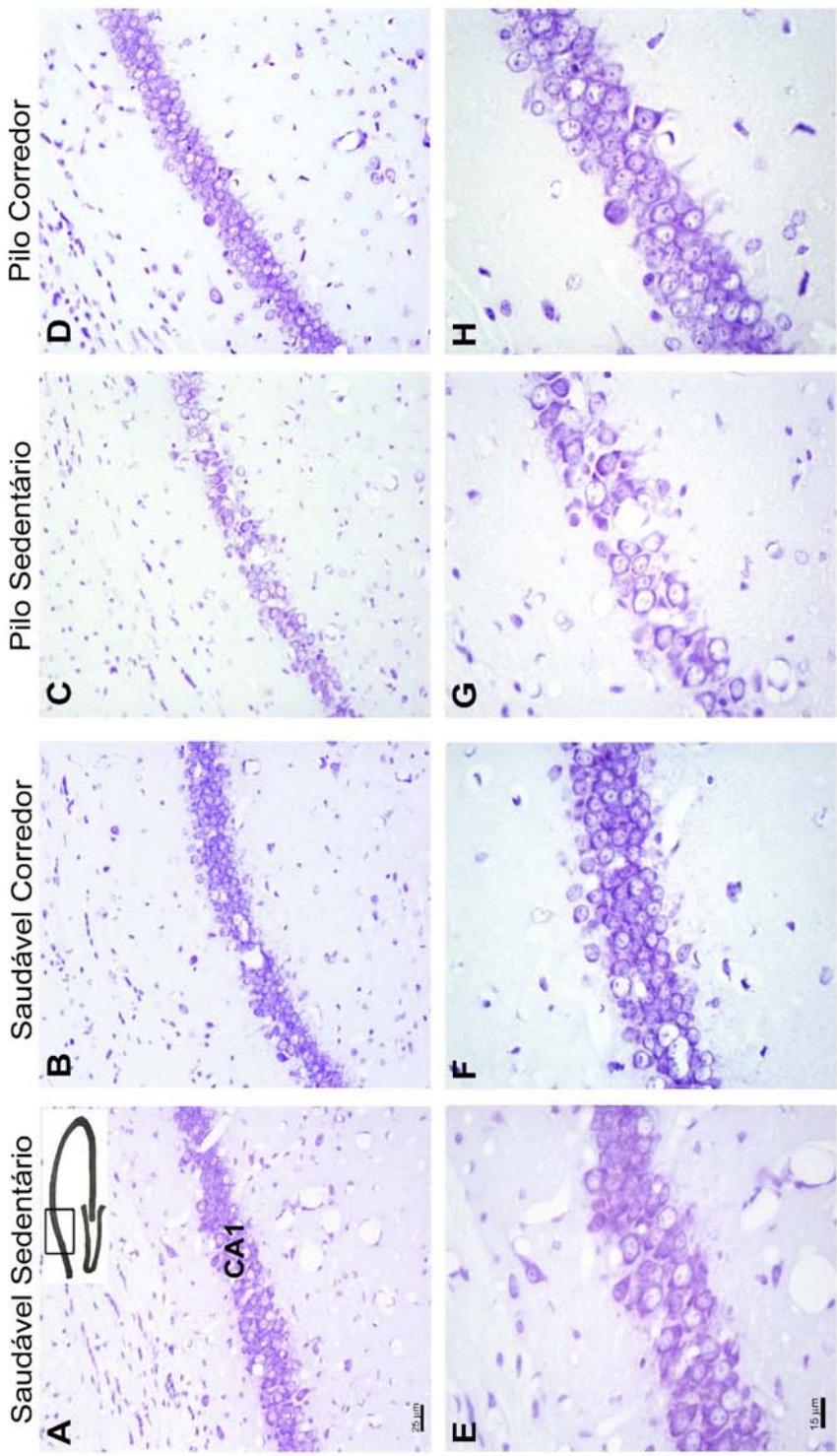


Figura 10. Avaliação da perda neuronal na região CA3. A-H: Região de CA3 na Formação Hipocampal de animais dos grupos Controle Sedentário, Controle Corredor, Pilo Sedentário e Pilo Corredor. A-D: Imagem panorâmica da região CA3. E e F – Detalhes da região CA3 de animais do grupo Controle Sedentário e Controle Corredor, respectivamente, mostrando aspecto histológico normal, sem sinais de perda celular. G e H – Detalhes da região CA3 de animais do grupo Pilo Sedentário e Pilo Corredor, respectivamente, mostrando a baixa densidade celular no local da lesão. A-D, barra=25 μ m; E-H, barra=15 μ m. (Violeta de Cresila)

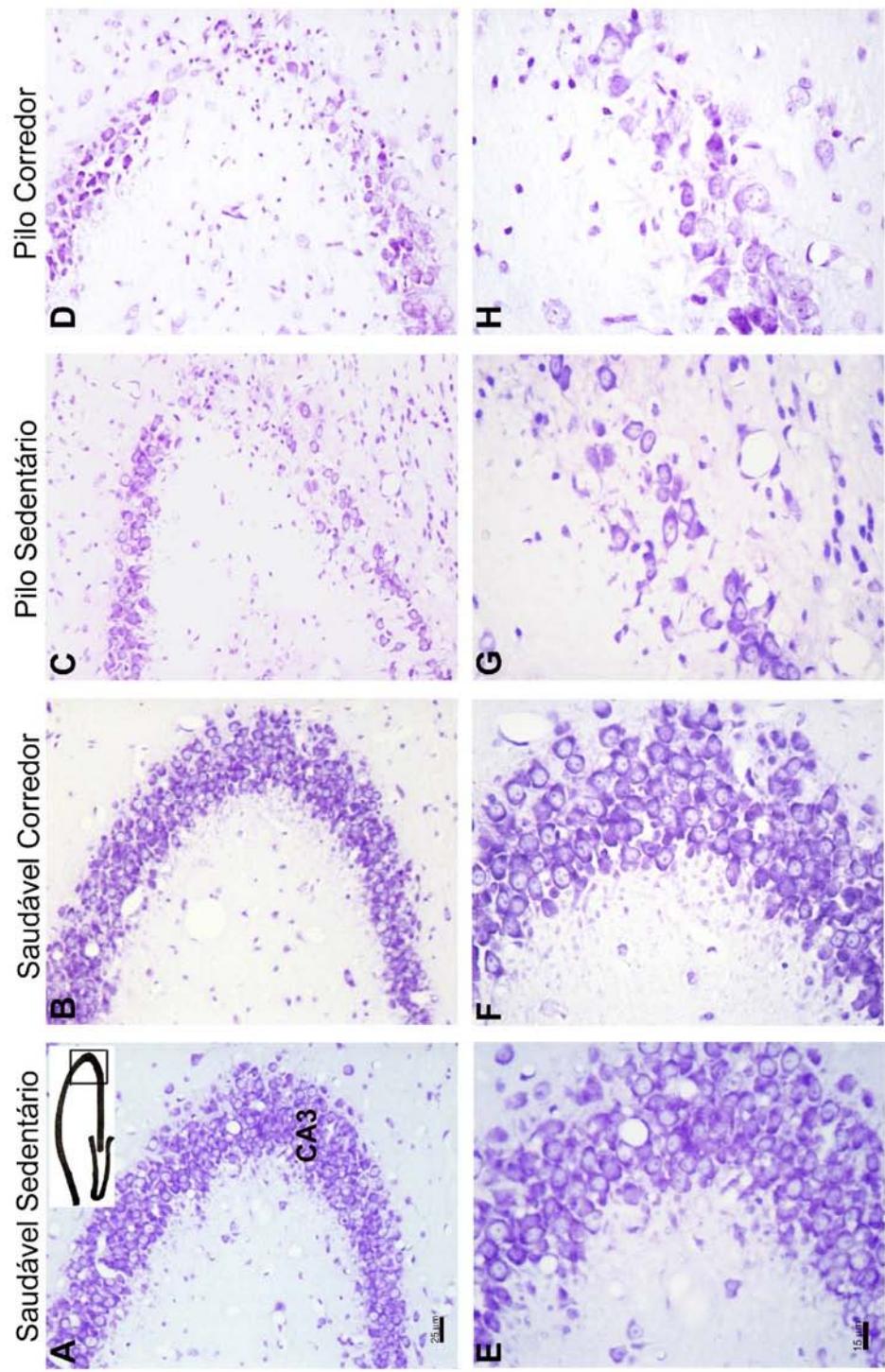
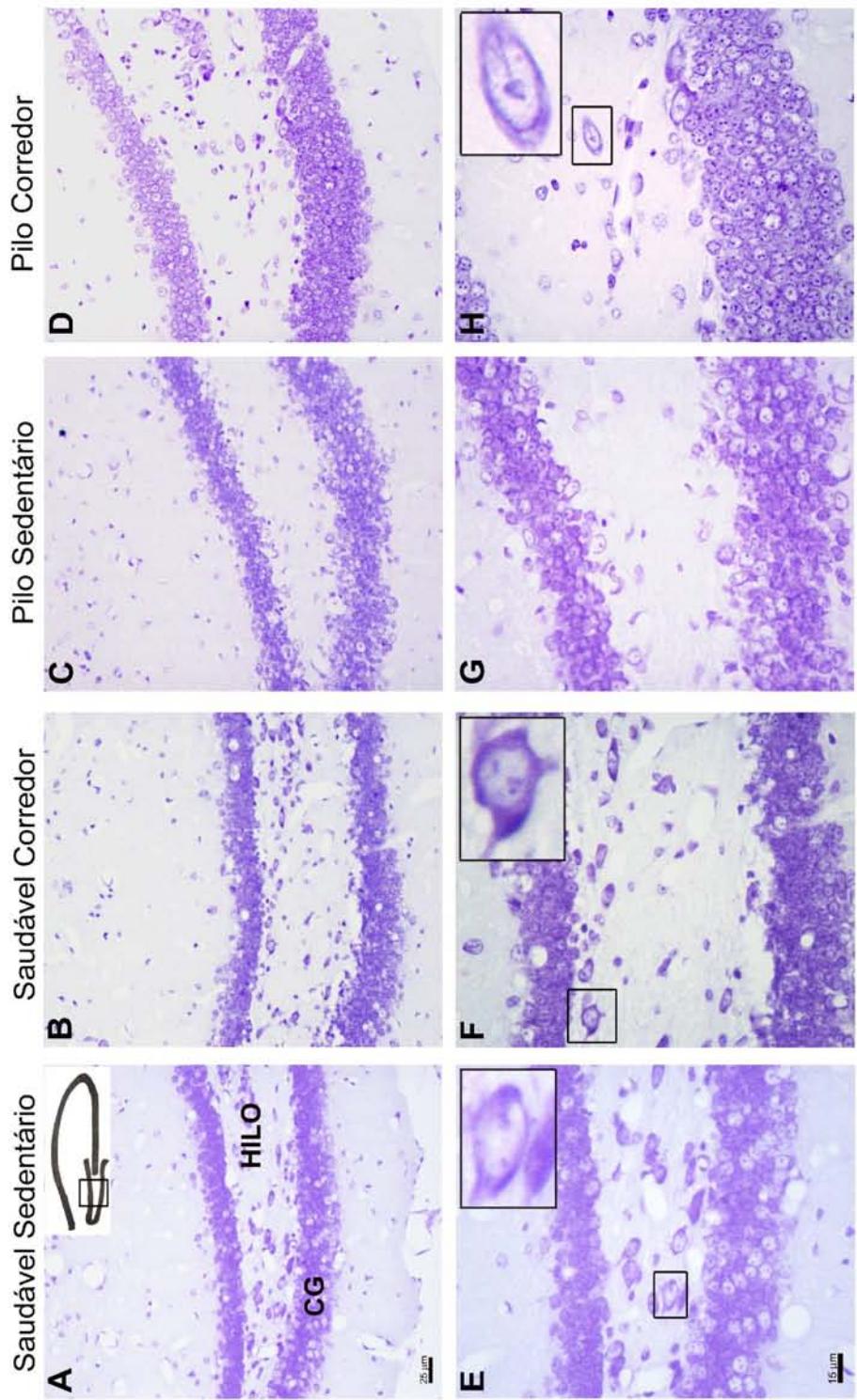


Figura 11. Avaliação da perda neuronal na região do Giro Denteado. A-H: Giro Denteado (hilo e camada granular) na Formação Hipocampal de animais dos grupos Controle Sedentário, Controle Corredor, Pilo Sedentário e Pilo Corredor. A-D: Imagem panorâmica do Giro Denteado. E e F – Detalhes do giro denteado de animais do grupo Controle Sedentário e Controle Corredor, respectivamente, mostrando aspecto histológico normal, sem sinais de perda celular. G e H – Detalhes do Giro Denteado de animais do grupo Pilo Sedentário e Pilo Corredor, respectivamente, mostrando a região da lesão, evidenciada pela baixa densidade celular no hilo, e camada granular relativamente preservada. A-D, barra=25 μ m; E-H, barra=15 μ m. (Violeta de Cresila)



4.4.2 Avaliação Imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica revelou uma variabilidade na distribuição regional de neurônios positivos para nNOS, tamanho e intensidade de marcação celular entre os grupos estudados. Tal diversidade pode ser observada tanto nos grupos controle (CtC e CtS), quanto nos grupos induzidos com pilocarpina.

Considerando-se a distribuição regional, a camada piramidal CA3 foi a região que apresentou a maior população de neurônios positivos para nNOS em todos os grupos estudados (Figuras 13 e 14). Nesta região, observou-se a presença de grandes neurônios piramidais com citoplasma intensamente marcado. É importante destacar que o padrão de intensidade de marcação variou ao longo de CA3. Assim, a porção mais próxima ao giro denteadoo apresentava os neurônios piramidais mais intensamente marcados. Além do corpo celular era possível visualizar as ramificações que se projetavam de cada neurônio (Figura 14). A variabilidade na intensidade de marcação foi principalmente evidenciada nos grupos controle, tanto sedentários como corredores.

Na região de CA1, houve poucos neurônios piramidais marcados e estes eram de tamanho menor quando comparados aos encontrados em CA3. Somente no grupo de animais PC não se observaram neurônios positivos para nNOS (Figura 12).

No giro denteadoo, os neurônios positivos para nNOS foram observados principalmente na região do hilo. Contudo, apenas os animais controle apresentaram neurônios marcados nessa região. Além disso, nesses animais tais células se apresentavam intensamente marcadas e geralmente de maiores dimensões, quando comparadas às dos animais sedentários. Nas demais regiões do giro denteadoo, os neurônios imunorreativos para nNOS foram menos freqüentes e exibiram marcação pouco intensa. Este padrão foi observado em todos os grupos de animais (Figura 15).

Figura 12. Imunomarcação para nNOS na região CA1. A-H: Região de CA1 na Formação Hipocampal de animais dos grupos Controle Sedentário, Controle Corredor, Pilo Sedentário e Pilo Corredor. A-D: Imagem panorâmica da região CA1. E e F – Detalhes da região CA1 de animais do grupo Controle Sedentário e Controle Corredor, respectivamente, mostrando poucas células positivas para nNOS (setas). G e H – Detalhes da região CA1 de animais do grupo Pilo Sedentário e Pilo Corredor, respectivamente, mostrando poucas células positivas para nNOS no grupo Pilo Sedentário e ausência de células positivas para nNOS no grupo Pilo Corredor. A-D, barra=25 μ m; E-H, barra=15 μ m.

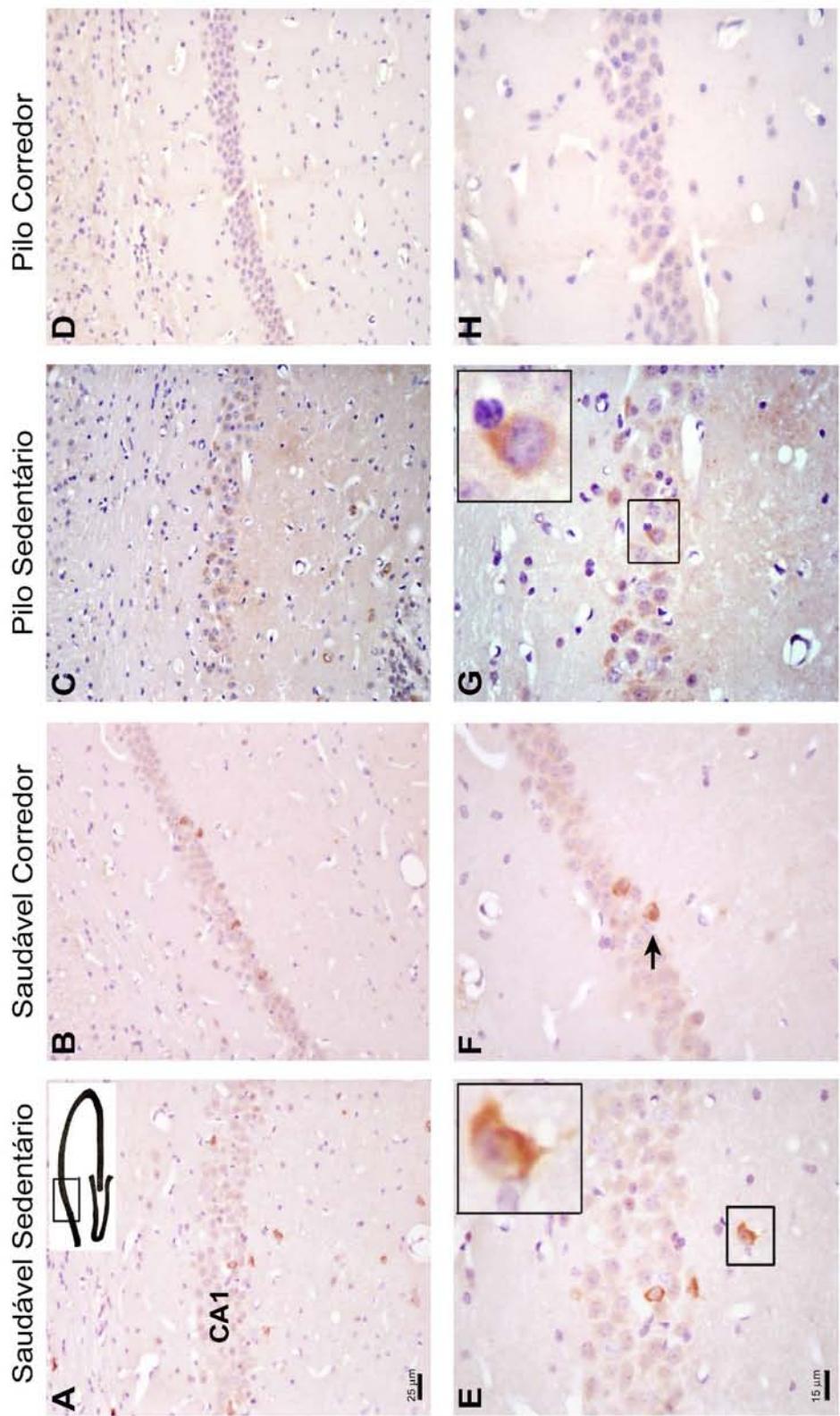


Figura 13. Imunomarcação para nNOS na região CA3. A-H: Região de CA3 na Formação Hipocampal de animais dos grupos Controle Sedentário, Controle Corredor, Pilo Sedentário e Pilo Corredor. A-D: Imagem panorâmica da região CA3. E e F – Detalhes da região CA3 de animais do grupo Controle Sedentário e Controle Corredor, respectivamente, mostrando várias células positivas para nNOS (setas). G e H – Detalhes da região CA3 de animais do grupo Pilo Sedentário e Pilo Corredor, respectivamente, mostrando várias células positivas para nNOS sobreviventes à lesão (setas). A-D, barra=25 μ m; E-H, barra=15 μ m.

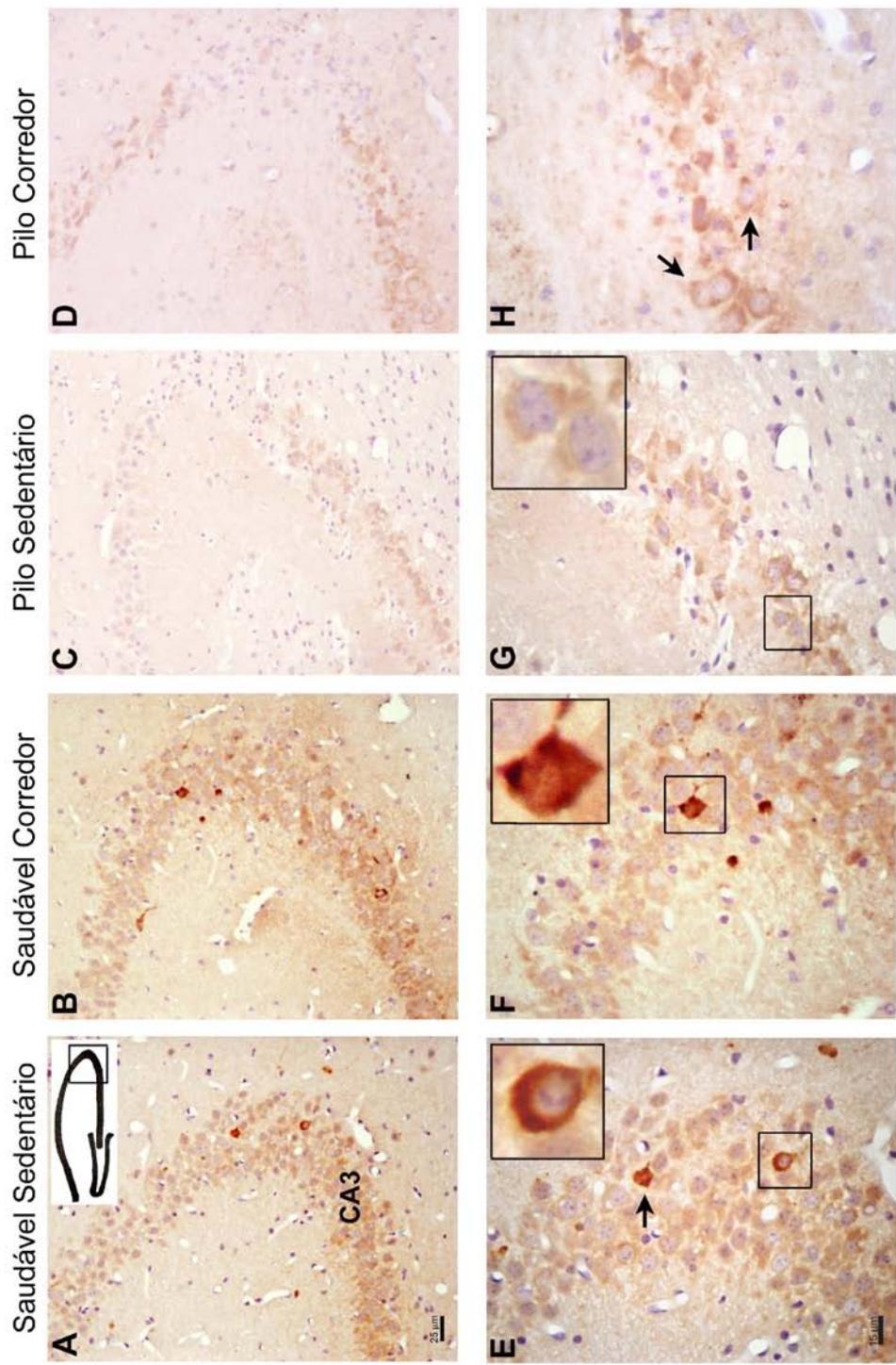


Figura 14. Imunomarcação para nNOS na região CA3 próxima ao Giro Denteado. A-H: Região de CA3 próxima ao Giro Denteado na Formação Hipocampal de animais dos grupos Controle Sedentário, Controle Corredor, Pilo Sedentário e Pilo Corredor. A-D: Imagem panorâmica da região CA3 próxima ao Giro Denteado. E e F – Detalhes da região CA3 próxima ao Giro Denteado de animais do grupo Controle Sedentário e Controle Corredor, respectivamente, mostrando várias células positivas para nNOS. G e H – Detalhes da região CA3 próxima ao Giro Denteado de animais do grupo Pilo Sedentário e Pilo Corredor, respectivamente, mostrando várias células positivas para nNOS (setas). Notar que além do corpo celular é possível visualizar as ramificações que se projetavam de cada neurônio. A-D, barra=25 μ m; E-H, barra=15 μ m.

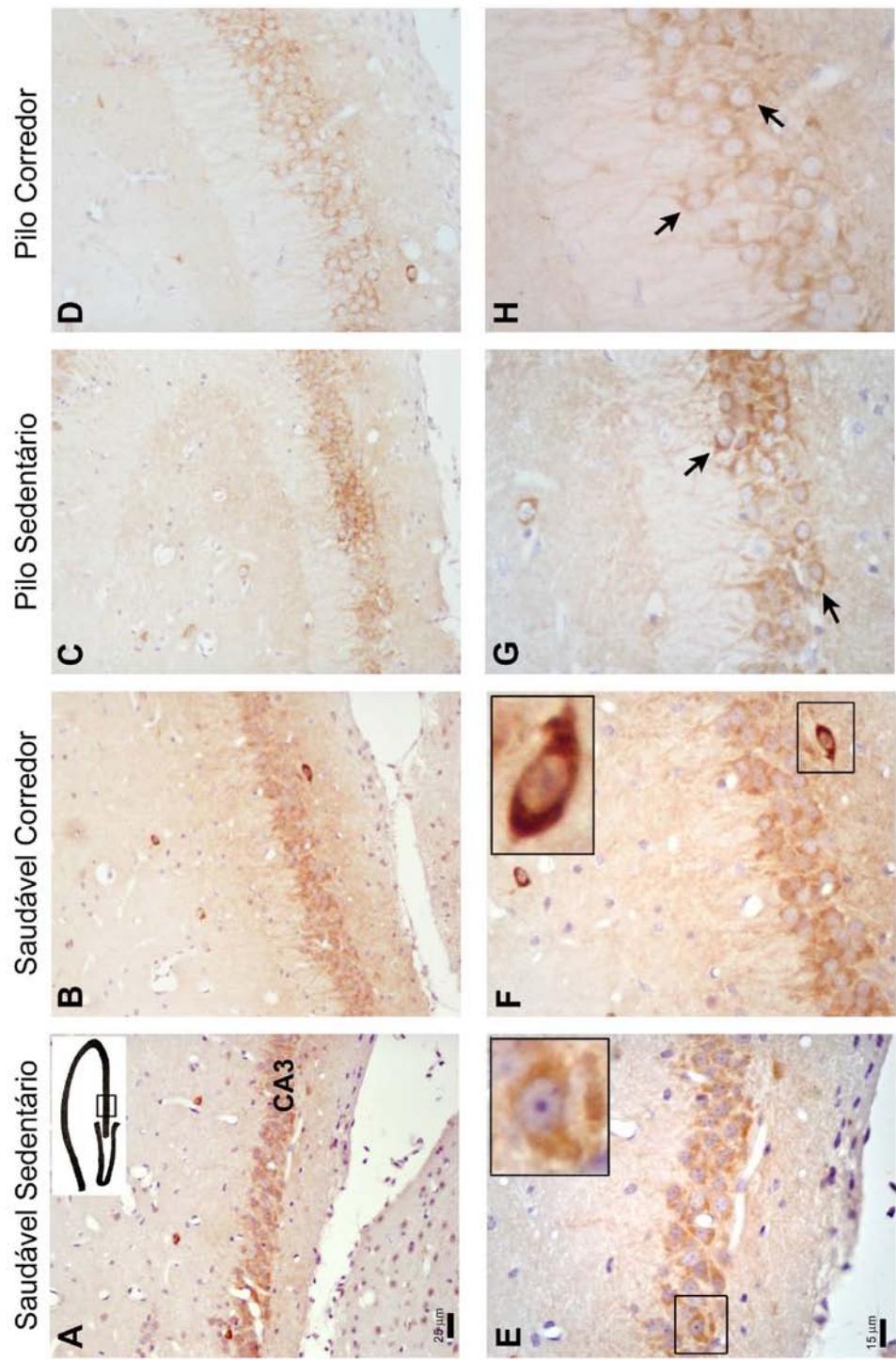
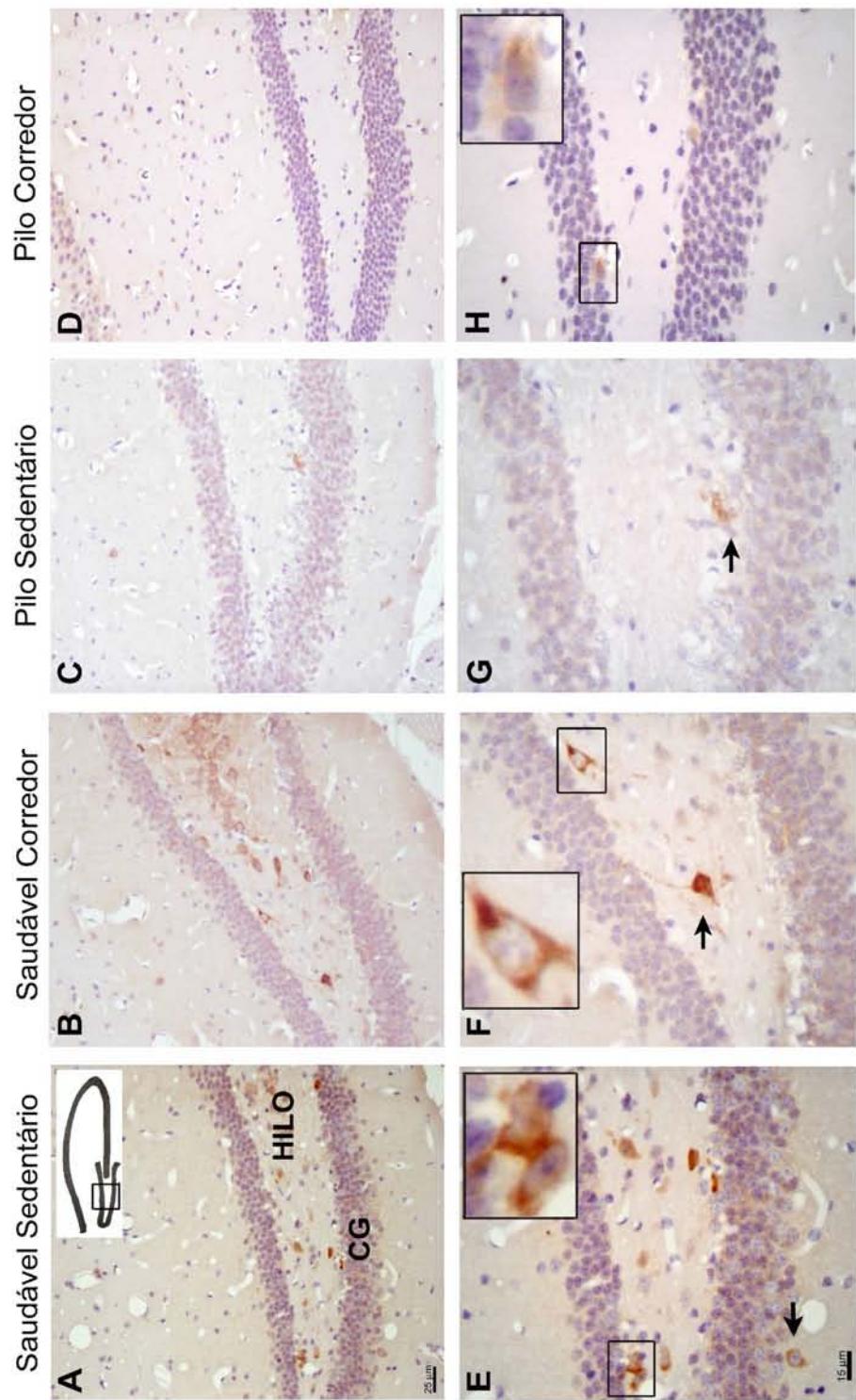


Figura 15. Imunomarcação para nNOS na região do Giro Denteado. A-H: Giro Denteado (hilo e camada granular) na Formação Hipocampal de animais dos grupos Controle Sedentário, Controle Corredor, Pilo Sedentário e Pilo Corredor. A-D: Imagem panorâmica do Giro Denteado. E e F – Detalhes do giro denteado de animais do grupo Controle Sedentário e Controle Corredor, respectivamente, mostrando várias células positivas para nNOS no hilo e raras células positivas para nNOS na camada granular (setas). G e H – Detalhes do Giro Denteado de animais do grupo Pilo Sedentário e Pilo Corredor, respectivamente, mostrando ausência de células positivas para nNOS no hilo e raras células positivas para nNOS indicadas pela seta na camada granular. A-D, barra=25 μ m; E-H, barra=15 μ m.

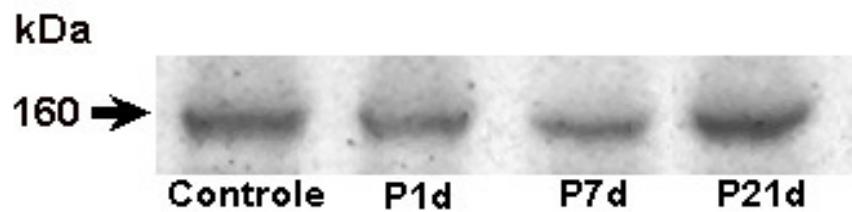


4.5 Expressão protéica da NOS neuronal

Os resultados obtidos pela técnica de Western blot mostram que a expressão protéica da nNOS diminuiu significativamente 1 dia, 7 dias e 21 dias após a indução do SE por pilocarpina quando comparada à dos animais controle ($P1d=73,62\pm3,55\%$; $P7d=50,62\pm7,83\%$; $P21d=74,38\pm3,92\%$; $p<0,05$) (Figura 16). Contudo, é interessante notar que a queda na expressão da nNOS acentuou-se até 7 dias após o SE e retornou aos valores observados após 1 dia.

Por outro lado, não foram observadas diferenças na expressão protéica da NOS neuronal entre os grupos CtS, CtC, PS e PC, ou seja, 35 dias após o SE no caso dos grupos PS e PC (Figura 17).

A)



B)

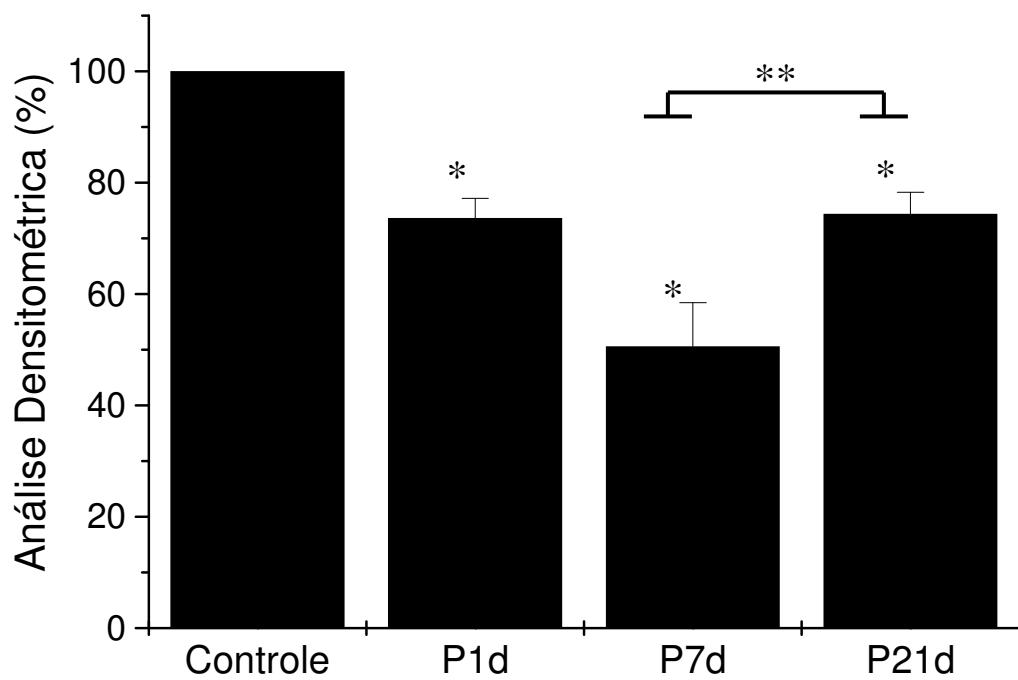
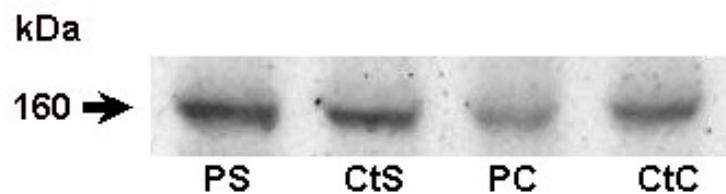


Figura 16. A) Western blot representativo ($n = 5$) da proteína nNOS em amostras de homogenatos de hipocampos ($45\mu\text{g}$) de camundongo submetidos a indução por pilocarpina com sobrevidas de 1 dia, 7 dias e 21 dias. Anticorpo policlonal anti-nNOS (dil. 1:500).

B) Intensidades relativas das bandas da proteína nNOS (quantificadas por densitometria) para os grupos P1d, P7d, P21d e controle (média dos grupos C1d, C7d e C21d) em amostras de hipocampo de camundongo (vide Western blot do painel A). Notar que há queda significante na expressão da proteína nNOS 1 dia após o SE que se acentua com 7 dias do SE (* $p<0,05$; grupo Controle versus P1d, P7d e P21d; ** $p<0,05$; P7d versus P21d).

A)



B)

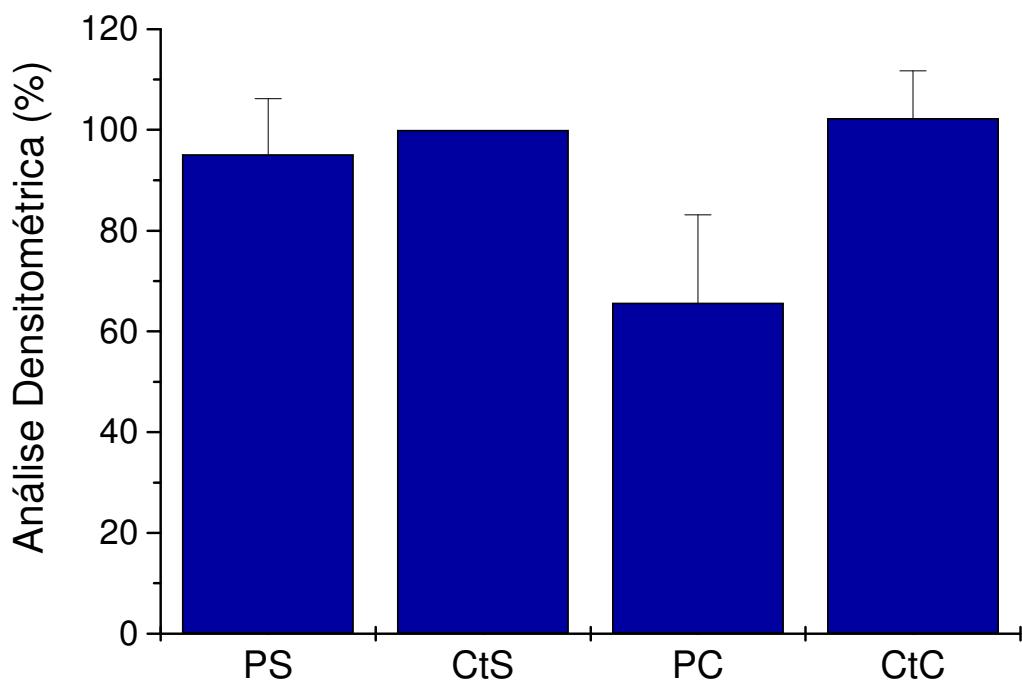


Figura 17. A) Western blot representativo ($n = 5$) da proteína nNOS em amostras de homogenatos de hipocampos ($45\mu\text{g}$) de camundongos submetidos à indução com pilocarpina (PS, PC) e de camundongos injetados com solução salina (CtS, CtC). Anticorpo policlonal anti-nNOS (dil. 1:500).

B) Intensidades relativas das bandas de nNOS (quantificadas por densitometria, considerando-se grupo CtS=100%) para os grupos estudados (vide Western blot do painel A). Notar que não houve diferenças na expressão da proteína nNOS entre os grupos.

4.6 Atividade de Óxido Nítrico Sintase

4.6.1 NOS dependente de Ca²⁺

A atividade da NOS dependente de Ca²⁺ foi significativamente inferior em todos os grupos de animais tratados com pilocarpina quando comparada à dos seus respectivos controles (Ct1d=17,16±1,46 pmol L-citrulina/min/mg de proteína; P1d=8,59±0,88; Ct7d=12,64±1,13; P7d=1,96±0,42; Ct21d=14,94±1,31; P21d=3,18±0,46; CtS=17,42±1,4; PS=5,37±0,51; CtC=15,21±0,19; PC=5,17±0,42/ p<0,001; Figura 18). Dentre os grupos de animais tratados com pilocarpina, pôde-se observar queda significativa da atividade da NOS dependente de Ca²⁺ 7 dias após o SE. Esta queda manteve-se nos 14 dias seguintes e elevou-se 35 dias após o SE (vide grupo PS, Figura 18).

Por outro lado, não houve diferença significativa da atividade da NOS dependente de Ca²⁺ entre os animais sedentários e corredores, quer controles ou tratados com pilocarpina.

4.6.2 NOS independente de Ca²⁺

A atividade da NOS independente de Ca²⁺ foi significativamente superior somente nos animais do grupo P21d quando comparado ao seu respectivo controle (Ct21d=2,51±0,19; P21d=5,24±0,48; p<0,05; Figura 19).

Nos grupos de animais com sobrevida de 35 dias, a atividade da NOS independente de Ca²⁺ foi semelhante entre os grupos de animais sedentários e corredores (CtS=3,46±0,55; CtC=3,26±0,57; PS=4,12±0,32; PC=4,13±0,34, Figura 19).

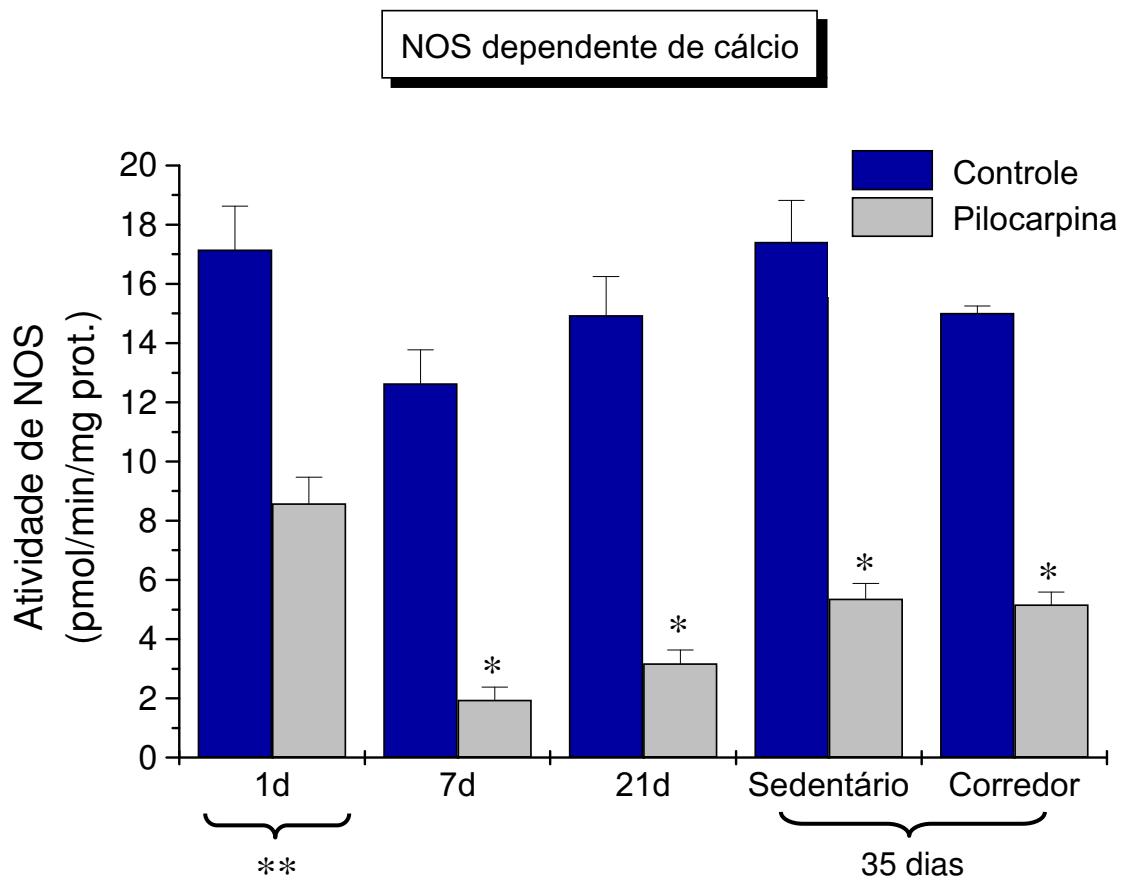


Figura 18. Atividade da NOS dependente de Ca^{2+} obtida de homogenato de hipocampo de camundongos submetidos à indução com pilocarpina e controle em diferentes tempos de sobrevida (1dia, 7 dias, 21 dias e 35 dias). Notar que a atividade da NOS dependente de Ca^{2+} foi significativamente inferior em todos os grupos tratados com pilocarpina quando comparado aos seus respectivos controles (**p<0,001; grupos controle versus grupo pilocarpina). Notar também uma redução significativa da atividade da NOS dependente de Ca^{2+} 7 dias após o SE que se manteve nos 14 dias seguintes e elevou-se 35 dias após SE (*p<0,05; grupo P1d versus P7d, P21d, PS e PC). Os valores estão expressos em média±E.P.M.

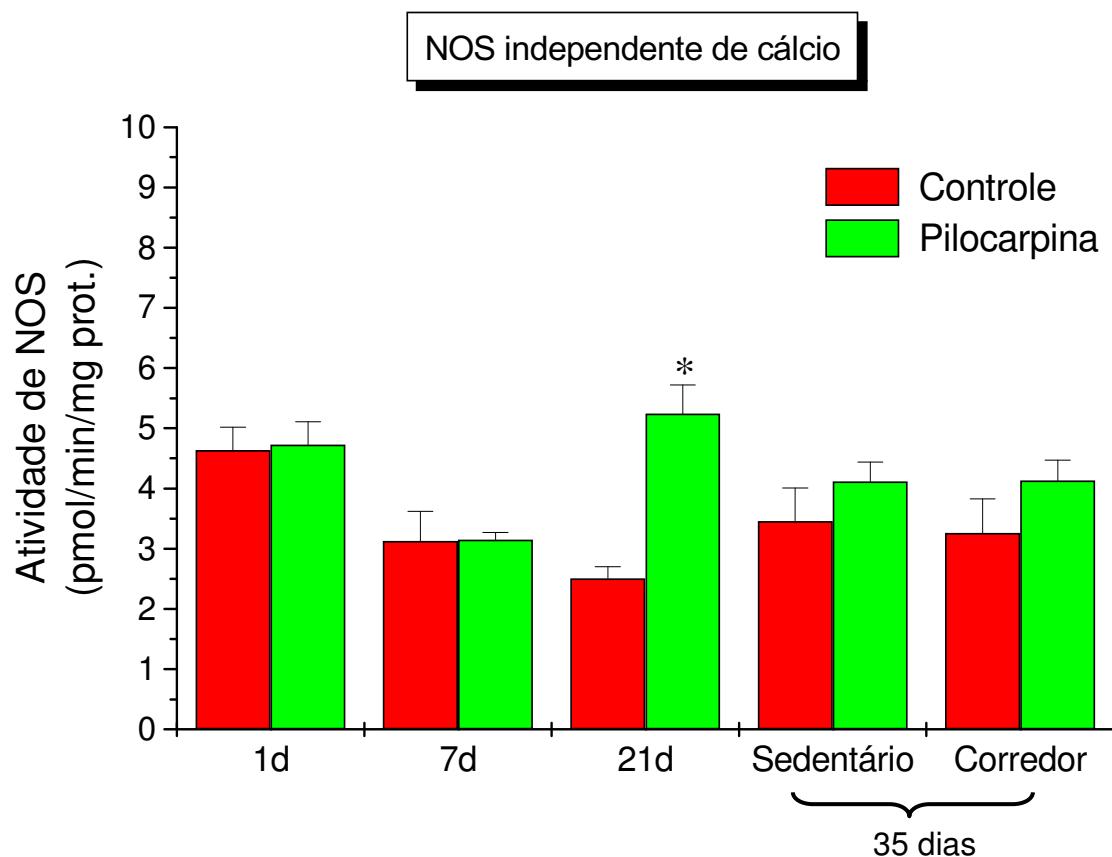


Figura 19. Atividade da NOS independente de Ca^{2+} obtida de homogenato de hipocampo de camundongos submetidos à indução com pilocarpina e controle em diferentes tempos de sobrevida (1 dia, 7 dias, 21 dias e 35 dias). Notar que a atividade da NOS independente de Ca^{2+} foi significantemente superior somente no grupo P21d, quando comparado ao seu respectivo controle Ct21d ($**p<0,001$). Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. ($*p<0,001$; P21d versus Ct21d).

5. Discussão

A atividade física contribui positivamente para a plasticidade cerebral ao facilitar processos neuroadaptativos e neuroprotetores (VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005; KIRALY e KIRALY, 2005; DISHMAN et al., 2006). Por sua vez, o NO tem sido implicado como molécula chave nos mecanismos intracelulares de pró-sobrevivência ativados pelo exercício e como importante mediador em processos de plasticidade neuronal (CHEN et al., 2006). No presente estudo, investigamos o possível envolvimento do NO nos efeitos da atividade física voluntária sobre memória espacial de camundongos que desenvolveram *status epilepticus* (SE) induzido por pilocarpina.

O protocolo de atividade física voluntária em roda de corrida, empregado neste trabalho, tem a vantagem de evitar variáveis associadas ao estresse produzido pela atividade física forçada em esteira (COTMAN e BERCHTOLD, 2002). Além disso, este protocolo permite simular aspectos do comportamento humano, uma vez que os animais podem determinar, espontaneamente, quando e com que freqüência acessar a roda de atividade (VAYNMAN et al., 2004).

Os resultados deste estudo mostraram que, após o período de 28 dias de treinamento na roda de corrida, o padrão de comportamento assim como o volume de atividade física (VAF) foi diferente entre os grupos de animais que receberam pilocarpina ou salina. Os animais controle corredor correram em média $5,62 \pm 0,22$ km/dia, um volume significativamente superior aos animais tratados com pilocarpina. Este volume de VAF foi coerente aos dados obtidos por VAN PRAAG e colaboradores (1999a), os quais relataram que camundongos C57BL/6 correram em média $4,78 \pm 0,41$ km/dia. Além disso, num estudo previamente realizado em nosso laboratório computou-se um VAF médio de

5,37±0,22km/dia em camundongos controle da mesma linhagem, o qual foi superior ao VAF dos animais que tiveram o SE induzido com pilocarpina (SARTORI, 2005).

O menor VAF verificado no grupo de animais que receberam pilocarpina pode ser justificado pela lesão na formação hipocampal provocada por essa substância. RHODES e colaboradores (2003) constataram forte correlação entre VAF e atividade neural no giro denteadoo de camundongos com acesso à roda de atividade. Segundo esses autores, a expressão da proteína *Fos*, empregada como marcador de atividade neural precoce (DRAGUNOW e FAULL, 1989), parece refletir a ativação do hipocampo e produzida por *input* sensitivo decorrente da atividade motora. Desta forma, o hipocampo poderia exercer uma importante função na modulação do comportamento motor influenciando os aspectos qualitativos e quantitativos do movimento (ODDIE e BLAND, 1998). Não obstante a importância dessa modulação exercida pelo hipocampo sobre a atividade motora, animais com lesões hipocampais são capazes de se locomover sem prejuízos aparentes. Entretanto, estes animais são incapazes de produzir movimentos intensos tipicamente associados a alguns tipos de ação motora, como saltos de grande amplitude e corrida rápida numa roda de atividade. De fato, Morris e Hagan (1983) verificaram que embora os ratos com lesão hipocampal (fímbria-fórnix) pudesse saltar, o faziam com menor intensidade que a exibida por ratos normais. Por conseguinte, podemos inferir que o menor VAF apresentado pelos animais que tiveram o SE se deva à sua dificuldade de manter uma alta velocidade de locomoção na roda de atividade.

Quanto ao comportamento dos animais nas gaiolas com roda de atividade ao longo de todo o período experimental (28 dias), verificou-se que os animais controle corredores (CtC) apresentaram VAF alto no primeiro dia. Este valor decaiu nas 48 horas seguintes, mas aumentou gradualmente até o final do período. O padrão crescente do VAF nestes

animais ao longo do período pode refletir uma melhora no condicionamento físico dos animais (ADLARD et al., 2004). Por outro lado, no grupo de animais que tiveram SE (PC) constatou-se ausência de atividade nos dois primeiros dias de treinamento e atingiu o valor máximo no 4º dia de treinamento.

Verificamos em nosso laboratório que os animais que tiveram o SE induzido por pilocarpina se recuperavam do quadro neurológico agudo após 2 dias e exibiram autonomia para se alimentar e se movimentar na gaiola. Desta forma, só após esse período os animais foram transferidos para gaiolas com roda de atividade. Contudo, é possível que a recuperação das condições físicas e/ou motivacionais dos animais durante as primeiras 48 horas após o SE não tenha sido suficiente para que pudessem acessar a roda de atividade (CAVALHEIRO et al., 1996).

Nossas observações também revelaram que mobilidade dos animais no teste do labirinto aquático foi semelhante entre os animais de todos os grupos. Ou seja, os camundongos que desenvolveram o SE nadaram de forma similar aos animais controle corredor, não sendo possível detectar qualquer prejuízo de mobilidade destes animais nas condições do teste. O mesmo foi relatado por outros autores que investigaram funções mnemônicas em modelos experimentais de epilepsia empregando o labirinto aquático (FAVERJON et al., 2002; SARTORI, 2005).

Nos testes com o labirinto aquático, observamos que os animais controle corredor (CtC) e sedentário (CtS) apresentaram desempenhos semelhantes. Ambos os grupos exibiram valores de latência similares ao longo do teste, com queda significativa deste parâmetro entre a 1ª e a 4ª sessões indicando que os animais aprenderam a tarefa. Estes resultados confirmam dados previamente obtidos em nosso laboratório por Sartori (2005) e estão de acordo com o observado por Van Praag e colaboradores (1999a) ao empregarem o

protocolo de quatro tentativas por sessão no teste de labirinto aquático, similar ao adotado no presente trabalho. Contudo, Van Praag e colaboradores (1999a) e, mais recentemente, também outros autores (ADLARD et al., 2004; VAYNMAN, et al., 2004) verificaram que ao utilizarem um protocolo com apenas duas tentativas por sessão foi possível evidenciar que os animais corredores têm desempenho significativamente melhor que os animais sedentários no teste do labirinto aquático.

Dentro deste contexto, devemos destacar que embora o desempenho de ambos os grupos controle (CtS e CtC) tenha sido semelhante em nosso estudo, o grupo CtC exibiu valores de latência que tenderam a ser gradativamente menores que dos animais CtS ao longo das sessões de teste sugerindo um possível ganho funcional decorrente da atividade física. Considerando-se esta tendência, é plausível pressupor que a diferença entre os grupos CtC e CtS poderia se acentuar ao se empregar um protocolo de 2 tentativas por sessão, conforme constatado por outros autores (VAN PRAAG et al., 1999a; ADLARD et al., 2004; VAYNMAN, et al., 2004)

Os efeitos positivos da atividade física desenvolvida pelos animais do grupo PC foram claramente evidenciados no teste do labirinto aquático. Diferentemente do observado nos grupos controle (CtS e CtC), esses animais apresentaram melhor desempenho quando comparados aos animais do grupo PS. De fato, somente os animais PC apresentaram queda significativa nos valores de latência entre a 1^a e a 4^a sessões. Estudos realizados por Rice e colaboradores (1999) verificaram que ratos que tiveram o SE induzido com pilocarpina exibiram latências maiores comparadas às dos ratos controle durante todo o período de testes no labirinto aquático. Além disso, nossos resultados confirmam evidências previamente obtidas em nosso laboratório (SARTORI, 2005).

Após a última sessão de testes para memória de referência espacial realizou-se o teste para avaliação da retenção da memória (*Probe Test*). Neste teste, com duração total de um minuto, quanto maior o número de vezes que o animal entra no contador crítico melhor é sua retenção de memória espacial. 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, constatou-se que durante um minuto os animais do grupo CtC apresentaram um número de entradas no contador crítico semelhante ao dos animais PC e superior ao dos animais dos grupos sedentários CtS e PS. Embora não tenham sido observadas diferenças entre os grupos de animais que receberam pilocarpina, o grupo PC apresentou tendência a melhor performance que também pode ser evidenciada quando comparado ao grupo CtS. Deste modo, os resultados obtidos no *Probe Test* reforçam aqueles observados no teste de memória de referência espacial e sugerem que a atividade física teve efeito positivo sobre a função mnemônica.

O modelo experimental de epilepsia utilizado neste estudo baseia-se na indução de atividade epiléptica a partir da aplicação sistêmica de pilocarpina, um potente agonista colinérgico muscarínico. Ao ativar receptores colinérgicos de neurônios hipocampais, a pilocarpina irá promover a despolarização destes neurônios desencadeando um processo de hiperatividade na circuitaria hipocampal. Em um segundo momento, esta hiperatividade hipocampal levará ao aumento da liberação de glutamato e ativação de receptores para glutamato do tipo NMDA (NMDARs) (CAVALHEIRO, 1995; HAMILTON, et al., 1997; SANABRIA e CAVALHEIRO, 2000). Por sua vez, a ativação do sistema glutamatérgico gerará um excessivo influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) ou a liberação excessiva dos estoques intracelulares aumentando sua concentração intracelular, com subsequente ativação de proteases, lipases, fosfatases e endonucleases que diretamente danificam estruturas

celulares ou induzem à formação de radicais livres oxidativos que são mediadores de morte celular. Desta forma, acredita-se que a morte celular observada neste modelo, em camundongos, seja decorrente da excitotoxicidade, neurodegeneração mediada por receptores de aminoácidos excitatórios, desencadeada pelos eventos acima descritos (OLNEY, 1969; TURSKI et al., 1984).

O estresse oxidativo e o cálcio são componentes importantíssimos na excitotoxicidade (ARUNDINE e TYMIANSKY, 2003; SALINSKA et al., 2005). Embora todas as células hipocampais sejam excitadas durante as crises epilépticas, a morte neuronal parece ser seletiva sugerindo que algumas populações neuronais sejam mais vulneráveis do que outras. Portanto, células dotadas de proteínas intracelulares ligantes de cálcio como calbindina, parvalbumina e calretinina têm menor suscetibilidade à neurodegeneração por excitotoxicidade (SYNTICHIKI e TAVERNARAKIS, 2003).

As proteínas ligantes de cálcio estão distribuídas ao longo de todo o hipocampo. No giro denteadoo, por exemplo, a proteína ligante de cálcio calbindina está presente nas células granulares, enquanto que a parvalbumina e calretinina são encontradas nos interneurônios da camada granular (MÁTYAS et al., 2004). Por outro lado, as células musgosas do hilo do giro denteadoo, 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 somente os interneurônios desta região expressam parvalbumina e calretinina. Entretanto, na região CA1, além da presença de interneurônios que expressam parvalbumina e calretinina, há também neurônios piramidais superficiais os quais expressam calbindina (MÁTYAS et al., 2004).

Nossos resultados mostraram que o hilo do giro denteadoo e a camada piramidal CA3 foram as regiões que apresentaram os maiores escores de lesão, enquanto que a

camada piramidal de CA1 e a camada granular do giro denteadoo demonstraram-se relativamente preservadas. Os dados descritos acima indicam que as regiões com maior perda celular referem-se àquelas com população neuronal mais vulnerável à morte, mostrando coerência com a distribuição de proteínas ligantes de cálcio em cada uma destas regiões. Este padrão de perda neuronal foi semelhante ao previamente descrito em outros trabalhos com camundongos (TURSKY et al., 1984; CAVALHEIRO et al., 1996; NASCIMENTO, 2004; SARTORI, 2005). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os escores médios de perda neuronal entre os animais sedentários e corredores (PS e PC) em quaisquer das estruturas da formação hipocampal analisadas. Nossos achados corroboram os resultados previamente obtidos em nosso laboratório, considerando-se as mesmas condições experimentais (SARTORI, 2005). Além disso, Faverjon e colaboradores (2002) não observaram diferenças na extensão da perda celular nas regiões CA3, CA1 e no hilo do giro denteadoo de ratos neonatos que tiveram SE induzido por injeção de lítio-pilocarpina e, posteriormente, mantidos em ambiente enriquecido (AE) com roda de atividade e outros componentes.

Em contrapartida, Young e colaboradores (1999) constataram que ratos expostos ao AE por três semanas antes da indução do SE por injeção de cainato apresentaram menor perda neuronal na região CA3 e no hilo. Além disso, os mesmos autores verificaram que nos animais expostos ao AE houve uma maior expressão de fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), os quais seriam responsáveis pela neuroproteção conferida a estes animais. Ainda neste estudo, Young e colaboradores (1999) sugerem a possível participação de outras moléculas neurotróficas, tais como fator de crescimento de fibroblasto (FGF), o fator de crescimento do nervo (NGF) e a neurotrofina-3 (NT-3) as quais se elevam em virtude de exercício físico e que

poderiam estar contribuindo para a neuroproteção destes animais. No presente estudo, a atividade física foi proporcionada aos animais apenas dois dias 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 SE. Por outro lado, considerando nossos resultados comportamentais, é válido supor que embora os níveis dos fatores neurotróficos estivessem abaixo de valores necessários para neuroproteção por ocasião do SE, estes fatores podem ter sido elevados no decorrer do período de atividade física.

A excitotoxicidade produzida pelo glutamato tem sido associada à intensa produção de óxido nítrico, que leva ao aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) (GARTHWAITE, 1991; DAWSON e DAWSON, 1996; DUNCAN e HEALES, 2005; GUIX et al., 2005; SALINSKA et al., 2005). Detalhadamente, o NO reage com o ânion superóxido (O_2^-) formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), o qual é responsável, em sua maioria, pela ativação de vias neurotóxicas e consequente morte celular (DAWSON et al., 1991, 1993 e 1996). A síntese de NO a partir de L-arginina é mediada pelas três isoformas da sintase do óxido nítrico (NOS), sendo a NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS) reguladas pelo íon Ca^{2+} e constitutivamente expressas em células neuronais e endoteliais, respectivamente. Por outro lado, a NOS induzida (iNOS) é independente de Ca^{2+} e é expressa por macrófagos, astrócitos e outras células em resposta a estímulos de natureza inflamatória ou imunológica. No contexto da ativação glutamatérgica, a intensa produção de NO pode ocorrer pela ativação da nNOS, a qual é dependente de cálcio, em consequência da persistente estimulação dos NMDARs ou pela indução da iNOS por citocinas ou endotoxinas (CHABRIER et al., 1999). Apesar disso, o próprio NO pode aumentar a liberação de glutamato o que leva à intensa ativação de receptores de glutamato

do tipo NMDA fortalecendo os efeitos excitotóxicos deste neurotransmissor e, finalmente, resultando na morte neuronal (SALINSKA et al., 2005).

Atualmente, diversos estudos têm admitido o NO como um dos mediadores das moléstias neurodegenerativas e injúrias neuronais como, por exemplo, a epilepsia (KIRKBY et al., 1996; HUH et al., 2000; RAJASEKARAN, 2005; KATO et al., 2005; SALINSKA et al., 2005). No modelo da pilocarpina, em particular, estudos realizados com N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), um inibidor não seletivo das NOS, atribuíram um papel anti-convulsivante ao NO, uma vez que o inibidor L-NAME potencializou as crises induzidas por pilocarpina (STARR e STARR, 1993; MAGGIO et al., 1995; PRZEGALIŃSKI et al., 1996; DZOLJIC et al., 1997; WOJTAL et al., 2003). Por outro lado, Van Leeuwen e colaboradores (1995) verificaram que a administração de 7-nitroindazole, inibidor específico da nNOS, atenuou as crises induzidas por pilocarpina em camundongos implicando que o NO age como um fator pró-convulsivante no SNC.

O presente estudo revelou dados inéditos quanto à expressão da nNOS e à atividade da NOS no hipocampo de camundongos tratados com pilocarpina. Nossos resultados mostraram que o SE induzido por pilocarpina diminuiu temporariamente a expressão protéica da nNOS no hipocampo de camundongos. Tal redução temporária pode ser justificada pela significativa perda neuronal detectada nestes animais. Desta forma, é possível que os neurônios que morreram em consequência ao insulto excitotóxico expressavam a proteína nNOS. No entanto, não podemos descartar que a queda da expressão da nNOS possa estar relacionada com mecanismos de regulação da sua expressão nos neurônios sobrevidentes. É importante ressaltar que a expressão da nNOS pode ser dinamicamente regulada em diversas condições fisiológicas e fisiopatológicas. Um estudo realizado por Zhang e colaboradores (1994) observou o aumento da expressão protéica e

gênica da nNOS em ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média. Os mesmos autores sugeriram que o aumento da expressão da nNOS contribui para a propagação da morte neuronal após o insulto isquêmico (ZHANG et al., 1994; SAMDANI et al., 1997; FÖRSTERMANN et al., 1998). Em um outro estudo, Prabhakar e colaboradores (1996) observaram um aumento da expressão protéica da nNOS em neurônios centrais e periféricos de ratos submetidos à hipóxia hipobárica.

Segundo Baader e colaboradores (1996), a expressão da proteína nNOS também pode ser regulada pelas mudanças na atividade neuronal. Estes autores, ao realizarem um estudo *in vitro* com células granulares do cerebelo, observaram que a inibição da neurotransmissão glutamatérgica aumentou a expressão da nNOS nestas células. Os mesmos autores sugerem que a expressão da nNOS é regulada por neurotransmissores excitatórios e que o cálcio é o principal responsável pelas mudanças na expressão desta proteína. Assim, a ativação de receptores metabotrópicos de glutamato leva ao aumento da concentração de Ca^{2+} proveniente de estoques intracelulares ou pela abertura de canais de cálcio voltagem dependente (VDCCs) regulando para baixo os níveis de nNOS nas células granulares.

Interessantemente, os resultados do presente estudo corroboram as observações de Baader e Schilling (1996). O insulto excitotóxico característico deste modelo é mediado pela ativação do sistema glutamatérgico e excessiva liberação de cálcio. Desta forma, é plausível supor que a queda da expressão protéica da nNOS constatada 1 dia e 7 dias após o SE por pilocarpina seja justificada pelos elevados níveis de cálcio. No entanto, nossos resultados demonstraram que a expressão protéica da nNOS retorna aos níveis basais 35 dias após o SE. É importante ressaltar que os animais tratados com pilocarpina encontravam-se no período silente do modelo experimental caracterizado pela ausência de

crises, o qual possui duração média de $14,4 \pm 11,9$ dias (CAVALHEIRO et al., 1996).

Embora no presente trabalho não tenham sido monitorados possíveis eventos de crises recorrentes, o retorno da expressão protéica a níveis basais pode ser justificado pela recuperação destes animais após o SE.

Uma outra hipótese está relacionada à expressão da proteína nNOS por astrócitos. Borges e colaboradores (2003), ao estudarem as alterações neuropatológicas no modelo da pilocarpina em camundongos, verificaram a ocorrência de morte neuronal na formação hipocampal, em especial na camada piramidal de CA3. Ainda no mesmo estudo, detectou uma intensa reação astrocitária nas áreas de lesão, após 10 dias do SE. Segundo dados da literatura, a expressão da proteína nNOS no hipocampo não se restringe aos neurônios, mas pode ser também detectada em astrócitos, contudo em baixos níveis de expressão (KUGLER et al., 1996; CATANIA et al., 2003). Especificamente na epilepsia, Catania e colaboradores (2003), ao induzir epilepsia por estimulação elétrica verificaram que o hipocampo de ratos epiléticos apresentou maior imunorreatividade para nNOS do que os animais controles e que tal imunorreatividade era presente tanto em neurônios quanto em astrócitos. Estudos previamente realizados em nosso laboratório verificaram uma intensa reação astrocitária no hipocampo de camundongos tratados com pilocarpina 7 e 21 dias após o SE (dados não publicados). Logo, podemos supor que a nNOS detectada no hipocampo dos animais tratados com pilocarpina, pela técnica de western blot, provém não só dos neurônios sobreviventes, mas também de astrócitos. Por fim, a semelhança encontrada nos resultados da expressão protéica da nNOS entre os animais injetados com pilocarpina e os animais controle (CtC e CtS) pode ser justificada pela intensa reação astrocitária comum neste modelo, considerando-se que houve morte neuronal.

Sobre a distribuição da proteína nNOS nos neurônios hipocampais, nossos resultados revelaram a presença de neurônios positivos para nNOS em CA1, CA3, hilo e camada granular do giro denteado no hipocampo dos animais controle (CtC e CtS). A região CA3 foi a região que apresentou a maior população de neurônios imunorreativos para a nNOS com destaque para a porção mais próxima ao giro denteado. Estes dados corroboram os achados de Gotti e colaboradores (2005) ao analisar a distribuição da imunorreatividade da NOS no cérebro de camundongos. Estes autores verificaram a presença de neurônios positivos para nNOS em todas as regiões mencionadas acima e destacou a região localizada entre CA3 e o giro denteado como a área mais intensamente marcada, o que também foi evidenciado em nossos resultados. É importante lembrar que no presente estudo esta região de transição foi nomeada como a porção de CA3 mais próxima do giro denteado.

Ao contrário dos animais controle (CtC e CtS), não se observou a presença de neurônios positivos para nNOS no hilo dos animais tratados com pilocarpina. Os resultados referentes à morte neuronal corroboram a ausência de neurônios positivos para nNOS no hilo que foi a região que apresentou os maiores escores de lesão. Além disso, Fujise e colaboradores (1998) verificaram que as células musgosas do hilo do giro denteado, que são o principal componente celular desta região, não apresentam proteínas ligantes de cálcio. Adicionalmente, Hamani e colaboradores (1999) ao investigarem a expressão histoquímica de NADPHd (um marcador de neurônios que contém NO) no hipocampo de ratos submetidos ao SE por pilocarpina observaram uma redução significativa de neurônios positivos para NADPHd na região do hilo. Leite e colaboradores (2002), ao realizaram um estudo em humanos *ex vivo* observaram uma diminuição de neurônios positivos para nNOS

no hipocampo de pacientes portadores da epilepsia do lobo temporal (ELT). Tal redução foi significativamente observada em CA3, CA2, CA1, hilo e fáscia denteadas.

Quanto à atividade das diferentes isoformas da NOS, nossos resultados revelaram que o SE induzido por pilocarpina diminuiu a atividade das NOS dependentes de cálcio (eNOS e nNOS) no hipocampo de camundongos. A redução dessa atividade pode ser justificada pela queda da expressão da proteína nNOS no hipocampo destes animais em consequência da morte neuronal. Por outro lado, é possível que a redução da atividade da NOS dependente de cálcio esteja relacionada com o mecanismo de auto-inibição da NOS ou mecanismo de controle por *feedback* (ALDERTON et al., 2001). Os mecanismos de ação do NO como um inibidor da NOS é atribuído a uma interação direta entre o NO e alguns grupos funcionais da NOS como o grupo heme. O NO interfere no substrato da oxidação ao se ligar ao citocromo P450 interferindo na oxidação enzimática da L-arginina (GRISCAVAGE et al., 1994; KOTSONIS et al., 1999). Além disso, o NO pode reagir com o ânion superóxido formando o peroxinitrito o qual diminui a geração de NO pela eNOS via inibição da proteína quinase Akt, (ZOU et al., 2002). Adicionalmente, o peroxinitrito pode reagir com o cofator da NOS tetrahidrobiopterina (BH4), o cofator mais importante para a NOS, diminuindo, diretamente, a atividade da NOS (KUZKAYA et al., 2003; GOVERS e OESS, 2004). Embora, o presente trabalho não tenha avaliado a atividade das diferentes isoformas da NOS em tempos anteriores a 24 horas, podemos sugerir um provável aumento do NO neste período que poderia afetar a atividade da NOS dependente de cálcio e resultar na posterior redução catalítica desta enzima.

O cálcio é considerado o principal regulador da NOS constitutiva (eNOS e nNOS) o qual estimula a atividade da enzima através da interação com a calmodulina (CaM). No cérebro, a interação do domínio PDZ da nNOS com a proteína PSD-95 é de fundamental

importância para a ligação desta enzima ao receptor NMDA. Esta ligação conferida pela proteína PSD-95 facilitará a exposição direta da nNOS ao influxo de Ca^{+2} , via receptor NMDA, ativando-a. É importante destacar que diversos estudos têm mostrado a participação de outras proteínas na regulação da atividade da NOS dependente de cálcio (SATTLER et al., 1999; TOMITA et al., 2001; ESPLUGUES, 2002; DREYER et al., 2004). Um exemplo disto é a proteína CAPON (C-terminal PDZ ligante da nNOS) a qual compete com a PSD-95 pela interação com a nNOS no cérebro e impede a ativação desta enzima pelo Ca^{+2} (JAFFREY e SNYDER, 1996; JAFFREY et al., 1998; DREYER et al., 2004). Uma outra proteína denominada PIN (proteína inibidora da nNOS) inibe a atividade da nNOS através da desestabilização do dímero ao se ligar à porção N terminal da enzima. (JAFFREY e SNYDER, 1996).

Recentemente, Dedio e colaboradores (2001) identificaram uma nova proteína denominada NOSIP (proteína de interação da NOS) capaz de exercer um efeito inibitório na eNOS ao se ligar à porção C-terminal desta enzima. Posteriormente, Dreyer e colaboradores (2004) verificaram que a NOSIP também exerce um efeito inibitório na atividade catalítica da nNOS quando acoplada a esta enzima. Tais autores observaram que neuroepiteliomas transfetados com NOSIP apresentaram uma redução na atividade da nNOS quando comparadas às células não transfetadas *in vitro*. Ainda neste estudo, os autores analisaram a distribuição de NOSIP *in vivo* e verificaram que no cérebro de ratos esta proteína encontrava-se expressa no cerebelo, córtex e hipocampo, principalmente no giro denteadoo. Além disso, observaram também um aumento da expressão de NOSIP nas regiões de CA1, CA2 e giro denteadoo no hipocampo de camundongos após crises induzidas por ácido cainico. Os mecanismos pelos quais a NOSIP atenua a atividade da nNOS ainda não estão completamente elucidados.

Assim como a nNOS, as proteínas PIN, CAPON e NOSIP também são expressas no hipocampo (GREENWOOD et al., 1997; JAFFREY et al., 1998) e podem estar relacionadas com a redução da atividade da NOS dependente de cálcio observada nos animais que tiveram o SE. De fato, a atuação isolada destas proteínas poderia não ser suficiente para reduzir a atividade da NOS dependente de cálcio nestes animais. Contudo, a atuação destas proteínas em conjunto ao próprio NO podem esclarecer o comportamento destas isoenzimas neste modelo experimental.

Não obstante, nossos resultados demonstraram um aumento da atividade da NOS induzida 21 dias após o SE induzido por pilocarpina. É possível que este súbito aumento da atividade da NOS independente de cálcio esteja relacionado com a expressão da proteína iNOS pelos astrócitos. Estudos previamente realizados em nosso laboratório constataram uma intensa reação astrocitária no hipocampo de camundongos 21 dias após o SE induzido por pilocarpina (dados não publicados). De fato, o aumento da atividade da iNOS coincide temporalmente com intensa proliferação de astrócitos no hipocampo destes animais sugerindo uma possível relação entre estes eventos. Recentemente, Kalinichenko e colaboradores (2005) investigaram a expressão de iNOS em astrócitos após crises epilépticas audiogênicas. Neste estudo, tais autores observaram que ratos geneticamente predispostos a crises convulsivas audiogênicas apresentaram células imunorreativas para iNOS e GFAP no foco epiléptico do córtex temporal.

No contexto da atividade física, nossos resultados mostraram que a atividade da NOS, assim como a expressão da proteína nNOS no hipocampo, foi semelhante em ambos os grupos sedentários e corredores, controle ou induzidos ao SE. Os dados deste estudo sugerem que o ganho funcional promovido pela atividade física voluntária na memória

espacial dos animais do grupo PC resultou da ativação de mecanismos moleculares talvez não diretamente mediados pelo NO.

Diversos estudos têm observado que os efeitos benéficos do exercício no aprendizado e memória estão relacionados com o aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (ADLARD et al., 2004; VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2004 e 2005). Nesta linha, Vaynman e colaboradores (2004) verificaram que ratos que tiveram acesso a uma roda de atividade apresentaram maior expressão de sinapsina I, BDNF, CREB e CREB fosforilado, este último sendo um fator de transcrição importante nos processos de armazenamento da memória a longo prazo. Ainda neste estudo, estes autores observaram que os animais corredores tratados com uma molécula quimérica (TrkB-IgG), que impede a ação do BDNF, apresentaram pior desempenho no labirinto aquático comparado aos animais corredores controle. Além disso, a inibição da ação do BDNF bloqueou o aumento de CREB, sinapsina I, RNAm do BDNF e CREB fosforilado induzido pelo exercício.

Membro da família das neurotrofinas, o BDNF é abundantemente expresso na formação hipocampal (FH) e desempenha um importante papel na plasticidade sináptica dependente de atividade sináptica, como a LTP. A aquisição e a consolidação da memória estão associadas ao aumento da expressão gênica do BDNF e também à ativação do seu receptor tirosina quinase TrkB (YAMADA e NABESHIMA, 2003). A interação do BDNF com seu receptor TrkB leva à dimerização deste e à autofosforilação do resíduo tirosina no domínio intracelular do receptor e subsequente ativação de vias de sinalização citoplasmática incluindo a MAPK, fosfolipase C- γ (PLC- γ) e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3-K) (KAPLAN e MILLER, 2000). Em linhas gerais, a fosforilação do TrkB resulta na ativação da PI-3 quinase a qual fosforila a Akt (proteína quinase serina-treonina) que por

sua vez fosforila a GSK-3 β , uma das muitas quinases capazes de fosforilar o CREB. Este fosforilado (CREBp) transcreve uma variedade de genes promotores da sobrevivência neuronal (CHEN e RUSSO-NEUSTADT, 2005).

Recentemente, Mizuno e colaboradores (2000 e 2003) demonstraram que a ativação da via BDNF/TrkB/PI3-K/Akt no hipocampo é importante para a memória espacial. Estes autores verificaram que a formação da memória espacial está associada com o aumento da expressão de RNAm do BDNF no hipocampo de ratos submetidos ao teste no labirinto do braço radial. Além disso, ratos tratados cronicamente com um inibidor da PI3-K apresentavam um prejuízo no aprendizado espacial. Interessantemente, Chen e Russo-Neustadt (2005) verificaram que a prática de atividade física voluntária também resulta na ativação da via PI3-K. Tais autores observaram que após duas semanas de atividade voluntária na roda de corrida houve aumento da expressão das proteínas PI-3 quinase, Akt-thr308, Trk fosforilado, BDNF, CREBp no hipocampo de ratos adultos. Os achados de Chen e Russo-Neustadt (2005) sugerem que a expressão de BDNF induzida pelo exercício está associada ao aumento da expressão de inúmeras moléculas intermediárias chave da via PI3-K-Akt, a qual é conhecida por seu papel na sobrevivência neuronal. Posteriormente, Chen e colaboradores (2006) constataram que a inibição da NOS através da administração de L-NAME bloqueou os efeitos do exercício crônico sobre a expressão do BDNF e da PI3-K no hipocampo de ratos. Neste estudo, observou-se que os níveis de proteína PI3-K no hipocampo de animais submetidos ao treinamento voluntário em roda de corrida por duas semanas e tratados com L-NAME eram semelhantes aos dos animais controle sedentários. O mesmo comportamento foi verificado quanto à expressão do RNAm e proteína do BDNF.

Estas recentes evidências sugerem a participação do óxido nítrico no aumento da expressão do BDNF e PI3-K no hipocampo de ratos exercitados. Em particular, o exercício físico aumenta a liberação de cálcio mediada pelo glutamato, através de receptores do tipo NMDA, ativando a NOS. O NO produzido aumenta a liberação de noradrenalina (NE) e glutamato adicional, iniciando um *feedback* positivo. Por sua vez, o NO ativa a síntese de PI3-K via GMPc estimulando a cascata de sobrevivência. O exercício também pode estimular a ativação da PI3-K e MAPK mediada pelo receptor TrkB, um *feedback* positivo adicional. Todas estas vias convergem para o aumento da expressão de BDNF e outros genes associados à sobrevivência (CHEN et al., 2006).

Nossos resultados não apontam qualquer alteração na síntese de NO em resposta à atividade física. Entretanto, análises previamente realizadas em nosso laboratório revelaram que os animais corredores (CtC e PC) apresentaram um aumento da expressão protéica do BDNF no hipocampo quando comparado à expressão desta proteína nos animais sedentários (CtS e PS) (dados não publicados). Estes resultados confirmam a possível participação do BDNF nos efeitos positivos da atividade física voluntária sobre a atividade mnemônica. Contudo, no contexto da epilepsia, o sistema nitrérgico não parece estar diretamente ligado aos mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento do BDNF em resposta à atividade física.

Interessantemente, a atividade física voluntária modula a expressão de genes associados à plasticidade neuronal e envolvidos no fenômeno da LTP (TONG et al., 2001). A maioria dos genes afetada pela atividade física está envolvida no tráfego sináptico, via de transdução de sinais ou reguladores transcricionais. Com relação aos genes envolvidos na LTP, a atividade física aumenta a expressão gênica da CaM quinase II, CREB, NMDAR, além dos muitos componentes da cascata MAP-K (TONG et al., 2001; MOLTENI et al.,

2002). Todavia, as diferenças no perfil de expressão temporal entre os vários sistemas de genes ilustram como a atividade física aguda e crônica podem impactar diferentemente o cérebro. Neste contexto, Molteni e colaboradores (2002) verificaram que a via CaM-K é altamente regulada em curtos períodos de exercício, enquanto que a via MAP-K/ERK atua, importantemente, durante o exercício a longo prazo. É válido destacar, que as análises de Monteni e colaboradores (2002) foram realizadas no hipocampo de ratos submetidos a um protocolo de atividade física voluntária em roda de corrida durante 3, 7 e 28 dias. Estas evidências revelam que a atividade física pode atuar através de diferentes vias de sinalização envolvidas no processo de formação da memória. Assim, é plausível supor que os efeitos positivos da atividade física sobre os mecanismos de aprendizado e memória principalmente evidenciados nos animais tratados com pilocarpina resultem da expressão de genes envolvidos na LTP.

É importante enfatizar que a atividade física reduz o estresse oxidativo e o estresse nitrosativo no cérebro (KIRALY e KIRALY, 2005). Um dos mecanismos pelo qual o exercício auxilia no combate ao estresse oxidativo está relacionado com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Somaní e colaboradores (1995) verificaram que o hipocampo é uma região particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, em razão da baixa reserva antioxidante. Ainda neste estudo, estes autores verificaram que o exercício aumentou a atividade da superóxido dismutase (SOD) no hipocampo de ratos submetidos ao treinamento em esteira durante 8 semanas. Destaca-se que a SOD é a enzima responsável pela degradação do ânion superóxido que precede a formação de peroxinitrito e do radical hidroxila. Recentemente, Radák e colaboradores (2001) verificaram que ratos submetidos a um protocolo de exercício na piscina, durante nove semanas, apresentaram um menor acúmulo de derivados de carbonila reativos (RCD) no hipocampo quando

comparados aos animais controle. Além disso, estes animais apresentaram um melhor desempenho nos testes de aprendizado e memória. De acordo com estes autores, a redução do estresse oxidativo parece estar diretamente envolvida com os efeitos positivos da atividade física na função mnemônica destes animais.

Diversos estudos apontam o estresse oxidativo como responsável pela morte neuronal no modelo da pilocarpina. Neste contexto, Bellissimo e colaboradores (2001) observaram uma redução da atividade da SOD no hipocampo de ratos, após 24 horas do SE induzido por pilocarpina. Segundo estes autores, excessivas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem inibir a atividade da SOD e resultar no dano cerebral evidenciado nestes animais. Posteriormente, Freitas e colaboradores (2005) verificaram um aumento da peroxidação lipídica e da formação de nitrito no hipocampo de ratos, após o SE por pilocarpina. Estes dados sugerem um possível aumento na concentração de ROS no hipocampo que estariam envolvidos no dano neuronal. Diante destas evidências, é possível propor que a atividade física voluntária esteja minimizando o estresse oxidativo no hipocampo dos animais tratados com pilocarpina potencializando a atuação das enzimas antioxidante após SE.

Por fim, nossos resultados mostraram que os efeitos positivos da atividade física voluntária na função mnemônica de animais tratados com pilocarpina resultaram da ativação de mecanismos moleculares talvez não diretamente mediados pelo NO. Contudo, outros estudos fazem-se necessários a fim de esclarecer os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos da atividade física na epilepsia.

6. Conclusões

1. Os resultados do presente estudo mostraram que a atividade física voluntária (AFV) de camundongos que desenvolveram o SE contribuiu para o melhor o desempenho destes no labirinto aquático, quando comparado ao dos animais do grupo PS.
2. Nossos resultados sugerem que o ganho funcional promovido pela atividade física voluntária na memória espacial dos animais do grupo PC resultou da ativação de mecanismos moleculares talvez não diretamente mediados pelo NO.
3. Existem evidências de que a AFV é capaz de promover aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que, por sua vez, está envolvido nos processos de aprendizado e memória. Além disso, o BDNF tem sua expressão aumentada em decorrência de crises epilépticas. Assim, é plausível supor que esta molécula desempenhe um papel chave para o melhor desempenho dos animais do grupo PC no teste do labirinto aquático.
4. A indução do SE por pilocarpina em camundongos promoveu queda da expressão protéica da nNOS no hipocampo. Esta pode ser justificada pela morte neuronal resultante do insulto excitotóxico.
5. A recuperação parcial da expressão da nNOS após 21 dias do SE sugere a ativação de mecanismos de plasticidade e reparo tecidual, nos quais os astrócitos podem estar envolvidos.
6. A queda da atividade das isoformas da NOS dependentes de Ca^{2+} mostrou que o insulto excitotóxico modifica o estado funcional dessa enzima além de alterar sua expressão no hipocampo. Além disso, é possível que este fenômeno seja decorrente de mecanismos de auto-inibição da NOS durante as primeiras 24 horas após o SE e pela interação da NOS com agentes inibidores da mesma, especialmente 7 e 21 dias após o SE.

7. A atividade da NOS independente de Ca²⁺ no hipocampo foi afetada diferentemente das demais isoformas pelos eventos celulares associados ao SE. Nossos resultados sugerem que o aumento da atividade da iNOS detectada somente 21 dias após o SE esteja associada à resposta astrocitária que se intensificou neste modelo experimental entre uma e três semanas após SE.
8. O presente trabalho, além de corroborar a importante participação do óxido nítrico nos mecanismos fisiopatológicos da epilepsia, mostrou que as isoformas da NOS responsáveis por sua produção são diferentemente afetadas pelo SE.

7. Referências Bibliográficas

- ABE, K.; PAN, L.H.; WATANABE, M.; KONNO, H.; KATO, T.; ITOYAMA, Y. Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurological Research**, 19: 124-128, 1997.
- 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.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, 357: 593-615, 2001.
- ALLDREDGE, B.K.; LOWENSTEIN, D.H. Status epilepticus: new concepts. **Current Opinion in Neurology**, 12(2): 183-190, 1999.
- AL-NOORI, S.; PIERSON, M.G.; SWANN, J.W. Bases Celulares da Epileptogenicidade Estudadas *In Vitro*. In: COSTA, J.C.; PALMINI, A.; YACUBIAN, E.M.T.; CAVALHEIRO, E.A. **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias- Aspectos Clínicos e Cirúrgicos**, 1^a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 1998, pp. 43-59.
- 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 Research**, 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.
- ARANCIO, O.; KIEBLER, M.; LEE, C.J.; LEV-RAM, V.; TSIEN, R.Y.; KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. **Cell**, 87(6): 1025-1035, 1996.
- ARIDA, R.M.; SCORZA, F.A.; SANTOS, N.F.; PERES, C.A.; CAVALHEIRO, E.A. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Research**, 37: 45-52, 1999.
- ARIDA, R.M.; SANABRIA, E.R.; DA SILVA, A.C.; FARIA, L.C.; SCORZA, F.A.; CAVALHEIRO, E. A. Physical training reverts hippocampal electrophysiological changes in rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. **Physiology & Behavior**, 83(1): 165-171, 2004.

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

AVOLI, M.; LOUVEL, J.; PUMAIN, R.; KOHLING, R. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. **Progress in neurobiology**, 77(3): 166-200, 2005.

BAADER, S.L.; SCHILLING, K. Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. **The journal of Neuroscience**, 16(4): 1440-1449, 1996.

BECKMAN, J.S.; CHEN, J.; CROW, J.P.; YE, Y.Z. Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. **Progress in Brain Research**, 103: 371-380, 1994.

BELLISSIMO, M.I.; AMADO, D.; ABDALLA, D.S.P.; FERREIRA, E.C.; CAVALHEIRO, E.A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, 46: 121-128, 2001.

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

BISHOP, A.; ANDERSON, J.E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. **Toxicology**, 208: 193-205, 2005.

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.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 87(2): 682-685, 1990.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, 8(1): 3-11, 1992.

BREDT, D.S.; FERRIS, C.D.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites: phosphorylation by cyclic AMP dependent protein kinases, protein kinase C, calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. **The Journal of Biology Chemistry**, 267: 10976-10981, 1992.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Annual review of biochemistry**, 63(1): 175-195, 1994a.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. **Neuron**, 13: 301-313, 1994b.

BREDT, D.S. Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. **Journal of Cell Science**, 116: 9-15, 2003.

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

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

CATANIA, M.V.; GIUFFRIDA, R.; SEMINARA, G.; BARBAGALLO, G.; ARONICA, E.; GORTER, J.A.; Dell'ALBANI, P.; RAVAGNA, A.; CALABRESE, V.; GIUFFRIDA-STELLA, A.M. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase *in vitro* stellate astrocytes and *in vivo* reactive astrocytes after electrically induced status epilepticus. **Neurochemical Research**, 28: 607-615, 2003.

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. **Epilepsia**, 32 (6): 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E.A.; BENTIVOGLIO, M. Changes in paravulbin and Calbindin D28K immunoreactivity in rat brain following pilocarpine-induced seizures. **Experimental Brain Research**, 20:131-135, 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**, 3^a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 2000, pp. 201-213.

CHABRIER, P.E.; DEMERLE-PALLARDY, C.; AUGUET, M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. **Cell. Mol. Life Sci.**, 55: 1029-1035, 1999.

CHEN, M.J.; RUSSO-NEUSTADT, A.A. Exercise activates the phosphatidylinositol 3'kinase pathway. **Molecular Brain Research**, 135: 181-193, 2005.

CHEN, M.J.; IVY, A.S.; RUSSO-NEUSTADT, A.A. Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3'kinase expression. **Brain Research Bulletin**, 68: 257-268, 2006.

CHENG, A.; WANG, S.; CAI, J.; RAO, M.S.; MATTSON, M.P. Nitric oxide acts in a positive *feedback* loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. **Developmental biology**, 258: 319-333, 2003.

CHOI, Y.B.; TENNETI, L.; LE, D.A.; ORTIZ, J.; BAI, G.; CHEN, H.S.; LIPTON, S.A. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. **Nature Neuroscience**, 3(1): 15-21, 2000.

CHRISTOPHERSON, K.S.; HILLIER, B.J.; LIM, W.A.; BREDT, D.S. PSD-95 Assembles a Ternary Complex with the *N*-Methyl-D-aspartic Acid Receptor and a Bivalent Neuronal NO Synthase PDZ Domain. **The Journal of Biology Chemistry**, 274: 27467-27473, 1999.

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.

CORK, R.J.; PERRONE, M.L.; BRIDGES, D.; WANDELL, J.; SCHEINER, C.A.; MIZE, R.R. A web-accessible digital atlas of the distribution of nitric oxide synthase in the mouse brain, **Progress in Brain Research**, 118: 37-50, 1998.

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

DAL-PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M.M.; SCHRODER, N.; QUEVEDO, J.; BENFATO, M.S.; MOREIRA, J.C.; WALZ, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, 291(3): 179-182, 2000.

DAWSON, T.M.; BREDT, D.S.; FOTUHI, M.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 88: 7797-7801, 1991.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; BARTLEY, D.A.; UHL, G.R. SNYDER, S.H. Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. **Journal of Neuroscience**, 13: 2651-2661, 1993.

DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Gases as biologic messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **The Journal of Neuroscience**, 14(9): 5147-5159, 1994.

DAWSON, A.L.; DAWSON, T.M. Nitric oxide neurotoxicity. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 10: 179-190, 1996.

DEDIO, J.; KOENIG, P.; WOHLFAHRT, P.; SCHROEDER, C.; KUMMER, W.; MÜLLER-ESTERL, W. NOSIP: a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. **The FASEB Journal**, 15: 79-89, 2001.

DEL-BEL, E.A.; OLIVEIRA, P.R.; OLIVEIRA, J.A.; MISHRA, P.K.; JOBE, P.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Anticonvulsant and proconvulsant roles of nitric oxide in experimental epilepsy models. **Brazilian journal of medical and biological research**, 30(8): 971-979, 1997.

DINERMAN, J.L.; DAWSON, T.M.; SCHELL, M.J.; SNOWMAN, A.; SNYDER, S.H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91: 4214-4218, 1994.

DING, Y.; LI, J.; LUAN, X.; DING, Y.H.; LAI, Q.; RAFOLS, J.A.; PHILLIS, J.W.; CLARK, J.C.; DIAZ, F.G. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. **Neuroscience**, 124(3): 583-591, 2004.

DISHMAN, R.K.; BERTHOUD, H.; BOOTH, F.W.; COTMAN, C.W.; EDGERTON, R.; FLESHNER, M.R.; GANDEVIA, S.C.; GOMES-PINILLA, F.; GREENWOOD, B.N.; HILLMAN, C.H.; KRAMER, A.F.; LEVIN, B.E.; MORAN, T.H.; RUSSO-NEUSTADT, A.A.; SALAMONE, J.D.; VAN HOOMISSEN, J.D.; WADE, C.E.; YORK, D.A.; ZIGMOND, M.J. Neurobiology of exercise. **Obesity**, 14(3): 345-356, 2006.

DODRILL, C.B.; WILENSKY, A.J. Intellectual impairment as an outcome of status epilepticus. **Neurology**, 40(5 Suppl 2): 23-27, 1990.

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.

DREYER, J.; SCHLEICHER, M.; TAPPE, A.; SCHILLING, K.; KUNER, T.; KUSUMAWIDIJAJA, G.; MÜLLER-ÉSTERL, W.; OESS, S.; KUNER, R. Nitric oxide synthase (NOS)- interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. **The Journal of Neuroscience**, 24(46): 10454-10465, 2004.

DUNCAN, A.J.; HEALES, S.J.R. Nitric oxide and neurological disorders. **Molecular Aspects of Medicine**, 26: 67-96, 2005.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO. M.G. Revisão sobre óxido nítrico, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39(4): 343-350, 2003.

DZOLJIC, E.; DE VRIES, R.; DZOLJIC, M.R. Anticonvulsant activity of new and potent inhibitors of nitric oxide synthase. **Brain Research Bulletin**, 43(2): 191-195, 1997.

EBADI, M.; SHARMA, S.K. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Antioxidants & redox signaling**, 5: 319-335, 2003.

ELFERING, S.L.; SARKELA, T.M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. **The Journal of Biology Chemistry**, 277(41): 38079-38086, 2002.

ENDO, T.; IMAIZUMI, T.; TAGAWA, T.; SHIRAMOTO, M.; ANDO, S.; TAKESHITA, A. Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm. **Circulation**, 90: 2886-2890, 1994.

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 Research**, 26: 141-150, 1996.

ESPLUGUES, J. NO as a signaling molecule in the nervous system. **British Journal of Pharmacology**, 135: 1079-1095, 2002.

FARBER J.L.; KYLE M.; COLEMAN J.B. Biology of disease – Mecanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigation**, 62: 670-679, 1990.

FARMER, J.; ZHAO, X.; VAN PRAAG, H.; WODTKE, K.; GAGE, F.H.; CHRISTIE, B.R. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male sprague-dawley rats *in vivo*. **Neuroscience**, 124(1): 71-79, 2004.

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.

FEDELE, E.; MARCHI, M.; RAITERI, M. In vivo NO/cGMP signalling in the hippocampus. **Neurochemical Research**, 26(8/9): 1069-1078, 2001.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **The FASEB Journal**, 12: 773-790, 1998.

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SPUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in wistar rats. **The FASEB Journal**, 272: 1307-1312, 2005.

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.

GALEA, E.; FEINSTEIN, D.L.; REIS, D.J. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 89: 10945-10949, 1992.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS, W.R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, 336: 385-388, 1988.

GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology**, 172(4-5): 413-6, 1989.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, 14(2): 60-67, 1991.

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.

GOBBO, O.L.; O'MARA, S.M. Exercise, but not environmental enrichment, improves learning after kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in association with an increase in brain-derived neurotrophic factor. **Behavioural Brain Research**, 159: 21-26, 2005.

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 associated with exercise. **Neuroscience**, 85(1): 53-61, 1998.

GONZALEZ-ZULUETA, M.; ENSZ, L.M.; MUKHINA, G.; LEBOVITZ, R.M.; ZWACKA, R.M.; ENGELHARDT, J.F.; OBERLEY, L.W.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated toxicity. **Journal of Neuroscience**, 18: 2040-2055, 1998.

GOTTI, S.; SICA, M.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; PANZICA, G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. **Microscopy Research and Technique**, 68: 13-35, 2005.

GOVERS, R.; OESS, S. To NO or not to NO: 'where?' is the question. **Histology and Histopathology**, 19: 585-605, 2004.

GREENWOOD, M.T.; GUO, Y.; KUMAR, U.; BEAUSÉJOURS, S.; HUSSAIN, S.N.A. Distribution of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 238: 617-621, 1997.

GRIESBACH, G.S.; HOVDA, D.A.; MOLTENI, R.; WU, A.; GOMEZ-PINILLA, F. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. **Neuroscience**, 125(1): 129-139, 2004.

GRIFFITH, O.W.; STUEHR, D.J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annual review of physiology**, 57, 707-736, 1995.

GRISCAVAGE, J.M.; FUKUTO, J.M.; KOMORI, Y.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. **The Journal of Biological Chemistry**, 269(34): 21644-21649, 1994.

GROVES, J.T.; WANG, C.C-Y. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, 4: 687-695, 2000.

GUEDES, F.A.; GALVIS-ALONSO, O.Y.; LEITE, J.P. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humanos e em modelos animais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, 12(1): 10-17, 2006.

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**, 3^a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 2000, pp. 1-10.

GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, 76(2): 126-152, 2005.

HAMANI, C.; TENÓRIO, F.; MENDEZ-OTERO, R.; MELLO, L.E.A.M. Loss of NADPH diaphorase-positive neurons in the hippocampal formation of chronic pilocarpine-epileptic rats. **Hippocampus**, 9: 303-313, 1999.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94: 13311-13316, 1997.

HAN, T.H.; HYDUKE, D.R.; VAUGHN, M.W.; FUKUTO, J.M.; LIAO, J.C. Nitric oxide reaction with red blood cells and hemoglobin under heterogeneous conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99(11): 7763-7768, 2002.

HAYASHI, Y.; NISHIO, M.; NAITO, Y.; YOKOKURA, H.; NIMURA, Y.; HIDAKA, H.; WATANABE, Y. Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. **The Journal of Biology Chemistry**, 274: 20597-20602, 1999.

HOLSCHER, C.; McGLINCHEY, L.; ANWYL, R.; ROWAN, M.J. 7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. **Learning and memory**, 2(6): 267-278, 1996.

HOWARD, G.M.; RADLOFF, M.; SEVIER, T.L. Epilepsy and sports participation. **Current sports medicine reports**, 3(1): 15-19, 2004.

HUANG, P.L. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, 32: 1353-1359, 1999.

HUH, Y.; NEO, K.; PARK, C.; AHN, H. Transient induction of neuronal nitric oxide synthase in neurons of rat cerebral cortex after status epilepticus. **Neuroscience Letters**, 281: 49-52, 2000.

IADECOLA, C.; ZHANG, F.; XU, S.; CASEY, R.; ROSS, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, 15: 378-384, 1995.

IMLAY, J.A.; LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, 240: 1302-1309, 1988.

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. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, 12, 110-119, 1992.

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

JAFFREY, S.R.; SNYDER, S.H. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. **Science**, 274: 774-777, 1996.

JAFFREY, S.R.; SNOWMAN, A.M.; ELIASSON, M.J.L.; COHEN, N.A.; SNYDER, S.H. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. **Neuron**, 20: 115-124, 1998.

JAFFREY, S.R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; FERRIS, C.D.; TEMPST, P.; SNYDER, S.H. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. **Nature Cell Biology**, 3: 193-197, 2001.

KALINICHENKO, S.G.; DUDINA, Y.V.; DYUIZEN, I.V.; MOTAVKIN, P.A. Induction of NO Synthase and glial acidic fibrillary protein in astrocytes in the temporal cortex of the rat with audiogenic epileptiform reactions. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, 35 (6): 629-634, 2005.

KAPLAN, D.R.; MILLER, F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, 10: 381-391, 2000.

KATO, N.; SATO, S.; YOKOYAMA, H.; KAYAMA, T.; YOSHIMURA, T. Sequential changes of nitric oxide levels in the temporal lobes of kainic-acid treated mice following application of nitric oxide synthase inhibitors and phenobarbital. **Epilepsy Research**, 65(1-2): 81-91, 2005.

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

KHALDI, A.; CHIUEH, C.C.; BULLOCK, M.R.; WOODWARD, J.J. The significance of nitric oxide production in the brain injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 962: 53-59, 2002.

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

KIRKBY, R.D.; CARROLL, D.M.; GROSSMAN, A.B.; SUBRAMANIAM, S. Factors determining proconvulsant and anticonvulsant effects of inhibitors of nitric oxide synthase in rodents. **Epilepsy Research**, 24: 91-100, 1996.

KLAPAN, D.R.; MILLER, F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, 10: 381-391, 2000.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 86: 5159-5162, 1989.

KOMEIMA, K.; HAYASHI, Y.; NAITO, Y.; WATANABE, Y. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II through Ser847 phosphorylation in NG108-NG115 neuronal cells. **The Journal of Biology Chemistry**, 275: 28139-28143, 2000.

KORNAU, H.C.; SCHENKER, L.T.; KENNEDY, M.B.; SEEBURG, P.H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. **Science**, 269: 1737-1740, 1995.

KOTSONIS, P.; FREY, A.; FRÖHLICH, L.G.; HOFMANN, H.; REIF, A.; WINK, D.A.; FEELISCH, M.; SCHMIDT, H.H.H.W. Autoinhibition of neuronal nitric oxide synthase: distinct effects of reactive nitrogen and oxygen species on enzyme activity. **Biochemical Journal**, 340: 745-752, 1999.

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.

KUGLER, P.; DRENCKHAHN, D. Astrocytes and bergmann glia as an important site of nitric oxide synthase I. **Glia**, 16: 165-173, 1996.

KUZKAYA, N.; WEISSMANN, N.; HARRISON, D.G.; DIKALOV, S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. **The Journal of biological chemistry**, 278: 22546-22554, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227 (259): 680-685, 1970.

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

LEDO, A.; FRADE, J.; BARBOSA, R.M.; LARANJINHA, J. Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. **Molecular Aspects of Medicine**, 25: 75-89, 2004.

LEE, S.C.; DICKSON, D.W.; LIU, W.; BROSNAN, C.F. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. **Journal of Neuroimmunology**, 46: 19-24, 1993.

LEITE, J.P.; CHIMELLI, L.; TERRA-BUSTAMANTE, V.C.; COSTA, E.T.; ASSIRATI, J.A.; DE NUCCI, G.; MARTINS, A.R. Loss and sprouting of nitric oxide synthase neurons in the human epileptic hippocampus. **Epilepsia**, 43(5): 235-242, 2002.

LESSMANN, V.; GOTTMANN, K.; MALCANGIO, M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. **Progress in neurobiology**, 69(5): 341-374, 2003.

LI, J.; LUAN, X.; CLARK, J.C.; RAFOLS, J.A.; DING, Y. Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise pre-conditioning in rats. **Neurological Research**, 26: 404-408, 2004.

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

LIPTON, S.A.; CHOI, Y.B.; PAN, Z.H.; LEI, S.Z.; CHEN, H.S.; SUCHER, N.J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D.J.; STAMLER, J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, 364: 626-632, 1993.

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. **Journal of Neurophysiology**, 74: 841-848, 1995.

LU, B.; CHOW, A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. **Journal of neuroscience research**, 58: 76-87, 1999.

LUO, D.; VINCENT, S.R. NMDA-dependent nitric oxide release in the hippocampus in vivo: interactions with noradrenaline. **Neuropharmacology**, 33(11): 1345-1350, 1994.

MAGGIO, R.; FUMAGALLI, F.; DONATI, E.; BARBIER, P.; RACAGNI, G.; CORSINI, G.U.; RIVA, M. Inhibition of nitric oxide synthase dramatically potentiates seizures induced by kainic acid and pilocarpine in rats. **Brain Research**, 679(1): 184-187, 1995.

MANZONI, O.; PREZEAU, L.; MARIN, P.; DESHAGER, S.; BOCKAERT, J.; FAGNI, L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. **Neuron**, 8: 653-662, 1992.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, 78(6): 927-30, 1994.

MARSDEN, P.A.; HENG, H.H.; SCHERER, S.W.; STEWART, R.J.; HALL, A.V.; SHI, X.M.; TSUI, L.C.; SCAPPERT, K.T. Structure and chromosomal of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. **The Journal of Biology Chemistry**, 268: 17478-17488, 1993.

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

MÁTYAS, 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.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in biochemical sciences**, 22(12): 477-481, 1997.

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

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

MELDRUM, B.S.; BRIERLEY, J.B. Prolonged epileptic seizures in primates. Ischemic cell change and its relation to ictal physiological events. **Archives of neurology**, 28(1): 10-17, 1973.

MELDRUM, B. Physiological changes during prolonged seizures and epileptic brain damage. **Neuropadiatrie**, 9(3): 203-212, 1978.

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 Research**, (Suppl) 9: 51-59, 1992.

MIZUNO, M.; YAMADA, K.; OLARIU, A.; NAWA, H.; NABESHIMA, T. Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. **The Journal of Neuroscience**, 20(18): 7116-7121, 2000.

MIZUNO, M.; YAMADA, K.; TAKEI, N.; TRAN, M.H.; HE, J.; NAKAJIMA, A.; NAWA, H.; NABESHIMA, T. Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. **Molecular Psychiatry**, 8(2): 217-224, 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological reviews**, 43(2): 109-142, 1991.

MOLTENI, R.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **European Journal of Neuroscience**, 16: 1107-1116, 2002.

MONTI, J.M.; JANTOS, H. Effects of L-arginine and SIN-1 on sleep and waking in the rat during both phases of the light-dark cycle. **Life Science**, 75: 2027-2034, 2004.

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.

MUNGRUE, I.N.; BREDT, D.S.; STEWART, D.J.; HUSAIN, M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? **Acta physiologica Scandinavica**, 179: 123-135, 2003.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Alterações Neuroquímicas Associadas às Epilepsias do Lobo Temporal. In: COSTA, J.C.; PALMINI, A.; YACUBIAN, E.M.T.; CAVALHEIRO, E.A. **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias- Aspectos Clínicos e Cirúrgicos**, 1^a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 1998, pp. 43-59.

NAKAYA, N.; LOWE, S.W.; TAYA, Y.; CHENCHIK, A.; ENIKOLOPOV, G. Specific pattern of p53 phosphorylation during nitric oxide-induced cell cycle arrest. **Oncogene**, 19 (54): 6369-6375, 2000.

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 Research**, 726: 49-56, 1996.

NOYAN, B.; GÜLEÇ, G. Effects of L-arginine on prevention and treatment of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. **Physiological Research**, 49: 379-385, 2000.

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**. 1^a Ed., Editora Pléiade, São Paulo, 1999, pp. 93-104.

PALMER, R.M.J.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochemical and biophysical research communications**, 153: 1251-1256, 1988.

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. **Journal of Neuroscience**, 17(10): 3727-3738, 1997.

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

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

PEIXOTO, F.J.G. Adaptações bioquímicas em fibras musculares esqueléticas de eqüinos treinados para enduro: correlação entre tipagem muscular e expressão da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase. Campinas, 2004, 114 p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

PENIX, L.P. DAVIS, W.; SUBRAMANIAM, S. Inhibition of NO synthase increases the severity of kainic acid-induced seizures in rodents. **Epilepsy Research**, 18(3): 177-184, 1994.

PRABHAKAR, N.R.; PIERAMICI, S.F.; PREMKUMAR, D.R.; KUMAR, G.K.; KALARIA, R.N. Activation of nitric oxide synthase gene expression by hypoxia in central and peripheral neurons. **Molecular Brain Research**, 43(1-2): 341-346, 1996.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, 64: 51-68, 2001.

PRENDERGAST, M.A.; BUCCAFUSCO, J.J.; TERRY, A.V. Nitric oxide synthase inhibition impairs spatial navigation learning and induces conditioned taste aversion. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, 57(1-2): 347-352, 1997.

PRZEGALIŃSKI, E.; BARAN, L.; SIWANOWICZ, J. The role of nitric oxide in chemically- and electrically-induced seizures in mice. **Neuroscience Letters**, 217: 145-148, 1996.

QIANG, M.; CHEN, Y.C.; WANG, R.; WU, F.M.; QIAO, J.T. Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: studies using passive avoidance response and Morris water maze task. **Behavioural pharmacology**, 8(2-3): 183-187, 1997.

RADÁK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H.; PUCSOK, J.; SASVÁRI, M.; NYAKAS, C.; GOTO, S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochemistry International**, 38: 17-23, 2001.

RAJASEKARAN, K. Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: blockade by nNOS inhibition. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 80: 263-272, 2005.

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

RICE, A.C.; FLOYD, C.L.; LYETH, B.G.; HAMM, R.J.; DELORENZO, R.J. Status Epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioral changes and cognitive deficits. **Epilepsia**, 39(11): 1148-1157, 1998.

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.

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.

SALINSKA, E.; DANYSZ, W.; LAZAREWICZ, J.W. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. **Folia Neuropathologica**, 43(4): 322-339, 2005.

SAMDANI, A.F.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. **Stroke**, 28(6): 1283-1288, 1997.

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**, 3^a Ed., Lemos Editorial, São Paulo, 2000, pp. 29-57.

SANKAR, R.; SHIN, D.H.; LIU, H.; MAZARATI, A.; DE VASCONCELOS, A.P.; WASTERLAIN, C.G. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. **Journal of Neuroscience**, 18(20): 8382-8393, 1998.

SANKAR, R.; SHIN, D.; MAZARATI, A.M.; LIU, H.; KATSUMORI, H.; LEZAMA, R.; WASTERLAIN, C.G. Epileptogenesis after status epilepticus reflects age- and model-dependent plasticity. **Annals of Neurology**, 48(4): 580-589, 2000.

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

SARTORI, C.R. Atividade física e neuroproteção em camundongos adultos após indução do *Status Epilepticus* por pilocarpina. Campinas, 2005, 76 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

SASA, K.M.T. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Trends Cardiovascular Medicine**, 7: 28-37, 1997.

SATTLER, R.; XIONG, Z.; LU, W.; HAFNER, M.; MACDONALD, J.F.; TYMIANSKI, M. Specific coupling of NMDA receptor activation of nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. **Science**, 284: 1845-1848, 1999.

SCHMIDT, H.H.W.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; FOÈRSTERMANN, U.; MURAD, F. Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. **Cell Calcium**, 13: 427-434., 1992.

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

SHARMA, H.S.; WESTMAN, J.; OLSSON, Y.; ALM, P. Involvement of nitric oxide in acute spinal cord injury, an immunocytochemical study using light and electron microscopy in the rat. **Neuroscience Research**, 24(4): 373–384, 1996.

SHENG, H.; SCHMIDT, H.H.; NAKANE, M.; MITCHELL, J.A.; POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F.; SCHMIDT, H.H.W. Characterization and localization of nitric oxide synthase in non-adrenergic non-cholinergic nerves from bovine retractor penis muscles, **British Journal of Pharmacology**, 106: 768-773, 1992.

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.

SOMANI, S.M.; RAVI, R.; RYBAK, L.P. Effects of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 50(4): 635-639, 1995.

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

STAMLER, J.S.; TOONE, E.J.; LIPTON, S.A.; SUCHER, N.J. NO signals: Translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron**, 18: 691–696, 1997.

STAMLER, J.S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiological Reviews**, 81(1): 209-237, 2001.

STARR, M.S.; STARR, B.S. Paradoxal facilitation of pilocarpine-induced seizures in the mouse by MK-801 and the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 45: 321-325, 1993.

STUEHR, D.J.; KWON, N.S.; NATHAN, C.F.; GRIFFITH, O.W.; FELDMAN, P.L.; WISEMAN, J. N^ω-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **The Journal of Biology Chemistry**, 266(10): 6259-6263, 1991.

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

TAMIR, S.; LEWIS, R.S.; DE ROJAS WALKER, T.; DEEN, W.M.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. The influence of delivery rate on the chemistry and biological effects of nitric oxide. **Chemical Research in Toxicology**, 6: 895–899, 1993.

TAMIR, S.; BURNEY, S.; TANNENBAUM, S.R. DNA damage by nitric oxide. **Chemical Research in Toxicology**, 9: 821–827, 1996.

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

TEIXEIRA, S.A. Participação do óxido nítrico no desenvolvimento da encefalomielite alérgica experimental em ratos. Campinas, 2001, 90 p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular, área de Bioquímica). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

TOMITA, S.; NICOLL, R.A.; BREDT, D.S. PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. **The Journal of cell Biology**, 153(5): F19-F23, 2001.

TONG, L.; SHEN, H.; PERREAU, V.M.; BALAZS, R.; COTMAN, C.W. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. **Neurobiology of Disease**, 8: 1046-1056, 2001.

TOYODA, M.; SAITO, H.; MATSUKI, N. Nitric oxide but not carbon monoxide is involved in spatial learning of mice. **Japanese journal of pharmacology**, 71(3): 205-211, 1996.

TRABACE, L.; CASSANO, T.; TUCCI, P.; STEARDO, L.; KENDRICK, K.M.; CUOMO, V. The effects of nitric oxide on striatal serotonergic transmission involve multiple targets: an in vivo microdialysis study in the awake rat. **Brain Research**, 1008: 293-298, 2004.

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. **Journal of Neuroscience**, 21(5): 1628-1634, 2001.

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. **Behavior in Brain Research**, 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 morphological analysis. **Brain Research**, 321: 237-253, 1984.

VAN ESCH, A.; RAMLAL, I.R.; VAN STEENSEL-MOLL, H.A.; STEYERBERG, E.W.; DERKSEN-LUBSEN, G. Outcome after febrile status epilepticus. **Developmental medicine and child neurology**, 38(1): 19-24, 1996.

VAN LEEUWEN, R.; DE VRIES, R.; DZOLJIC, M.R. 7-Nitro-Indalazone, an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, attenuates pilocarpine-induced seizures. **European Journal of Pharmacology**, 287: 211-213, 1995.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, R.B.; SEJNOWSKI, T.J.; GAGE, F.H. Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 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. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **European Journal of Neuroscience**, 20: 2580-2590, 2004.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, 19(4): 283-295, 2005.

WEITZDOERFER, R.; HOEGER, H.; ENGIDAWORK, E.; ENGELMANN, M.; SINGEWALD, N.; LUBES, G.; LUBEC, B. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. **Nitric oxide**, 10(3): 130-140, 2004.

WINKLER, T.; SHARMA, H.S.; STALBERG, E.; BADGAIYAN, R.D.; ALM, P.; WESTMAN, J. Spinal cord evoked potentials and edema in the pathophysiology of rat spinal cord injury. Involvement of nitric oxide. **Amino Acids**, 14 (1-3), 131-139, 1998.

WOJTAL, K.; GNIATKOWSKA-NOWAKOWSKA, A.; CZUCZWAR, S.J. Is nitric oxide involved in the anticonvulsant action of antiepileptic drugs? **Polish Journal of Pharmacology**, 55: 535-542, 2003.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Signaling in Memory Processes. **Journal of Pharmacological Sciences**, 91(4): 267-270, 2003.

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

ZHANG, Z.G.; CHOPP, M.; GAUTAM, S.; ZAGOLA, C.; ZHANG, R.L.; SCHMIDT, H.H.; POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. **Brain Research**, 654(1): 85-95, 1994.

ZOU, M.H.; HOU, X.Y.; SHI, C.M.; NAGATA, D.; WALSH, K., COHEN, R.A. Modulation by peroxy nitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. **The Journal of biological chemistry**, 277: 32552-32557, 2002.

Anexos

Tabela 5. Volume de atividade física médio diário em quilômetros ao longo do período de 28 dias.

ANIMAL	KM/DIA													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 CtC	5,28	3,74	3,53	3,76	5,22	5,68	2,86	0,01	0,00	4,83	6,34	6,61	6,21	
2 CtC	2,42	4,88	5,77	5,94	8,51	7,20	4,50	6,65	7,50	9,02	8,38	10,14	10,16	9,89
3 CtC	4,96	4,61	5,91	6,78	5,09	5,32	5,52	6,45	5,57	7,00	5,77	6,05	6,51	6,65
4 CtC	4,48	2,70	3,44	4,55	5,66	5,22	6,95	5,91	6,17	5,66	6,11	5,65	5,11	6,04
5 CtC	1,67	2,31	3,24	3,29	3,22	3,14	3,38	5,63	4,72	5,29	5,88	5,80	5,20	5,06
6 CtC	1,90	0,82	0,68	1,42	1,03	1,63	2,31	2,19	2,92	2,73	4,36	2,57	3,91	3,97
7 CtC	6,87	3,27	2,14	3,91	1,49	3,37	4,18	5,94	5,42	4,71	5,02	5,31	5,10	5,44
8 CtC	4,38	1,51	3,79	4,25	1,86	4,30	6,46	7,61	6,71	5,85	6,19	5,87	6,93	5,80
1 PC	0,00	0,04	0,08	0,08	0,28	1,58	3,87	2,09	2,33	1,20	1,20	1,20	1,21	0,86
2 PC	0,00	0,00	0,00	0,00	1,65	6,55	3,22	3,67	2,24	1,13	1,49	0,89	0,08	3,01
3 PC	0,00	0,08	0,12	1,02	1,02	0,21	0,03	0,59	3,55	2,36	1,58	1,01	0,28	3,73
4 PC	0,00	0,00	0,93	2,73	4,87	4,65	4,96	4,95	3,69	3,21	3,43	1,63	2,39	1,77
5 PC	0,00	1,57	1,66	4,35	3,24	0,02	0,36	1,70	1,78	1,30	2,06	1,66	1,66	2,04
6 PC	0,00	0,04	0,05	4,53	3,93	0,44	3,82	2,84	2,69	1,33	2,58	1,30	1,47	1,22
7 PC	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	0,19	0,09	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
8 PC	0,00	0,09	0,92	4,36	1,90	0,38	1,85	1,41	1,95	2,43	2,33	1,60	1,59	1,80

ANIMAL	KM/DIA													
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1 CtC	4,17	5,13	5,84	5,90	5,49	6,51	6,86	7,39	6,93	6,03	6,23	8,18	7,68	8,61
2 CtC	8,10	9,45	8,76	9,53	8,62	9,42	9,23	9,47	8,59	8,05	9,03	5,37	0,00	0,00
3 CtC	7,13	6,89	7,62	7,61	7,75	8,09	7,03	7,40	7,60	7,62	7,84	8,64	9,45	8,09
4 CtC	6,18	5,69	6,06	7,45	6,13	5,78	5,66	6,31	6,49	6,58	7,30	6,10	7,18	7,56
5 CtC	5,66	4,98	4,88	4,69	6,09	6,04	6,19	6,04	6,49	6,94	6,43	7,35	6,14	4,99
6 CtC	4,46	4,97	5,17	5,20	5,09	5,53	5,28	5,13	5,41	3,72	5,37	6,84	4,85	5,05
7 CtC	5,54	4,60	5,33	5,35	4,80	4,84	4,47	4,97	6,25	4,92	5,25	6,05	6,79	5,34
8 CtC	6,04	6,80	8,00	8,07	7,52	7,50	8,76	9,37	6,62	6,59	5,90	6,79	6,70	6,04
1 PC	0,93	0,44	0,03	0,55	0,33	0,40	0,15	0,56	0,41	0,27	0,07	0,01	0,03	0,07
2 PC	3,07	2,75	2,93	2,28	2,78	0,89	2,66	1,12	1,57	2,50	2,16	1,94	2,82	2,21
3 PC	5,11	4,67	4,39	3,58	0,04	0,28	2,86	3,00	1,76	0,36	1,33	1,84	1,50	0,91
4 PC	3,91	3,06	2,07	1,23	1,40	1,18	1,49	1,67	1,96	2,25	0,05	1,46	2,90	1,51
5 PC	2,65	1,29	1,82	1,81	1,02	2,66	0,00	1,06	2,61	5,40	0,90	1,13	2,31	3,57
6 PC	2,81	2,23	3,36	2,05	2,36	2,26	1,58	1,45	1,39	0,96	0,27	1,37	1,22	1,66
7 PC	0,00	0,01	0,05	1,54	2,39	2,40	2,08	2,85	1,35	1,43	1,74	1,37	0,46	0,56
8 PC	1,16	0,64	1,07	1,02	0,89	0,98	1,15	0,72	2,21	1,97	0,47	0,90	1,47	0,89

CtC - Controle corredor, PC - Pilocarpina corredor

Tabela 6. Valores médios da latência para encontrar a plataforma em cada sessão do teste do labirinto aquático.

ANIMAL	LATÊNCIA (Seg)			
	Sessão 1	Sessão 2	Sessão 3	Sessão 4
CtS	66	70,5	33,5	24,75
CtS	70,5	43	23,25	12,25
CtS	76,25	39,5	48,25	34,5
CtS	61,25	65,5	59,75	61,5
CtS	86	34,25	21,75	26
CtS	120	120	120	120
CtS	67	90,25	104	120
CtS	120	101,5	66	35,25
CtS	63	37,75	42,5	7,75
CtS	67	58,75	93,5	104
CtS	99,75	64,25	94,75	65,25
PS	96	120	120	120
PS	120	120	120	120
PS	84,75	120	120	120
PS	114,25	120	120	120
PS	120	120	99	92,75
PS	120	120	97,5	91,75
PS	120	120	120	120
PS	120	120	69,5	74,75
PS	120	120	120	120
PS	120	120	120	120
PS	120	120	120	120
CtC	44,75	27,75	42	28,25
CtC	120	116,25	88,25	103
CtC	120	91	100,5	65,75
CtC	120	95	120	120
CtC	116,75	120	120	120
CtC	100,75	48,5	13,75	16,5
CtC	100,25	74,25	57	9
CtC	94,75	77,5	74	51
CtC	120	7,25	29,75	18,25
CtC	48,25	75,5	21,25	24,25
CtC	48	43,5	17	7,75
PC	115,75	76,5	103,25	29
PC	75,5	41,75	38,5	33,5
PC	120	119,25	51,5	45
PC	120	120	101,5	75,75
PC	94,75	78	48,5	97,5
PC	120	96	75,75	114,5
PC	78	91,5	120	120
PC	76,25	71,75	22	81
PC	105,25	35,25	92,5	39,25
PC	105,75	120	66,5	66,25
PC	120	95,75	120	120

Tabela 7. Número de entradas no contador crítico durante um minuto no *probe test*.

ANIMAL	Número de entradas	ANIMAL	Número de entradas
CtS	8	CtC	8
CtS	1	CtC	3
CtS	5	CtC	4
CtS	0	CtC	0
CtS	0	CtC	0
CtS	2	CtC	7
CtS	10	CtC	8
CtS	0	CtC	5
CtS	1	CtC	8
CtS	4	CtC	9
CtS	2	CtC	7
PS	1	PC	2
PS	2	PC	9
PS	0	PC	1
PS	2	PC	0
PS	3	PC	3
PS	3	PC	7
PS	0	PC	4
PS	1	PC	0
PS	10	PC	6
PS	0	PC	3
PS	1	PC	6

CtS—controle sedentário, PS—pilocarpina sedentário, CtC—controle sedentário, PC—pilocarpina sedentário.

Tabela 8. Valores dos escores atribuídos à lesão histológica, evidenciada pela coloração com violeta de cresila, nas regiões da formação hipocampal avaliadas.

ANIMAL	LESÃO (escore)			
	CA1	CA3	HILO	CG
PS	1	2	3	0
PS	0	2	3	0
PS	1	2	2	2
PS	0	2	2	0
PS	3	2	3,5	0
PC	0	0	2	0
PC	2	4	2	2
PC	0	0	1	0
PC	1,5	1,5	2	2
PC	4	2	3	1

PS – pilocarpina sedentário, PC – pilocarpina corredor, CG – camada granular.

Tabela 9. Valores referentes à atividade da NOS dependente de Ca^{2+} evidenciadas na região do hipocampo.

<i>Animais</i>	<i>Atividade NOS dependente de Ca^{2+}</i>	<i>Animais</i>	<i>Atividade NOS dependente de Ca^{2+}</i>
Ct1d	15,73	P1d	7,65
Ct1d	16,01	P1d	7,68
Ct1d	21,51	P1d	7,78
Ct1d	15,39	P1d	11,23
Ct7d	12,02	P7d	3,10
Ct7d	15,31	P7d	1,06
Ct7d	9,93	P7d	1,88
Ct7d	13,28	P7d	1,81
Ct21d	13,17	P21d	3,54
Ct21d	16,54	P21d	3,95
Ct21d	17,74	P21d	1,83
Ct21d	12,30	P21d	3,39
CtS	14,83	PS	4,01
CtS	16,11	PS	6,33
CtS	21,32	PS	5,24
CtS	17,43	PS	5,90
CtC	15,58	PC	4,65
CtC	15,45	PC	5,89
CtC	15,09	PC	5,88
CtC	14,73	PC	4,27

Ct – controle; P – pilocarpina; S – sedentário; C – corredor; d – dias após SE

Tabela 10. Valores referentes à atividade da NOS independente de Ca^{2+} detectadas pela técnica da [3H]-L-Arginina na região do hipocampo.

<i>Animais</i>	<i>Atividade NOS independente de Ca^{2+}</i>	<i>Animais</i>	<i>Atividade NOS independente de Ca^{2+}</i>
Ct1d	5,20	P1d	5,82
Ct1d	4,44	P1d	4,67
Ct1d	5,20	P1d	4,08
Ct1d	3,70	P1d	4,35
Ct7d	3,49	P7d	2,89
Ct7d	1,95	P7d	3,24
Ct7d	2,82	P7d	3,43
Ct7d	4,26	P7d	3,05
Ct21d	2,55	P21d	5,26
Ct21d	2,18	P21d	4,47
Ct21d	3,02	P21d	4,64
Ct21d	2,29	P21d	6,58
CtS	5,04	PS	4,46
CtS	2,52	PS	4,81
CtS	3,19	PS	3,35
CtS	3,09	PS	3,85
CtC	1,64	PC	4,46
CtC	4,23	PC	3,44
CtC	3,76	PC	4,92
CtC	3,42	PC	3,71

Ct – controle; P – pilocarpina; S – sedentário; C – corredor; d – dias após SE

Tabela 11. Valores referentes à intensidade relativa das bandas de nNOS detectadas por western blot e quantificadas por densitometria na região do hipocampo.

Animais	Intensidades relativas das bandas de nNOS (%)	Animais	Intensidades relativas das bandas de nNOS (%)
P1d	84,0	PS	121,5
P1d	66,4	PS	121,9
P1d	70,3	PS	71,8
P1d	80,1	PS	77,3
P1d	67,3	PS	83,6
P7d	46,5	PC	72,1
P7d	34,8	PC	70,5
P7d	75,8	PC	124,9
P7d	35,5	PC	26,7
P7d	60,1	PC	34,3
P21d	63,8	CtC	88,6
P21d	75,4	CtC	137,1
P21d	82,8	CtC	84,8
P21d	82,8	CtC	95,0
P21d	67,1	CtC	106,1

Ct – controle; P – pilocarpina; S – sedentário; C – corredor; d – dias após SE

Obs: As intensidades relativas das bandas foram quantificadas por densitometria considerando-se o controle como 100%. Para as análises nos grupos PS, PC e CtC o grupo CtS foi considerado como 100%, enquanto que para as análises nos grupos P1d, P7d e P21d adotou-se as médias dos grupos Ct1d, Ct7d e Ct21d como controle 100%.