**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

JINGER DO CARMO CUNHA

**ESTUDO DA IMUNORREATIVIDADE DAS PROTEÍNAS
LIGANTES DE CÁLCIO NA NEUROQUÍMICA DA
MEDULA ESPINAL DE RATOS SUBMETIDOS À
ATIVIDADE FÍSICA ESPONTÂNEA NA RODA DE
CORRIDA.**

São Paulo

2008

JINGER DO CARMO CUNHA

**ESTUDO DA IMUNORREATIVIDADE DAS PROTEÍNAS
LIGANTES DE CÁLCIO NA NEUROQUÍMICA DA
MEDULA ESPINAL DE RATOS SUBMETIDOS À
ATIVIDADE FÍSICA ESPONTÂNEA NA RODA DE
CORRIDA.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Psicologia.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento
Orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

São Paulo

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Cunha, Jinger do Carmo.

Estudo da imunorreatividade das proteínas ligantes de cálcio na neuroquímica da medula espinal de ratos submetidos à atividade física voluntária na roda de corrida / Jinger do Carmo Cunha; orientador Gerson Chadi. -- São Paulo, 2008.

61 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Neuroquímica 2. Atividade física 3. Plasticidade neuronal 4. Calbindina 5. Parvalbuminas 6. Proteínas S100 7. Ratos I. Título.

QP356.3

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jinger do Carmo Cunha

Estudo da imunorreatividade das proteínas ligantes de cálcio na neuroquímica da medula espinal de ratos submetidos À atividade física Espontânea na roda de corrida.

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Psicologia.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovada em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“O que há de mais difícil neste mundo é o homem conhecer a si mesmo” (Thales de Mileto)

Aos meus pais:
Simão Baptista da Cunha e
Joana D'arc do Carmo (in memorian)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao professor Doutor Gerson Chadi pela oportunidade, orientação e paciência.

Aos amigos do Laboratório de Neurocirurgia Funcional da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Neuroregeneração do Sistema Nervoso Central ICBUSP, Michele Schultz Ramos de Andrade, Maura Regina, Bianca de Luca, Beatriz Levy, Camila Silva, Fausto P. Guzen, Marcos Taneda, Tatiana P. Oliveira, Juliana Pedroso, Vânia Gomide, Tatiana Duobles, Juliana Prado Costa, Jéssica Maximino, Rebeca B. Ceccato obrigado por tudo.

Aos funcionários do Laboratório de Neurocirurgia Funcional da Universidade de São Paulo, Sarah de Sousa Gomes, Florence Thereza Dinucci, Gilmar Marques da Silva.

Aos Funcionários do Instituto de Ciências Biológicas III da Universidade de São Paulo e do Departamento de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia.

A todos os amigos que me apoiaram.

A realização deste trabalho contou com os auxílios concedidos:

FAPESP (98/13122-5)

FAPESP (99/01319-1)

FAPESP (07/00491-3)

RESUMO

Cunha, J. C. **Estudo da imunorreatividade das proteínas ligantes de cálcio na neuroquímica da medula espinal de ratos submetidos À atividade física espontânea na roda de corrida, 2008.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Psicologia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As ações da atividade física na neuroquímica dos neurônios, com enfoque às proteínas ligantes de cálcio (Ca^{2+}), e o estado de ativação de células gliais da medula espinal do rato foram investigadas em preparados imuno-histoquímicos através da análise morfométrica e microdensitométrica com auxílio do computador. Ratos machos adultos foram divididos em dois grupos: treinado, cujos animais foram expostos à roda de corrida onde realizava atividade física espontânea, por um período de 4 e 14 noites; e sedentário, onde os animais foram mantidos em caixas individualizadas, sem a roda de corrida. Após os períodos determinados, os animais sofreram eutanásia e suas medulas espinais foram processadas para imunohistoquímica. Os ligantes de Ca^{2+} neuronal e glial foram avaliados pela imunorreatividade das proteínas calbindina e parvalbumina e, ainda, pela imunorreatividade da proteína S100 β astrocitária. A atividade física voluntária promoveu uma diminuição na imunorreatividade da proteína calbindina em nível torácico no corno posterior (lâminas I e II de Rexed), assim como no núcleo espinal lateral após 14 dias. No nível lombar, também se observou uma diminuição da imunorreatividade no corno posterior (lâminas I e II de Rexed). Contudo os animais submetidos à atividade física voluntária por 4 dias apresentaram um aumento na área imunorreativa da proteína parvalbumina em relação ao seu controle. Efeito semelhante ocorreu no núcleo dorsal nos grupos que treinaram por 4 e 14 dias. Entretanto, no fascículo cuneiforme ocorreu uma diminuição da imunorreatividade à parvalbumina. Já em relação à proteína S100 β , os animais treinados apresentaram um aumento na imunorreatividade (spMGV) no corno anterior. Assim, conclui-se que a atividade física voluntária modificou a imunorreatividade das proteínas ligantes de Ca^{2+} na medula espinal, o que pode estar associado aos mecanismos de ativação intracelular realizados pelo cálcio, bem como a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

Palavras chaves: Neuroquímica, Atividade física, Plasticidade neuronal, Calbindina, Parvalbumina, Proteínas S100

ABSTRACT

Actions of the physical activity in the neurochemistry focusing calcium-binding proteins and the activation of the glial cells in the spinal cord of the rat were investigated with immunohistochemistry over. Male wistar adult rats were divided in two groups: trained, which animals exercised in the wheel running for 4 and 14 nights; and sedentary, which animals were maintained in private box without wheel running. After that period rats were sacrificed and their spinal cords were processed to immunohistochemistry. Calcium-binding proteins neuronal (parvalbumin and calbindin) and glial (S100 β) were evaluated. The activity promoted a decrease in the immunoreactivity of the calbindin protein in the thoracic level of the posterior horn (lamina I and II of Rexed), and lateral spine nucle after 14 days. In the lumbar level, decrease in the posterior horn was also found. Animals submitted to physical activity for 4 days showed an increase in the immunoreactive area of parvalbumin. Similar effect was observed in all groups that were trained for 4 e 14 days. However, in the cuneiform fascicle, parvalbumin decreased. The S100 β protein showed decrease in the anterior horn. In conclusion voluntary physical activity changed the pattern of the calcium-binding protein immunoreactivity in the spinal cord, effect that can be associated to neuroplasticity.

Key Words: Neurochemistry, physical activity, neuroplasticity, calbindin, parvalbumin, Proteins S100

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12.03.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1188/07**, intitulado: **"EFEITO DA ATIVIDADE FÍSICA NA NEUROQUÍMICA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO RATO. ENFOQUE ÀS PROTEÍNAS LIGANTES DE Ca^{2+} "** apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Gerson Chadi**

Pesquisador Executante : Jinger do Carmo Cunha

CAPPesq, 17 de março de 2008.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

SUMÁRIO

<i>Índice de figuras</i>	<i>xiv</i>
<i>Índice de tabelas</i>	<i>xv</i>
<i>1. Introdução</i>	<i>01</i>
<i>1.2 Neuroplasticidade</i>	<i>02</i>
<i>1.3 Proteínas ligantes de cálcio</i>	<i>06</i>
<i>1.4 Atividade física e neuroplasticidade</i>	<i>10</i>
<i>2. Objetivos</i>	<i>14</i>
<i>3. Material e métodos</i>	<i>16</i>
<i>3.1 Regime da atividade física espontânea na roda de corrida</i>	<i>17</i>
<i>3.2 Grupos experimentais</i>	<i>19</i>
<i>3.3 Sacrifício dos animais</i>	<i>19</i>
<i>3.4 Processamento tecidual e regiões a serem estudadas</i>	<i>20</i>
<i>3.5 Imuno-histoquímica</i>	<i>20</i>
<i>3.6 Marcadores imuno-histoquímicos</i>	<i>20</i>
<i>3.7 Marcação imuno-histoquímica</i>	<i>20</i>
<i>3.8 Quantificação pela análise semiquantitativa morfológica e microdensitométrica das imunorreatividades</i>	<i>21</i>

3.9 <i>Análise estatística</i>	24
4. <i>Resultados</i>	25
4.1 <i>Análise tecidual qualitativa e quantitativa</i>	26
4.1.1 <i>Análise da imunorreatividade para visualização da proteína calbindina</i>	26
4.1.2 <i>Análise da imunorreatividade para visualização da proteína parvalbumina</i>	30
4.1.3 <i>Análise da imunorreatividade para visualização da proteína S100β</i>	36
5. <i>Discussão</i>	40
6. <i>Conclusão</i>	45
7. <i>Referências Bibliográficas</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 01</i>	18
<i>Figura 02</i>	23
<i>Figura 03</i>	28
<i>Figura 04</i>	29
<i>Figura 05</i>	33
<i>Figura 06</i>	34
<i>Figura 07</i>	35
<i>Figura 08</i>	38
<i>Figura 09</i>	39

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 01</i>	18
<i>Tabela 02</i>	23
<i>Tabela 03</i>	28

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Neuroplasticidade

O organismo dos seres vivos está em constante interação com o meio, do qual recebe uma grande variedade de estímulos processados pelo sistema nervoso (SN). Ele procura se adaptar por meio de mudanças fisiológicas e morfológicas, e a esta habilidade de modificação dá-se o nome de neuroplasticidade.

As modificações plásticas nas sinapses foram estudadas por HEBB (1949), onde descreve que as formas de memórias podem ser explicadas pelo reforço sináptico, onde uma sinapse ativada continuamente e simultaneamente ao disparo de potenciais de ação do neurônio pré-sináptico conduz à mudanças químicas ou estruturais no SN.

As mudanças dependentes de atividade são os mecanismos com que o cérebro codifica e armazena informações. São dois os modelos, bem estabelecidos, para o reforço ou a diminuição da sinapse dependente de atividade, o primeiro é à potenciação de longa duração (LTP) e o segundo é a depressão de longa duração (LTD). Onde, a liberação de neurotransmissores pela sinapse estimulada, bem como a síntese de proteínas, representa o mecanismo de alterações e de manutenção da sinapse (SCHUMAN et al., 2006).

Estudos demonstram que o tratamento de neurônios em cultura com neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento leva a ativação enzimática (MYNAMOTO et al., 2006). Portanto, um neurotransmissor pode regular a expressão de diferentes tipos de receptores, proporcionando a manutenção da homeostase da sinapse.

Esse mecanismo tem sido demonstrado com o uso de antagonistas de neurotransmissores excitatórios (SHUMAN et al., 2006).

Segundo IZQUIERDO & MAGAUCH (2000), a indução da potenciação de longa duração requer a ativação dos receptores glutamatérgicos como o amino-hidroxi-metil-propionico (AMPA), o N-metil-Daspartato (NMDA) e os metabotrópicos (mGluR), juntamente com um aumento na concentração intracelular do íons cálcio $[Ca^{2+}]_i$ que levará a ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio.

Por conseguinte, a síntese de proteínas atua na manutenção tanto da LTP como da LTD através da regulação de receptores ionotrópicos. Isso foi demonstrado em culturas de neurônios hipocampusais, onde a administração de agonistas do receptor mGluR induziu uma rápida endocitose do receptor glutamatérgico ionotrópico pós-sináptico, como receptores AMPA e NMDA, resultando na diminuição no número de receptores de superfície (SNYDER et al., 2001; XIAO et al., 2001; NOSYREVA and HUBER, 2005).

A endocitose inicial dos receptores é independente da transição, mas a diminuição permanente requer novas proteínas (SNYDER et al., 2001; NOSYREVA AND HUBER, 2005). A renovação dos receptores AMPA e NMDA pós-sinápticos pode conduzir a mudanças estruturais, como o alongamento da espinha dendrítica, que também é iniciada pela síntese protéica estimulada pelo mGluR (VANDERKLISH & EDELMAN, 2002).

Dentre todas as proteínas e íons, o cálcio (Ca^{2+}) é um mediador onipresente das mudanças metabólicas e de muitas sínteses celulares. No córtex cerebral, ele participa na sinalização química primária para a indução da plasticidade, sendo amplamente aceito

por ser a forma básica de muitas formas de memória, aprendizagem e desenvolvimento (YENG et al., 2004).

Assim, o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ nos neurônios desempenha um importante papel na regulação de várias funções, com liberação de neurotransmissores, ativação de enzimas, na expressão de genes e na plasticidade sináptica (SMITH & AUGUSTINE, 1988; BERRIDGE, 1990, 1998; BERRIDGE et al., 1998).

Segundo DOLMESCH et al. (2001), o influxo de Ca^{2+} para o citosol da célula é responsável pelo aumento da expressão do gene fos, do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e Bcl-2 que são importantes para os mecanismos de memória e de sobrevivência do neurônio, e de outras respostas adaptativas do sistema nervoso.

A atividade neuronal também pode estimular o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ nas células gliais, e desta maneira, na liberação de neurotransmissores na sinapse (ARAQUE et al., 1999; PARPUDA & HAYDON, 2000; AULD & ROBITAILLE, 2003; NEWMAN et al., 2003).

Estudos têm descrito uma regulação dinâmica de neurotransmissores e seus receptores pelas células gliais. Os astrócitos, que são células gliais, podem expressar dois tipos de canais permeáveis ao Ca^{2+} : o AMPA e receptores purinérgicos (CARMIGNOTO, 2000). Entretanto, segundo TEICHBERG (1991), não existe nenhuma evidência clara da presença dos receptores NMDA nestas células.

Para POZZAN et al. (1994), a sinalização de Ca^{2+} pelos astrócitos é mediada via receptores de proteína G, e pela ativação da fosfolipase-C que juntamente com a produção de inositol trifosfato (IP3), podem conduzir à liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático (ER). Ainda, segundo os autores o ER que é o maior depósito de Ca^{2+}

intracelular desempenha um importante papel no controle da homeostase do Ca^{2+} intracelular, pois além possuir canais específicos que liberam o Ca^{2+} para o citosol, este também possuem bombas que seqüestram este íon para seu interior.

Outra forma de causar oscilações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é a ausência de Ca^{2+} extracelular (JENSEN & CHIU, 1991) este mecanismo demonstra que astrócitos possuem um organizado sistema para a liberação do Ca^{2+} , que pode ser regulado por depósitos intracelulares como o ER.

O Ca^{2+} é capturado para o citosol ou liberado para o meio extracelular pelas bombas Ca^{2+} -ATPases da membrana celular, e como descrito anteriormente o ER também possui este mecanismo para regular a liberação de Ca^{2+} no interior da célula (FINKBEINER, 1995).

A atividade da bomba Ca^{2+} -ATPases no ER é determinada pelo aumento deste íon no seu interior, já na membrana plasmática a troca de Na^+ (potássio)/ Ca^{2+} é determinada pelos seus gradientes. O aumento nos níveis de Na^+ no citosol pode deprimir ou inverter o transporte de Ca^{2+} (CARMIGNOTO, 2000).

A presença de canais de Ca^{2+} operados por voltagem (Ca^{2+} VOCs) foi demonstrada pelo registro de correntes de Ca^{2+} tipo-L sensíveis à nifedipina (MAC VICAR e TSE, 1988; VERKHRATSKY et al., 1990). Entretanto, a expressão destes canais não constitui uma propriedade fisiológica do astrócito (CORVALAN et al., 1990).

Outros trabalhos ajudam a elucidar os mecanismos envolvidos na oscilação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no astrócito provocada pelo glutamato. Eles mostram que a ativação dos subtipos 1 e 5 de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1 e mGluR5, respectivamente)

nos astrócitos desencadeiam a cascata de IP_3/Ca^{2+} que irá induzir o aumento na $[Ca^{2+}]_i$. Entretanto, parece que apenas a ativação mGluR5 evoca a oscilação de $[Ca^{2+}]_i$ (KAWABATA et al., 1996).

SCHUBERT et al. (1997), constataram que a adenosina possui um efeito protetor em neurônios e células gliais em eventos isquêmicos, pois são um excelente neutralizador do influxo de Ca^{2+} , pelos canais NMDA. Já RAVAL et al. (2003), ao estudarem a atuação deste íon e da proteína quinase C (PKC) na isquemia cerebral averiguaram que esta desempenha um papel importante nos mecanismos de neuroproteção, onde controla a $[Ca^{2+}]_i$. Este efeito foi comprovado com a administração de um antagonista desta proteína que inibiu o efeito neuroprotetor. Assim, um aumento abusivo na $[Ca^{2+}]_i$ está relacionado a evento neurotóxicos. Um dos mecanismos utilizados pelas células do SN para controlar a concentração do Ca^{2+} intracelular e mantê-la em níveis normais é a ligação deste íon com proteínas específicas altamente dependentes dele.

1.2 Proteínas ligantes de Cálcio

O citosol apresenta proteínas que possuem uma alta afinidade ao Ca^{2+} , proteínas estas que modulam as ações intracelulares deste íon e que recebem o nome de proteínas ligantes de cálcio (CaBP) (BAIMBRIDGE et al, 1992; REN & RUDA, 1994).

As proteínas ligantes de Ca^{2+} foram originalmente descobertas no intestino de galinhas (WASSERMAN et al., 1966; WASSERMAN et al., 1973), e em seguida descritas em outros tipos de tecidos, incluindo o sistema nervoso central (SNC), onde são altamente distribuídas em áreas distintas (BAIMBRIDGE et al., 1981;

BAIMBRIDGE et al., 1982; CELIO et al., 1981). Dentre elas destacam-se a calbindina, a parvalbumina e a proteína S100 β .

A calbindina desempenha um papel primordial na regulação da concentração intracelular do Ca²⁺ e é expressa em populações específicas do SNC (YENARI et al., 2001; GOODMAN et al., 1993). Na medula espinal ela está presente na substância cinzenta, encontrada nas lâminas: I, II, IV, VII, VIII e X de Rexed e também no núcleo intermédio lateral (ANTAL et al., 1990; CELIO, 1990; REN & RUDA, 1994).

Estudos demonstram que a calbindina apresenta um efeito de proteção em neurônios em processos de isquemia ou de excitotoxicidade, sendo que durante esses processos, ela é expressa pelos neurônios e também pelos astrócitos (BAIMBRIDGE et al., 1992; GOODMAN et al., 1993; TOYOSHIMA et al., 1996; YENARI et al., 2001).

LEE e col. (2005), detectaram calbindina imunorreativa na lâmina basal de microvasos de coelhos, após 30 minutos de isquemia. Dessa maneira, os autores sugestionam que uma expressão ectópica na expressão da calbindina na lâmina basal pode estar associada com o tamponamento de cálcio para o interior da célula endotelial após isquemia e, por conseguinte, desempenhado um papel neuroprotetor.

Já Fallah e col. (1999), descreveram que o aumento na expressão da calbindina na medula espinal, após axotomia dos nervos ulnar e mediano, não é suficiente como resposta neuroprotetora para os motoneurônios em animais jovens.

A outra CaBP é parvalbumina (PV) que na medula espinal é altamente expressa na região dorso medial do corno posterior, parte interna da lâmina II de Rexed, núcleos basilar interno e cervical medial da substância cinzenta, no fascículo

grácil cuneiforme e em neurônios GABAérgicos (ANTAL et al., 1990; CELIO, 1990; REN & RUDA, 1994).

Estudos demonstram que uma elevada expressão da PV nos neurônios da medula espinal na fase mais tardia do desenvolvimento, pelo menos em parte, é dependente de suas conexões com córtex durante o desenvolvimento (CLOWRY et al., 1997; GIBSON et al., 2000). GIBSON & CLOWRY (2001) descreveram que este mecanismo pode ser retardado, mas não abolido pela administração de bloqueadores dos receptores NMDA. Outro pesquisador, CELIO (1990) ainda descreveu que a PV é predominantemente expressa por neurônios inibitórios no SNC, sugerindo assim uma importante projeção córtico-espinal para as vias inibitórias.

Segundo GIBSON et al. (2000), a medula espinal apresentou aumento da imunorreatividade à PV durante atividade neuronal após estímulo lesivo do córtex motor, sugerindo que esses circuitos espinais desenvolvem duradoura alteração no arranjo da atividade neuronal em resposta a lesão cortical prematura, no entanto esse efeito plástico é perdido no animal maduro.

Já a proteína S100 é uma CaBP inicialmente descrita em astrócitos (LUDUIWN et al., 1976; COCCHIA, 1981), e o seu nome refere-se a sua fração subcelular que contem três formas diméricas obtidas pela combinação de duas cadeias, a α e a β , que formam a S100 α (dímeros $\alpha\alpha$), a S100 α (dímeros $\alpha\beta$) e S100 β (dímeros $\beta\beta$) (ZIMMER et al., 1995).

Segundo XIONG et al. (2000), a proteína S100 β pode sutilmente influenciar na transmissão sináptica, pois um distúrbio na onda de Ca^{2+} , resultado pela ausência desta proteína S100 β , pode sutilmente influenciar na transmissão sináptica. Desse

modo, acredita-se que ela também desempenhe um papel importante na manutenção da homeostase do Ca^{2+} nos astrócitos do SNC.

A proteína S100 β tem sido implicada na fosforização de proteínas, no dinamismo do citoesqueleto, no ciclo celular. (SCHAFER e HEIZMANN, 1996; DONATO, 1999). Estando associada aos processos de plasticidade e de trofismo do SNC. Portanto, desempenha um importante papel nos eventos relacionados à manutenção e reparo neural após danos cerebrais. (GOMIDE et al., 1999; CERUTTI et al., 2000; XIONG et al., 2000).

No sistema nervoso central a proteína S100 β é abundante e é liberada no espaço extracelular pelos astrócitos onde atuará de maneira autócrina sobre estas células e de forma parácrina nos neurônios (KLIGMAN e MARSHAK, 1985; VAN ELDIK e ZIMMER, 1987; WINNINGHAM-MAJOR et al., 1989).

Concentrações nanomolar desta proteína no meio extracelular têm sido apresentadas por aumentar a sobrevivência e o crescimento neuronal via ativação do fator de transcrição NF- κ B, e por aumentar a atividade de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) (ALEXIANIAN e BANURG, 1999; GONSALVES et al., 2000).

HUTTUNEN et al. (2000) sugerem que a interação da proteína S100 β com o receptor de superfície RAGE pode induzir o crescimento de fibras e mediar os eventos relacionados a sobrevivência neuronal pela ativação de NF- κ B e aumento na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

A literatura apresenta uma forte relação entre a proteína S100 β e o fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF-2), pois além de promover a sobrevivência

neuronal e o crescimento de neuritos, (BARGER & VAN ELDIK, 1992; GRIFFIN et al., 1995), ambas promovem gliogênese e angiogênese (DUNN et al., 1987; REEVES et al., 1994).

Em nosso laboratório também temos observado que esta relação pode ser relevante para manutenção e reparo após lesão do sistema dopaminérgico e da medula espinal, expondo assim uma possível ação parácrina de neuroproteção do astrócito reativo, mediada pelo S100 β e FGF-2 (CHADI & GOMIDE, 2004; DO CARMO CUNHA et al., 2007).

IWASAKI et al. (1997) demonstraram que a administração exógena de S100 β , em ratos axotomizados, promoveu uma sobre vida aos neurônios motores da medula espinal, sugerindo assim, que a proteína S100 β atue como um fator neurotrófico *in vivo* nesta população de neurônios.

1.3 Atividade Física e Neuroplasticidade

O trofismo e a plasticidade celular no tecido nervoso também são influenciados pela atividade neuronal. Sabe-se que neurônios estimulados pela atividade eletrofisiológica acionam sinais intracelulares, estes conduzem à produção de proteínas que atuam como fatores de transcrição. Estas proteínas têm a função de iniciar ou inibir a expressão de genes específicos que participam das respostas tróficas e da plasticidade do sistema nervoso (HERDEGEN & LEAH, 1998).

Assim, trabalhos têm demonstrado que a ativação neuronal responde a estímulos fisiológicos como a estimulação tátil e luminosa; a exposição ao ambiente enriquecido que contém objetos para exploração e equipamentos de entretenimento; e

a atividade física na roda de correr (CASTREN et al., 1993; SCHOUPS et al., 1995; ROCAMORA et al., 1996; KESSLAK et al., 1998).

Segundo ENDRES et al. (2003), dentre os diversos estímulos, a atividade física espontânea na roda de corrida é a mais utilizada, pois descarta variáveis associadas ao estresse, como observado na atividade física forçada em esteira de corrida, além de permitir a fácil mensuração da quantidade de estímulo.

Estudos clínicos demonstram que atividade física pode estar relacionada com a melhora da cognição e da memória (CLARKSON-SMITH & HARTLEY, 1989; GLESER & MENDELBERG, 1990), podendo prevenir os declínios do sistema nervoso relacionados ao envelhecimento (HILL et al., 1993; BLOMQUIST E DANNER, 1987; ROGERS et al., 1990; KRAMER et al., 1999).

A literatura ainda apresenta que a falta de atividade física associada com um estilo de vida sedentário ainda pode contribuir com os riscos de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, osteoporose, câncer e depressão, sendo que a prática de atividade física reduz o risco dessas doenças (DISHMAN et al., 2006).

Os benefícios da atividade física podem ser observados em pacientes com lesão da medula espinal, onde estes foram submetidos a um programa de treinamento e apresentaram uma melhora na marcha residual (FUNG et al., 1990; WERNIG et al., 1995; HARKEMA et al., 1997; HARKEMA, 2001). Estes resultados podem estar relacionados ao aumento de proteínas tróficas na medula espinal após atividade física (GOMEZ-PINILLA et al., 2001; GOMEZ-PINILLA et al., 2002).

Experimentos demonstram que a atividade física está envolvida nos eventos relacionados ao aumento na expressão do mRNA dos fatores neurotróficos como

neurotrofina-3 (NT-3), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento de nervo (NGF) e do FGF-2; além de outras proteínas relacionadas à plasticidade do sistema nervoso (NEEPER et al., 1995; NEEPER et al., 1996; GOMEZ-PINILLA et al., 1997; GOMEZ-PINILLA et al., 19998; OLADEHIN & WATERS, 2001; TONG et al., 2001; GOMEZ-PINILLA et al., 2002; MONTENI et al., 2002; YING et al., 2003; YING et al., 2005).

Entretanto os trabalhos sobre a influência da atividade física sobre os ligantes de cálcio no sistema nervoso são poucos. Em estudo pioneiro ARIDA et al. (2004) observaram uma forte imunorreatividade para a parvalbumina no giro denteado de ratos submetidos à atividade de física voluntária, sugerindo dessa forma, que a atividade física voluntária leva à alterações plásticas na formação do hipocampo. No entanto a parvalbumina nesse trabalho foi considerada apenas como marcador morfológico.

Já, MUSSACK et al. (2003) estudaram a expressão da proteína S100 β no sistema vascular de jovens jogadores de futebol. Eles observaram que o aumento nos níveis desta proteína em atletas entre 12-13 e 14-15 anos de idade é relativamente maior que nos jogadores com média de idade de 16-17 anos. Assim os autores sugerem que a proteína S100 β transportada pelo sistema vascular é de extrema importância para os mecanismos de plasticidade e de proteção do SNC.

DIETRICH et al. (2003) também observaram um aumento nos níveis da proteína S100 β no sistema vascular em atletas nadadores. Entretanto, estes estudos não foram realizados no SNC e sim no sistema vascular periférico, e os autores apenas sugerem a possível ação desta proteína no SNC após atividade física.

Assim, devido ao importante papel das proteínas ligantes de Ca^{2+} no controle da homeostase deste íon, bem como nos mecanismos de plasticidade, de proteção e de trofismo do SNC, este trabalho tem como objetivo estudar a imunorreatividade destas proteínas na medula espinal de ratos submetidos à atividade física espontânea na roda de corrida.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Analisar e quantificar as modificações das imunorreatividades dos ligantes de Ca^{2+} neuronais (parvalbumina, calbindina) e astrocitário (proteína S100 β) em áreas específicas da medula espinal do rato, após 4 e 14 dias de atividade física espontânea realizada na roda de corrida.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Regime da Atividade Física Espontânea na roda de corrida

Ratos *Wistar*, machos, jovens (10 semanas de idade), foram mantidos sob condições constantes de temperatura e umidade, com ciclo claro e escuro regular e acesso livre à ração e água. Após um período de acomodação no biotério aclimatizado, os animais foram submetidos à atividade física espontânea na roda de corrida.

Durante os períodos de exercício, os ratos foram acomodados em caixas de polipropileno específicas para essa espécie de animal. No interior dessas caixas, foram colocadas as rodas de corrida com diâmetro de 34,5 cm.

Medidas do deslocamento das rodas foram registradas por 12 horas em um programa específico de computador (Oxymax Deluxe System). Todos os ratos foram submetidos a um treinamento de três dias na roda para possibilitar que eles ganhassem a destreza necessária a esse tipo de atividade e reduzir, dessa forma, o efeito do período de aprendizagem e acomodação que pudesse interferir na fase experimental. Depois do treinamento, os ratos foram colocados em caixas padrão, desprovidas da roda por 10 dias, para atenuar qualquer efeito fisiológico do período anterior. Grupos de animais foram colocados por 4 ou 14 noites nas caixas com rodas de corrida. Animais controles foram colocados em caixas individualizadas e desprovidos das rodas nos mesmos períodos que os animais experimentais. Ao término deste período, os animais foram processados para análise imunohistoquímica da medula espinal como será descrito a seguir e o total do percurso do animal foi registrado em cada noite.

Figura 01: Sistema de atividade física espontânea na roda de corrida. Em menor aumento, o computador (embaixo a esquerda) e as caixas com os animais sedentários (canto superior a direita) e os treinados (inferior a direita) (A). Em grande aumento apresenta como os animais ficam acomodados dentro da caixa de polipropileno que contem a roda de corrida (B).

Esse protocolo de atividade física demonstrou não exercer estresse tecidual ao rato. E também foi publicado em vários trabalhos na literatura que estuda o efeito da atividade física espontânea nesse tipo de animal (FORDYCEE & WEHNER, 1993; NEEPER et al, 1995; NEEPER et al 1996; GÓMEZ-PINILLA et al, 1997; GÓMEZ-PINILLA et al, 1998).

3.2 Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em dois grupos, como já mencionados no item 3.1 do material e método: animais do grupo EFEITO PRECOCE foram sacrificados na manhã após a 4ª noite do término do período de atividade física na roda; e animais do grupo EFEITO PROLONGADO foram sacrificados na manhã seguinte à 14ª noite de atividade física na roda de corrida.

3.3 Eutanásia dos animais

Após os períodos de 4 e 14 dias os ratos foram submetidos a eutanásia por meio de uma perfusão transcardíaca de solução salina (0.9%) e solução fixadora. A solução fixadora é uma solução modificada de ZAMBONI & DE-MARTINO (1967) que consiste de 4% paraformaldeído diluído em tampão fosfato (0.1M, PH 7,4) de ácido pícrico saturado. As medulas espinais foram rapidamente removidas e pós-fixadas na mesma solução fixadora durante 90 minutos e em seguida, lavadas em uma solução de sacarose (10%) dissolvida em tampão fosfato por 48 horas. As medulas espinais foram congeladas com isopentano e gelo seco (-45°) e armazenadas em freezer -70° C até a utilização.

3.4 Processamento tecidual e regiões a serem estudadas

Os segmentos congelados das medulas espinais foram seccionados em cortes seriados transversais de 20 µm. Os cortes congelados foram efetuados num criostato Leica, modelo CM3000 (Alemanha) com temperatura fixa entre -16°C e -20°C, e em seguida, processados em lâminas para imuno-histoquímica. Com um início aleatório, as secções de toda a medula espinal foram amostradas sistematicamente, à cada 100 secções, em ordem rostro-caudal, foram então obtidas.

3.5 Imuno-histoquímica

3.5.1. Marcadores imuno-histoquímicos

Os seguintes marcadores foram utilizados (anticorpos primários):

- a. Parvalbumina.** Anticorpo monoclonal anti-parvalbumina produzido em camundongo, é derivado de hibridoma produzido pela fusão de células de mieloma e esplenócitos imunizados de camundongo (Sigma, USA).
- b. Calbindina.** Anticorpo monoclonal anti-calbindina D derivado de fluído ascítico de camundongo (Sigma, USA).
- c. Proteína S100.** Anticorpo policlonal feito em coelhos contra a proteína S100 de vaca (Sigma, USA).

3.5.2 Marcação imuno-histoquímica

O método imuno-histoquímico foi descrito com detalhes por CHADI et al., 1993a, b, c; CHADI et al., 1994; HUMPEL et al., 1994. As secções foram incubadas por 48 horas, sob agitação, a 4°C com um dos marcadores imunohistoquímicos descritos anteriormente (item 3.5.1 de material e método). O sistema da imunoperoxidase indireta

empregando a avidina-biotina (ABC) (HSU et al., 1981; Vectastain, EUA) foi usado com a 3-3'-diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) como cromógeno (Sigma, EUA). Depois de lavadas em tampão fosfato, as secções foram incubadas com imunoglobulinas biotiniladas (Vector, EUA, diluído 1:200) por uma hora. Essas imunoglobulinas foram obtidas de ovelha ou cavalo e produzidas contra anticorpos de animais em cujos os anticorpos primários foram retirados. Os anticorpos foram diluídos em tampão fosfato contendo 0.3 % Triton X-100. Numa terceira incubação a avidina e uma peroxidase biotinilada foram introduzidas (Vectastain, Vector, EUA; ambas diluídas 1:100) durante 45 minutos. A reação foi completada com 0.03% de DAB (Sigma) como cromógeno e H₂O₂ (Sigma) durante 6 minutos. Os procedimentos imuno-histoquímicos foram uniformizados. Assim, foram considerados: o ponto de saturação do DAB, a diluição do anticorpo primário longe da saturação e um tempo de incubação ajustado de tal modo que os elementos mais escuros das secções medulares estivessem inferiores a saturação (ZOLI et al., 1990).

As secções obtidas por esse método e marcadas com os anticorpos descritos anteriormente foram submetidas à análise semi-quantitativa morfométrica e microdensitométrica das marcações intracelulares.

3.6 Quantificação pela análise semiquantitativa morfométrica e microdensitométrica das imunorreatividades

As imunorreatividades das proteínas S100 β , parvalbumina e calbindina foram quantificadas em áreas específicas da substância branca e cinzenta da medula espinal através da análise de imagem. Os procedimentos de análises semi-quantitativas microdensitométricas foram realizadas num analisador de imagem KS400 (Kontron, Alemanha) acoplado a uma câmara montada em um microscópio Zeiss. A imagem foi obtida das secções através da câmara e projetada em um monitor. Campos de área

definidos foram selecionados de regiões específicas da substância branca e cinzenta da medula espinal, bilateralmente, em secções da intumescência cervical, do nível torácico e intumescência lombar. Após a correção do sombreamento, alguns procedimentos de discriminação foram realizados: os valores médios dos tons de cinza (MGV), assim como o erro padrão da média (e.p.m.) dos valores médios dos tons de cinza obtidos da substância branca desprovida de marcação específica serão medidos. Os valores de tons de cinza mais escuro que o *background* MGV-3 s.e.m foram considerados como marcação específica e, deste modo, discriminados. Os MGV específicos (sp) foram definidos como a diferença entre os MGV do background e os MGV dos perfis discriminados. Os MGV da lâmina foram mantidos constante em 200. Este procedimento foi repetido para cada secção, no intuito de corrigir as medidas de cada marcação específica em relação aos valores do seu próprio *background* (CHADI et al., 1993a, CHADI et al., 1993b). O tamanho dos campos de quantificação foi de $2,8 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. A área total e a média dos spMGV dos perfis imunorreativos foram obtidos dentro dos campos de quantificação. A medida morfométrica (área) e microdensitométrica (spMGV) indicou a quantidade de perfis imunopositivos e a intensidade de imunomarcação, respectivamente.

As áreas estabelecidas para quantificação dessas proteínas foram baseadas na sua localização morfológica em níveis cervical, torácico e lombar. Assim, a imunorreatividade para proteína calbindina foi realizada nas lâminas I e II de Rexed (corno posterior) e no núcleo espinal lateral. Para proteína paralbunina as áreas estipuladas foram as laminae IIb e III de Rexed (corno posterior), e também no fascículo cuneiforme, o corno anterior e o núcleo dorsal. Já as áreas definidas para a proteína S100 β foram o corno anterior e os funículos lateral e posterior.

Figura 02: Esquema representa as áreas quantificadas para as proteínas calbindina (A), parvalbumina (B) e S100 β (C), no núcleo espinal lateral (NEL), no corno posterior (CP), no fascículo cuneiforme (FC), no núcleo dorsal (ND), no corno anterior (CA), no funículo posterior (FP) e no funículo lateral (FL).

3.7 Análise estatística

Os dados quantitativos das imunorreatividades nos grupos analisados foram comparados estatisticamente pelo teste de Mann Whitney U (HOLLANDER & WOLFE,1973).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 *Análise tecidual qualitativa e quantitativa*

4.1.1 Análise da imunorreatividade para visualização da proteína calbindina:

A imunorreatividade à proteína calbindina foi encontrada no corpo de neurônios, em terminais sinápticos das lâminas I e II de Rexed, em fibras e terminais do núcleo espinal lateral, e em interneurônios da substância cinzenta da medula espinal, nos níveis cervical, torácico e lombar.

As análises morfométrica e microdensitométrica do corno posterior, em nível torácico, mostraram uma diminuição de 51,75% e de 16,07%, respectivamente, nos animais treinados quando comparados ao grupo sedentário, após 14 dias de atividade física (tabela 01, figuras 03 e 04). Efeito semelhante observou-se no núcleo espinal lateral; e o grupo que treinou durante 14 dias na roda de corrida, apresentou uma diminuição na área de imunorreatividade 47,06% em relação ao seu grupo controle (tabela 01, figuras 03 e 04).

Em nível lombar, a análise morfométrica do corno posterior mostrou uma diminuição na área imunorreativa do grupo treinado de 30,84% em comparação ao grupo sedentário, após 14 dias de treinamento na roda de corrida (tabela 01, figuras 03 e 04).

Tabela 1. Análise da imunorreatividade da proteína calbindina na medula espinal

	4 dias		14 dias	
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado
Cervical				
Análise morfométrica				
<u>Corno posterior</u>	907,9 ±150,8	1164 ±116,6	916,5 ±69,84	1025 ±188,6
<u>Núcleo espinal lateral</u>	865 ±180,7	887,4 ±107,6	675,5 ±161,7	679,5 ±95,32
Análise microdensitométrica				
<u>Corno posterior</u>	100 ±6,501	109,1 ±5,664	109,5 ±3,775	103,6 ±3,919
<u>Núcleo espinal lateral</u>	92,03 ±6,966	91,11 ±7,389	94,06 ±3,701	89,14 ±4,921
Torácico				
Análise morfométrica				
<u>Corno posterior</u>	1202 ±166,9	1385 ±96,1	1339 ±60,54	646 ±98,73***
<u>Núcleo espinal lateral</u>	814,5 ±140,9	846,5 ±150,5	707,6 ±57,28	374,3 ±92,23***
Análise microdensitométrica				
<u>Corno posterior</u>	107,6 ±5,703	96,35 ±5,878	107,2 ±3,385	89,97 ±3,491**
<u>Núcleo espinal lateral</u>	92,52 ±6,004	85,04 ±3,636	86,81 ±4,427	72,46 ±4,709
Lombar				
Análise morfométrica				
<u>Corno posterior</u>	1464 ±128,2	1505 ±141,7	1320 ±87,03	912,8 ±48,7**
<u>Núcleo espinal lateral</u>	1331 ±84,46	1116 ±119,9	1215 ±113,5	1052 ±112,1
Análise microdensitométrica				
<u>Corno posterior</u>	110,9 ±4,275	102,2 ±7,151	100,3 ±2,475	103,3 ±5,636
<u>Núcleo espinal lateral</u>	99,92 ±5,636	96,24 ±10,45	80,48 ±5,269	87,1 ±7,09

Médias e e.p.m. das áreas e dos valores médios dos tons de cinza específicos (spMGV) da imunorreatividade da proteína calbindina, obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno posterior e núcleo espinal lateral, nos níveis cervical, torácico e lombar de ratos submetidos à atividade física espontânea na roda de corrida, respectivamente, por 4 e 14 dias (grupo treinado) e ratos que não realizaram atividade física (grupo sedentário).

Figura 03: Gráficos das médias e.p.m. das áreas (A,C,E) e dos valores médios dos tons de cinza específicos (spMGV, B,D,F) da imunorreatividade da proteína calbindina obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno posterior (cp) e núcleo espinal lateral (nel), nos níveis cervical, torácico e lombar de ratos após 4 e 14 dias de atividade física espontânea na roda de corrida (grupo treinado) e ratos não submetidos à atividade física (grupo sedentário). Teste de Mann Whitney *U*; ★★= $p<0,01$; ★★★= $p<0,001$.

Figura 04: Fotomicrografias das imunorreatividades da proteína calbindina nas lâminas I e II de Rexed (corno posterior) (A, B, E, F) e no núcleo espinal lateral (C e D) da medula espinal, em nível torácico (A,B,C, D) e em nível lombar (E e F), de ratos submetidos à atividade física voluntária na roda de corrida (grupo treinado, B, D e F) e ratos não submetidos atividade física (grupo sedentário, A, C e E) por um período de 14 dias. Corpos de neurônios (setas fechada), terminais sinápticos (setas pequenas), axônios (cabeça de setas). Barra = 20 μ m.

4.1.2 Análise da imunorreatividade da proteína parvalbumina:

A imunorreatividade à proteína parvalbumina foi encontrada no corno posterior, nas lâminas II e III de Rexed, no corno anterior, núcleo dorsal (coluna de Clark), nas lâminas V e VI de Rexed e no fascículo cuneiforme, nos níveis cervical, torácico e lombar.

No nível cervical a análise morfométrica no corno posterior, do grupo que realizou atividade física voluntária na roda por 4 dias, demonstrou um aumento na imunorreatividade ($p<0,05$) de 22,22% em relação ao seu controle (tabela 02, figuras 05 e 06).

No nível torácico, a análise morfométrica do fascículo cuneiforme mostrou uma diminuição na área imunorreativa ($p<0,001$) de 70% no grupo treinado quando comparados ao grupo sedentário após 4 dias de atividade física (tabela 02, figuras 05 e 06). Efeito semelhante observou-se após 14 dias de atividade física, onde o grupo treinado apresentou uma diminuição ($p<0,001$) de 46,13% quando comparado ao grupo sedentário (tabela 02, figuras 05 e 06).

Ainda no nível torácico, a análise morfométrica, no núcleo dorsal, do grupo submetido à atividade física voluntária por 4 dias apresentou um aumento na área imunorreativa ($p<0,001$) de 43,56% em relação ao sedentário (tabela 02, figuras 05 e 06). Efeito semelhante foi observado após 14 dias de atividade física, onde o grupo treinado apresentou um aumento ($p<0,001$) de 55,25% em comparação ao grupo sedentário (tabela 02, figuras 05 e 06).

Já no nível lombar, a análise morfométrica do corno posterior, após 4 dias de atividade física, o grupo treinado apresentou um aumento na área imunorreativa ($p<0,05$) de 28,7% quando comparado ao sedentário (tabela 02, figuras 05 e 07). O mesmo aumento ocorreu no período de 14 dias, onde o grupo treinado apresentou um

aumento ($p<0,05$) de 16,75% em relação ao sedentário (tabela 02, figuras 05 e 07). Já na análise microdensitométrica, o grupo treinado apresentou uma diminuição no spMGV ($p<0,01$) de 12,6% em relação ao sedentário após 4 dias de atividade física (tabela 02, figuras 05 e 07).

Tabela 2. Análise da imunorreatividade da proteína parvalbumina na medula espinal

	4 dias		14 dias	
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado
Cervical				
Análise morfométrica				
<u>Corno posterior</u>	1116 ±112	1364 ±74,76 *	1448 ±68,74	1426 ±98,35
<u>Fascículo cuneiforme</u>	286,3 ±32,36	203,7 ±32,03	335,4 ±52,23	418,7 ±53,11
<u>Corno anterior</u>	1342 ±109	1374 ±73,84	1353 ±50,84	1325 ±51,7
Análise microdensitométrica				
<u>Corno posterior</u>	103,6 ±3.606	107,1 ±4,394	126,8 ±7,927	125,1 ±9,690
<u>Fascículo cuneiforme</u>	98,09 ±3,944	100,2 ±3,944	107,7 ±4,022	112,7 ±7,126
<u>Corno anterior</u>	96,47 ±4,645	97,11 ±3,617	114 ±8,577	104,1 ±7,708
Torácico				
Análise morfométrica				
<u>Corno posterior</u>	1310 ±84,84	1209 ±62,91	1350 ±53,2	1419 ±55,65
<u>Fascículo cuneiforme</u>	844,7 ±53,61	253,4 ±50,40***	721,6 ±49,3	388,7 ±77,99***
<u>Corno anterior</u>	1343 ±72,33	1303 ±72,33	1449 ±50,69	1395 ±25,2
<u>Núcleo dorsal</u>	871,4 ±60,86	1251 ±35,50***	940,4 ±30,69	1460 ±55,40***
Análise microdensitométrica				
<u>Corno posterior</u>	111,3 ±3,310	112,7 ±4,746	126,4 ±10,61	136,5 ±5,568
<u>Fascículo cuneiforme</u>	89,35 ±2,722	94,21 ±5,568	100,5 ±7,870	110,7 ±6,937
<u>Corno anterior</u>	99,79 ±3,14	97,91 ±5,204	111,4 ±5,307	124,2 ±4,865
<u>Núcleo dorsal</u>	109,2 ±3,418	100,5 ±3,875	123,3 ±6,835	127,1 ±5,314
Lombar				
Análise morfométrica				
<u>Corno posterior</u>	1080 ±31,78	1390 ±78,25*	1146 ±33,42	1338 ±48,29*
<u>Corno anterior</u>	1326 ±51,33	1163 ±47,61	1213 ±57,12	1216 ±18,97
Análise microdensitométrica				
<u>Corno posterior</u>	116,7 ±2,658	102 ±3,814**	123,3 ±5,343	125,9 ±7,452
<u>Corno anterior</u>	90,87 ±3,004	92,29 ±5,286	93,53 ±12,11	110 ±4,777

Médias e e.p.m. das áreas e dos valores médios dos tons de cinza específicos (spMGV) da imunorreatividade da proteína parvalbumina obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno posterior (cp) e do núcleo espinal lateral (nel), nos níveis cervical, torácico e lombar de ratos submetidos à atividade física espontânea no roda de corrida, respectivamente, por 4 e 14 dias (grupo treinado) e ratos não submetidos a atividade física (grupo sedentário).

Figura 05: Gráficos das médias e.p.m. das áreas (A,C,E) e dos valores médios dos tons de cinza específicos (spMGV, B,D,F) da imunorreatividade da proteína parvalbumina obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno posterior (cp), fascículo cuneiforme (fc), corno anterior (ca) e núcleo dorsal (nd), nos níveis cervical, torácico e lombar de ratos, após 4 e 14 dias de atividade física espontânea na roda de corrida (grupo treinado) e ratos não submetidos a atividade física (grupo sedentário). Teste de Mann Whitney U; ★=p<0,05; ★★=p<0,01; ★★★=p<0,001.

Figura 06: Fotomicrografias das imunorreatividades da proteína parvalbumina no corno posterior, lâmina II de Rexed, no nível cervical (A e B), e fascículo cuneiforme em nível torácico (C, D, E e F), de ratos submetidos à atividade física voluntária na roda de corrida (grupo treinado; B,D,F,H) e ratos não submetidos à atividade física (grupo sedentário; A,C,E,G) por um período de 4 dias (A, B, C e D) e 14 dias (E e F). Corpos celulares (setas fechada), prolongamentos celulares (setas abertas), axônios (cabeça de setas), terminais sinápticos (setas pequenas) Neurônios (estrela) (Barra = 20μm).

Figura 07: Fotomicrografias da imunorreatividade da proteína parvalbumina no núcleo dorsal, em nível torácico (A,B,Ce D), e no corno posterior, lâmina II de Rexed, em nível lombar de ratos submetidos à atividade física voluntária na roda de corrida (grupo treinado; A, C, E, G) e de ratos não submetidos atividade física (grupo sedentário; A e B) por um período de 4 (A, B, E e F) e 14 (C, D, G e H) dias. Corpos de neurônios (setas fechada) terminais sinápticos (setas pequenas). Barra = 20 μ m.

4.1.3 Análise da imunorreatividade para visualização da proteína S100 β

A imunorreatividade da proteína S100 β foi encontrada em corpos celulares da substância branca e cinzenta da medula espinal.

A análise microdensitométrica do corno anterior, na região cervical, do grupo que treinou na roda por 4 dias apresentou uma diminuição no spMGV ($p < 0,05$) de 10,78% em relação ao grupo sedentário (tabela 03, figuras 08 e 09).

Tabela 2. Análise da imunorreatividade da proteína S100 β na medula espinal

	4 dias		14 dias	
	Sedentário	Treinado	Sedentário	Treinado
Cervical				
Análise morfométrica				
<u>Corno anterior</u>	3202 $\pm$ 229,7	3012 $\pm$ 171	3076 $\pm$ 129,2	2829 $\pm$ 86,12
<u>Funículo lateral</u>	2530 $\pm$ 38,08	2459 $\pm$ 50,45	2510 $\pm$ 58,35	2467 $\pm$ 43,43
<u>Funículo posterior</u>	2437 $\pm$ 38,1	2419 $\pm$ 34,9	2383 $\pm$ 25,72	2358 $\pm$ 59,77
Análise microdensitométrica				
<u>Corno anterior</u>	110,5 $\pm$ 3,086	98,58 $\pm$ 4,537*	111,6 $\pm$ 5,193	118,6 $\pm$ 2,766
<u>Funículo lateral</u>	106 $\pm$ 3,148	95,21 $\pm$ 4,697	106,2 $\pm$ 5,32	109,9 $\pm$ 4,599
<u>Funículo posterior</u>	102,3 $\pm$ 5,199	93,31 $\pm$ 5,077	110,9 $\pm$ 6,557	115,7 $\pm$ 2,860
Torácico				
Análise morfométrica				
<u>Corno anterior</u>	2961 $\pm$ 57,71	2855 $\pm$ 104,9	2834 $\pm$ 50,58	3004 $\pm$ 100,9
<u>Funículo lateral</u>	2345 $\pm$ 20,65	2302 $\pm$ 23,62	2411 $\pm$ 29,34	2397 $\pm$ 20,50
<u>Funículo posterior</u>	2302 $\pm$ 18,7	2268 $\pm$ 15,38	2316 $\pm$ 35,94	2368 $\pm$ 36,35
Análise microdensitométrica				
<u>Corno anterior</u>	101,4 $\pm$ 3,511	102,9 $\pm$ 3,533	120 $\pm$ 3,740	117,4 $\pm$ 4,29
<u>Funículo lateral</u>	94,55 $\pm$ 5,158	94,2 $\pm$ 3,111	105,2 $\pm$ 6	103 $\pm$ 3,344
<u>Funículo posterior</u>	95,15 $\pm$ 5,793	102,2 $\pm$ 5,135	106,5 $\pm$ 6,49	113,1 $\pm$ 4,446
Lombar				
Análise morfométrica				
<u>Corno anterior</u>	2856 $\pm$ 103	2678 $\pm$ 79,56	2995 $\pm$ 98,27	2897 $\pm$ 80,96
<u>Funículo lateral</u>	2522 $\pm$ 65,58	2396 $\pm$ 32,1	2478 $\pm$ 51,02	2421 $\pm$ 50,75
<u>Funículo posterior</u>	2348 $\pm$ 43,75	2246 $\pm$ 21,89	2377 $\pm$ 53,6	2358 $\pm$ 62,83
Análise microdensitométrica				
<u>Corno anterior</u>	101,1 $\pm$ 4,045	91,12 $\pm$ 4,626	105,3 $\pm$ 3,475	98,05 $\pm$ 5,18
<u>Funículo lateral</u>	99,84 $\pm$ 4,571	94,98 $\pm$ 5,397	104,2 $\pm$ 4,667	100,7 $\pm$ 4,324
<u>Funículo posterior</u>	99,62 $\pm$ 4,324	98,55 $\pm$ 5,345	98,58 $\pm$ 14,86	101,5 $\pm$ 3,48

Médias e e.p.m. das áreas e dos valores médios dos tons de cinza específicos (spMGV) da imunoreatividade da proteína S100 β obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno posterior (cp) e do núcleo espinal lateral (nel), nos níveis cervical, torácico e lombar de ratos submetidos à atividade física espontânea na roda de corrida, respectivamente, por 4 e 14 dias (grupo treinado) e ratos não submetidos à atividade física (grupo sedentário).

Figura 08: Gráficos das médias e.p.m. das áreas (A,C,E) e dos valores médios dos tons de cinza específicos (spMGV, B,D,F) da imunorreatividade da proteína S100β obtidos por análise de imagem em áreas específicas do corno anterior (ca), funículo lateral (fl) e funículo posterior (fp), nos níveis, cervical, torácico e lombar, após 4 e 14 dias de atividade física espontânea na roda de corrida (grupo treinado) e ratos não submetidos a atividade física (grupo sedentário). Teste de Mann Whitney *U*; ★=*p* < 0,05.

Figura 09: Fotomicrografia da imunorreatividade da proteína S100 β no corno anterior (A,B), em nível cervical, de ratos submetidos à atividade física voluntária na roda de corrida por 4 dias (grupo treinado; B) e animais não submetidos à atividade física (grupo sedentário; A). Astrócitos (setas fechadas). Barra = 20 μ m.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este trabalho analisou a imunorreatividade das proteínas ligantes de cálcio na medula espinal, e também a sua participação na neuroquímica de circuitos neuronais e a interação neurônio-glia (astrócitos) de ratos submetidos à atividade física voluntária.

Estudos demonstraram que a atividade física voluntária leva à ativação de proteínas que atuam nos mecanismos de plasticidade, trofismo, proteção, crescimento de fibras e de sobrevivência de neurônios no sistema nervoso central (BLOMQUIST E DANNER, 1987; CLARKSON-SMITH & HARTLEY, 1989; FUNG et al., 1990; GLENER & MENDELBERG, 1990; ROGERS et al., 1990; HILL et al., 1993; WERNIG et al., 1995; HARKEMA et al., 1997; KRAMER et al., 1999; GOMEZ-PINILLA et al., 2001; HARKEMA, 2001; GOMEZ-PINILLA et al., 2002).

Entretanto, poucos estudos foram realizados sobre o papel das proteínas ligantes de cálcio nos mecanismos de plasticidade, trofismo, proteção, crescimento de fibras e de sobrevivência de neurônios no sistema nervoso central após a realização de atividade física. Contudo, um estudo pioneiro foi o de ARIDA et al. (2004), que retratou a imunorreatividade da proteína parvalbumina no giro denteado de ratos submetidos à atividade de física voluntária. Os autores sugerem dessa forma que a atividade física voluntária leva a alterações plásticas na formação hipocampal, mas os autores descrevem a parvalbumina apenas como um marcador morfológico neste trabalho.

Outro trabalho foi o de MUSSACK et al. (2003), que estudaram a expressão da proteína S100 β no sistema vascular de jovens jogadores de futebol. Eles observaram que o aumento nos níveis desta proteína em atletas entre 12-13 e 14-15 anos de idade é relativamente maior que nos jogadores com média de idade de 16-17 anos. Com o resultado obtido os autores sugerem um possível aumento nos níveis da proteína S100 β no SNC. DIETRICH et al. (2003) também observaram um aumento nos níveis da

proteína S100 β no sistema vascular, mas com nadadores. Entretanto a literatura não apresenta nenhuma relação entre o aumento desta proteína no sistema vascular periférico com o SNC

As proteínas calbindina e parvalbumina apresentaram imunorreatividade positiva em regiões específicas da medula espinal. A primeira proteína foi imunorreativa nas lâminas I e II de Rexed, no núcleo espinal lateral (Figura 04) e interneuronios da substância cinzenta como descrito na literatura (ANTAL et al., 1990; CELIO, 1990; REN & RUDA, 1994, ANELLI & HECKMAN, 2005), não sendo imunorreativa no núcleo intermédialateral e na lâmina III de Rexed. Já a proteína parvalbumina apresentou imunorreatividade nas lâminas IIb e III de Rexed, no núcleo Dorsal, no corno anterior e no fascículo cuneiforme (Figuras 06, 07), como descrito por ANTAL et al., 1990; CELIO, 1990; REN & RUDA, 1994; ANELLI & HECKMAN, 2005. Uma possível explicação para as diferenças na imunorreatividade pode estar relacionada com a marca do anticorpo.

Assim, no nível torácico os animais que realizaram atividade física por 14 dias apresentaram uma diminuição da proteína calbindina na área imunorreativa e no spMGV no corno posterior (lâminas I e II de Rexed) caracterizada, principalmente, pela diminuição de terminais sinápticos (figura 03 e 04). O mesmo foi observado no corno posterior em nível lombar após o mesmo período de treinamento. Em relação à proteína parvalbumina observou-se um aumento na área imunorreativa no corno posterior, em nível cervical, após 4 dias de atividade física, e também, no núcleo dorsal após 4 e 14 dias de treinamento. Um aumento na área também foi visto no corno posterior em nível lombar após 4 dias, entretanto apresentou uma diminuição no spMGV no mesmo período. Estes eventos podem estar relacionados ao papel que o Ca²⁺ executa como mediador intracelular, onde atua de forma marcante no metabolismo e síntese celular (YENG et al., 2004), participando ativamente na liberação de neurotransmissores, na

ativação de enzimas, na expressão de genes e na plasticidade sináptica (SMITH & AUGUSTINE, 1988; BERRIDGE, 1990, 1998; BERRIDGE et al., 1998). Assim, as mudanças na expressão das proteínas ligantes de Ca^{2+} numa tentativa de controlar a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podem estar relacionados a mecanismo de plasticidade na medula espinal. Pois uma vez controlando a $[\text{Ca}^{2+}]$ poderia estar atuando na liberação de neurotransmissores, como o GABA, já que a literatura as descrevem positivas em neurônios GABAérgicos (ANTAL et al., 1990). Isso pode ser observado com aumento na imunorreatividade da proteína parvalbumina nas lamínas II e III de Rexed do corno posterior em terminais sinápticos, bem como no núcleo dorsal.

Entretanto, os estudos realizados sobre a atuação destas proteínas nos mecanismos de neuorplasticidade utilizando a atividade física como modelo de estimulação fisiológica ainda são escassos. Porém o número de trabalhos que utilizaram um estímulo lesivo é muito grande. Pesquisas utilizando a ganglionectomia foi descrita por REN & RUDA, 1994 que demonstraram uma diminuição de neurônios marcados pela calbindina no corno posterior após uma semana de cirurgia. Além disso, Fallah et al. (1999), apresentaram que a axotomia dos nervos ulnar e mediano leva a um aumento na expressão da proteína calbindina nas lâminas I e II de Rexed da medula espinal. No entanto, estes eventos não são suficientes para tornar a resposta neuroprotetora de neurônios imaturos eficaz.

Já o trabalho de SASAKI et al. (2006) descreve que a diminuição da imunorreatividade a parvalbumina e da calbindina nos neurônios contribui na vulnerabilidade destes em processos degenerativos, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA). Os autores explicam que o aumento ou a diminuição na expressão das proteínas calbindina e da parvalbumina, nesse tipo de experimentos, provavelmente, estaria envolvido no mecanismo de controlar a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, desempenhando desta maneira um papel neuroprotetor. Assim é possível observar que as pesquisas realizadas até o momento

ênfatizam o papel destas proteínas nos eventos relacionados a neuroproteção e sobrevivência neuronal. Entretanto trabalhos que descrevam melhor a ação da calbindina e da parvalbumina nos mecanismos intracelulares, na neurotransmissão e a neuplasticidade são de grande importância para o melhor conhecimento destas funções. Neste contexto o trabalho de XIONG et al. (2000), sobre a proteína S100 β , descreve que a ausência dessa pode levar a um distúrbio na onda de Ca²⁺ resultando numa interferência na transmissão sináptica.

Este estudo observou que a proteína S100 β é imunopositiva em células gliais em diferentes regiões da medula espinal (figura 09), como apresentado pela literatura (HAGLID et al., 1976; BHATHACHARYA et al., 1992; CASTAGNA et al., 2003).

A atividade física voluntária levou a uma pequena diminuição na imunorreatividade da proteína S100 β apenas no corno anterior em nível cervical, após 4 dias de atividade física (Figuras 08, 09). Este resultado contradiz ao sugerido por DIETRICH et al. (2003) e MUSSACK et al. (2003). XIONG et al. (2000) descreve o importante papel da proteína S100 β no controle da homeostase do cálcio intracelular em astrócitos, assim esta diminuição pode estar relacionado a este evento, assim como na fosforização de proteínas que é descrito por SCHAFER e HEIZMANN (1996) e DONATO (1999). Outros autores descrevem uma relação entre o FGF-2 e a proteína S100 β (BARGER & VAN ELDIK, 1992; GRIFFIN et al., 1995; GOMIDE et al., 1999; CARMO CUNHA et al., 2007). No entanto, a primeira proteína apresentou um aumento na expressão do seu RNA mensageiro após atividade física voluntária na roda de corrida (GOMEZ-PINILLA et al., 2002).

Os resultados também podem estar relacionados ao tipo de estímulo utilizado. Uma vez que a grande maioria dos trabalhos que descrevem as suas funções em condições patológicas, destacando o papel angiogênico e trófico da proteína S100 β (DUNN et al., 1987; BHATTACHARYA et al., 1992; REEVES et al., 1994; IWASAKI

et al., 1997; GOMIDE et al., 1999; CHADI & GOMIDE, 2004; CARMO CUNHA et al., 2007). Assim, o estímulo utilizado pode ter não sido suficiente para provocar uma alteração mais significativa nos níveis desta proteína na medula espinal.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A atividade física voluntária na roda de corrida promoveu alterações na imunorreatividade das proteínas ligantes de cálcio em neurônios e células gliais na medula espinal; o que denota a importância do Ca^{2+} nos processos neuroplásticos das vias neuronais ativadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexanian, A. R. e J. R., Bamburg. Neuronal survival activity of S100 beta beta is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-KappB. FASEB J, v.13, n.12, Sep, p.1611-20, 1999.

Anelli, R. e C. J. Heckman. The calcium binding proteins calbindin, parvalbumin, and calretinin have specific patterns of expression in the gray matter of cat spinal cord. Epub, v. 34, n.6, Aug 10, p.369-85. 2006.

Antal, M., T. F. Freund, *et al.* Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D 28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: a light and electron microscopic study. J Comp Neurol, v.295, n.3, May 15, p.467-84. 1990.

Araque, A., V. Parpura, *et al.* Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci, v.22, n.5, May, p.208-15. 1999.

Arida, R. M., C. A. Scorza, *et al.* Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. Neurosci Lett, v.364, n.3, Jul 8, p.135-8. 2004.

Auld, D. S. e R. Robitaille. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. Neuron, v.40, n.2, Oct 9, p.389-400. 2003.

Baimbridge, K. G., M. R. Celio, *et al.* Calcium-binding proteins in the nervous system. Trends Neurosci, v.15, n.8, Aug, p.303-8. 1992.

Baimbridge, K. G., J. J. Miller, *et al.* Calcium-binding protein distribution in the rat brain. Brain Res, v.239, n.2, May 13, p.519-25. 1982.

Barger, S. W. e L. J. Van Eldik. S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. J Biol Chem, v.267, n.14, May 15, p.9689-94. 1992.

Berridge, M. J. Calcium oscillations. J Biol Chem, v.265, n.17, Jun 15, p.9583-6. 1990.

Berridge, M. J., M. D. Bootman, *et al.* Calcium--a life and death signal. Nature, v.395, n.6703, Oct 15, p.645-8. 1998.

Bhattacharyya, A., R. W. Oppenheim, *et al.* S100 is present in developing chicken neurons and Schwann cells and promotes motor neuron survival in vivo. J Neurobiol, v.23, n.4, Jun, p.451-66. 1992.

Carmignoto, G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. Prog Neurobiol, v.62, n.6, Dec, p.561-81. 2000.

Castagna, C., C. Viglietti-Panzica, *et al.* Protein S100 immunoreactivity in glial cells and neurons of the Japanese quail brain. J Chem Neuroanat, v.25, n.3, Mar, p.195-212. 2003.

Castren, E., M. Pitkanen, *et al.* The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus. Neuroreport, v.4, n.7, Jul, p.895-8. 1993.

Celio, M. R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. Neuroscience, v.35, n.2, p.375-475. 1990.

Celio, M. R. e C. W. Heizmann. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. Nature, v.293, n.5830, Sep 24, p.300-2. 1981.

Cerutti, S. M. e G. Chadi. S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. Cell Biol Int, v.24, n.1, p.35-49. 2000.

Chadi, G., Y. Cao, *et al.* Temporal and spatial increase of astroglial basic fibroblast growth factor synthesis after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine neurons. Neuroscience, v.61, n.4, Aug, p.891-910. 1994.

Chadi, G. e V. C. Gomide. FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. Cell Biol Int, v.28, n.12, p.849-61. 2004.

Chadi, G., A. Moller, *et al.* Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. Exp Brain Res, v.97, n.1, p.145-58. 1993.

Chadi, G., L. Rosen, *et al.* Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. Neuroreport, v.4, n.6, Jun, p.783-6. 1993.

Chadi, G., B. Tinner, *et al.* Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) immunoreactivity exists in the noradrenaline, adrenaline and 5-HT nerve cells of the rat brain. Neurosci Lett, v.160, n.2, Oct 1, p.171-6. 1993.

Clarkson-Smith, L. e A. A. Hartley. Relationships between physical exercise and cognitive abilities in older adults. Psychol Aging, v.4, n.2, Jun, p.183-9. 1989.

Clowry, G. J., Z. Fallah, *et al.* Developmental expression of parvalbumin by rat lower cervical spinal cord neurones and the effect of early lesions to the motor cortex. Brain Res Dev Brain Res, v.102, n.2, Sep 20, p.197-208. 1997.

Corvalan, V., R. Cole, *et al.* Neuronal modulation of calcium channel activity in cultured rat astrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.11, Jun, p.4345-8. 1990.

Dishman, R. K., Berthoud, Hans-Rudolf, *et al.* Neurobiology of exercise. Obesity. v.14, n.3, March, p. 345-356. 2006.

Do Carmo Cunha, J., de Freitas Azevedo Levy, B., *et al.* Responses of reactive astrocytes containing S100b protein and fibroblast growth factor-2 in the border and in the adjacent preserved tissue after a contusion injury of the spinal cord in rats: implications for wound repair and neuroregeneration. Wound Rep Reg 15. p. 134–146, 2007.

Donato, R. Funcional roles of S100 proteins. Biochim biophys Acta, v.1450, n.3, Jul 8, p.191-231.

Dunn, R., C. Landry, *et al.* Reduction in S100 protein beta subunit mRNA in C6 rat glioma cells following treatment with anti-microtubular drugs. J Biol Chem, v.262, n.8, Mar 15, p.3562-6. 1987.

Edgerton, V. R., R. D. De Leon, *et al.* Use-dependent plasticity in spinal stepping and standing. Adv Neurol, v.72, p.233-47. 1997.

Endres, M., K. Gertz, *et al.* Mechanisms of stroke protection by physical activity. Ann Neurol, v.54, n.5, Nov, p.582-90. 2003.

Fallah, Z. e G. J. Clowry. The effect of a peripheral nerve lesion on calbindin D28k immunoreactivity in the cervical ventral horn of developing and adult rats. Exp Neurol, v.156, n.1, Mar, p.111-20. 1999.

Finkbeiner, S. Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps. Neuron, v.8, n.6, Jun, p.1101-8. 1992.

Fordyce, D. E. e J. M. Wehner. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. Brain Res, v.619, n.1-2, Aug 13, p.111-9. 1993.

Fung, J., J. E. Stewart, *et al.* The combined effects of clonidine and cyproheptadine with interactive training on the modulation of locomotion in spinal cord injured subjects. J Neurol Sci, v.100, n.1-2, Dec, p.85-93. 1990.

Ghosh, A. e M. E. Greenberg. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. Science, v.268, n.5208, Apr 14, p.239-47. 1995.

Gibson, C. L., G. A. Arnott, *et al.* Plasticity in the rat spinal cord seen in response to lesions to the motor cortex during development but not to lesions in maturity. Exp Neurol, v.166, n.2, Dec, p.422-34. 2000.

Gibson, C. L. e G. J. Clowry. N-methyl-D-aspartate receptor blockade during development induces short-term but not long-term changes in c-Jun and parvalbumin expression in the rat cervical spinal cord. Exp Neurol, v.170, n.2, Aug, p.380-4. 2001.

Gleser, J. e H. Mendelberg. Exercise and sport in mental health: a review of the literature. Isr J Psychiatry Relat Sci, v.27, n.2, p.99-112. 1990.

Gomez, L. A., A. Brusco, *et al.* Immunocytochemical study of S-100 positive glial cells in the brainstem and spinal cord of the rat embryo. Int J Dev Neurosci, v.8, n.1, p.55-64. 1990.

Gomez-Pinilla, F., L. Dao, *et al.* Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. Brain Res, v.764, n.1-2, Aug 1, p.1-8. 1997.

Gomez-Pinilla, F., V. So, *et al.* Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. Neuroscience, v.85, n.1, Jul, p.53-61. 1998.

Gomez-Pinilla, F., Z. Ying, *et al.* Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. Eur J Neurosci, v.13, n.6, Mar, p.1078-84. 2001.

_____. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. J Neurophysiol, v.88, n.5, Nov, p.2187-95. 2002.

Gomide, V., T. Bibancos, *et al.* Dopamine cell morphology and glial cell hypertrophy and process branching in the nigrostriatal system after striatal 6-OHDA analyzed by specific stereological tools. Int J Neurosci, v.115, n.4, Apr, p.557-82. 2005.

Gomide, V. e G. Chadi. Glial bFGF and S100 immunoreactivities increase in ascending dopamine pathways following striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system: a stereological analysis. Int J Neurosci, v.115, n.4, Apr, p.537-55. 2005.

Gomide, V. C. e G. Chadi. The trophic factors S-100 β and basic fibroblast growth factor are increased in the forebrain reactive astrocytes of adult callosotomized rat. Brain Res, v.835, n.2, Jul 24, p.162-74. 1999.

Gonçalves, D. S., G., Lenz, *et al.* Extracellular S100 β protein modulates ERK in astrocyt cultures. Neuroreport, v.11, n.4, Marc 20, p.807-9, 2000.

Goodman, J. H., C. G. Wasterlain, *et al.* Calbindin-D28k immunoreactivity and selective vulnerability to ischemia in the dentate gyrus of the developing rat. Brain Res, v.606, n.2, Mar 26, p.309-14. 1993.

Griffin, W. S., O. Yeralan, *et al.* Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 β in human temporal lobe epilepsy. J Neurochem, v.65, n.1, Jul, p.228-33. 1995.

Haglid, K. G., A. Hamberger, *et al.* Cellular and subcellular distribution of the S-100 protein in rabbit and rat central nervous system. J Neurosci Res, v.2, n.3, p.175-91. 1976.

Harkema, S. J. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking. Neuroscientist, v.7, n.5, Oct, p.455-68. 2001.

Harkema, S. J., S. L. Hurley, *et al.* Human lumbosacral spinal cord interprets loading during stepping. J Neurophysiol, v.77, n.2, Feb, p.797-811. 1997.

Hebb, D. O. Organization of behavior pod: A Neuropsychological Theory. John Wiley, EUA.

Herdegen, T. e J. D. Leah. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. Brain Res Brain Res Rev, v.28, n.3, Dec, p.370-490. 1998.

Hill, R. D., S. L. Schwob, *et al.* Self-generated mnemonics for number recall in young and old adults. Percept Mot Skills, v.76, n.2, Apr, p.467-70. 1993.

Hsu, S. M., L. Raine, *et al.* Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem, v.29, n.4, Apr, p.577-80. 1981.

Humpel, C., G. Chadi, *et al.* Increase of basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) messenger RNA and protein following implantation of a microdialysis probe into rat hippocampus. Exp Brain Res, v.98, n.2, p.229-37. 1994.

Iwasaki, Y., T. Shiojima, *et al.* S100 beta prevents the death of motor neurons in newborn rats after sciatic nerve section. J Neurol Sci, v.151, n.1, Oct 3, p.7-12. 1997.

Izquierdo, I. e J. L. Mcgaugh. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. Behav Pharmacol, v.11, n.7-8, Nov, p.517-34. 2000.

Jensen, A. M. e S. Y. Chiu. Differential intracellular calcium responses to glutamate in type 1 and type 2 cultured brain astrocytes. J Neurosci, v.11, n.6, Jun, p.1674-84. 1991.

Kawabata, S., R. Tsutsumi, *et al.* Control of calcium oscillations by phosphorylation of metabotropic glutamate receptors. Nature, v.383, n.6595, Sep 5, p.89-92. 1996.

Kligman, D. e D. R., Marshak. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl acad Sci USA*, v.80, n.20, Oct, p.7136-9. 1985.

Klintsova, A. Y., E. Dickson, *et al.* Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. *Brain Res*, v.1028, n.1, Nov 26, p.92-104. 2004.

Kramer, A. F., S. Hahn, *et al.* Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature*, v.400, n.6743, Jul 29, p.418-9. 1999.

Lambert, T. J., S. M. Fernandez, *et al.* Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem*, v.83, n.3, May, p.206-16. 2005.

Lantos, T. A., T. J. Gorcs, *et al.* Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the premamillary region of the hypothalamus in rats. *Brain Res Brain Res Rev*, v.20, n.2, Feb, p.209-49. 1995.

Lu, B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*, v.10, n.2, Mar-Apr, p.86-98. 2003.

Melander, T., T. Hokfelt, *et al.* Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, v.248, n.4, Jun 22, p.475-517. 1986.

Molteni, R., Z. Ying, *et al.* Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci*, v.16, n.6, Sep, p.1107-16. 2002.

Neeper, S. A., F. Gomez-Pinilla, *et al.* Exercise and brain neurotrophins. Nature, v.373, n.6510, Jan 12, p.109. 1995.

_____. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. Brain Res, v.726, n.1-2, Jul 8, p.49-56. 1996.

Newman, E. A. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. Trends Neurosci, v.26, n.10, Oct, p.536-42. 2003.

Nosyreva, E. D. e K. M. Huber. Developmental switch in synaptic mechanisms of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. J Neurosci, v.25, n.11, Mar 16, p.2992-3001. 2005.

Parpura, V. e P. G. Haydon. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.15, Jul 18, p.8629-34. 2000.

Pozzan, T., R. Rizzuto, *et al.* Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. Physiol Rev, v.74, n.3, Jul, p.595-636. 1994.

Ramon, Y. C. S. Structure and connections of neurons. Bull Los Angel Neuro Soc, v.17, n.1-2, Mar-Jun, p.5-46. 1952.

Reeves, R. H., J. Yao, *et al.* Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.12, Jun 7, p.5359-63. 1994.

Ren, K. e M. A. Ruda. A comparative study of the calcium-binding proteins calbindin-D28K, calretinin, calmodulin and parvalbumin in the rat spinal cord. Brain Res Brain Res Rev, v.19, n.2, May, p.163-79. 1994.

Rocamora, N., E. Welker, *et al.* Upregulation of BDNF mRNA expression in the barrel cortex of adult mice after sensory stimulation. J Neurosci, v.16, n.14, Jul 15, p.4411-9. 1996.

Rogers, R. L., J. S. Meyer, *et al.* After reaching retirement age physical activity sustains cerebral perfusion and cognition. J Am Geriatr Soc, v.38, n.2, Feb, p.123-8. 1990.

Schäfer, B. W. e C. W., Heizmann. The S100 of family of EF-hand calcium-binding proteins functions and pathology. Trends Biochem Sic, v.21, n.4, Apr, p.134-40. 1996.

Schoups, A. A., R. C. Elliott, *et al.* NGF and BDNF are differentially modulated by visual experience in the developing geniculocortical pathway. Brain Res Dev Brain Res, v.86, n.1-2, May 26, p.326-34. 1995.

Schubert, P., T. Ogata, *et al.* Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. Ann N Y Acad Sci, v.825, Oct 15, p.1-10. 1997.

Sasaki, S., Warita, H., Komori, T., *et al.* Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. Brain Research, 1083, p. 196-203. 2006.

Smith, S. J. e G. J. Augustine. Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. Trends Neurosci, v.11, n.10, Oct, p.458-64. 1988.

Snyder, E. M., B. D. Philpot, *et al.* Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. Nat Neurosci, v.4, n.11, Nov, p.1079-85. 2001.

Stromberg, I., H. Bjorklund, *et al.* Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. Brain Res Bull, v.17, n.2, Aug, p.225-36. 1986.

Teichberg, V. I. Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. Faseb J, v.5, n.15, Dec, p.3086-91. 1991.

Toyoshima, T., S. Yamagami, *et al.* Expression of calbindin-D28K by reactive astrocytes in gerbil hippocampus after ischaemia. Neuroreport, v.7, n.13, Sep 2, p.2087-91. 1996.

Van Eldik, L. J. e D. B., Zimmer. Secietion of S-100 from rat C6 glioma cells. Brain Res, v.436, n.2, Dec 15, p.367-70. 1987.

Vanderklisch, P. W. e G. M. Edelman. Dendritic spines elongate after stimulation of group 1 metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.3, Feb 5, p.1639-44. 2002.

Wasserman, R. H. e A. N. Taylor. Physiological significance of the vitamin D-dependent calcium-binding protein. Triangle, v.12, n.3, p.119-27. 1973.

Wernig, A., S. Muller, *et al.* Laufband therapy based on 'rules of spinal locomotion' is effective in spinal cord injured persons. Eur J Neurosci, v.7, n.4, Apr 1, p.823-9. 1995.

Winningham-Major, F., J. L., Staecker, *et al.* Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. J Cell Biol, v.109, n.6pt1, Dec, p.3063-71. 1989.

Xiao, M. Y., Q. Zhou, *et al.* Metabotropic glutamate receptor activation causes a rapid redistribution of AMPA receptors. Neuropharmacology, v.41, n.6, Nov, p.664-71. 2001.

Xiong, Z., D. O'hanlon, *et al.* Enhanced calcium transients in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. Exp Cell Res, v.257, n.2, Jun 15, p.281-9. 2000.

Yenari, M. A., M. Minami, *et al.* Calbindin d28k overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. Stroke, v.32, n.4, Apr, p.1028-35. 2001.

Yeung, L. C., G. C. Castellani, *et al.* Analysis of the intraspinal calcium dynamics and its implications for the plasticity of spiking neurons. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, v.69, n.1 Pt 1, Jan, p.011907. 2004.

Ying, Z., Roy R. R., Edgerton, R., *et al.* Voluntary exercise increases neurotrophin-3 and its receptor TrkC in the spinal cord. Brain Res. 987, p. 93-99. 2003.

Ying, Z., Roy R. R., Edgerton, R., *et al.* Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. Experimental Neurology. 193, p. 411-419. 2005.

Zimmer, D. B., E. H. Cornwall, *et al.* The S100 protein family: history, function, and expression. Brain Res Bull, v.37, n.4, p.417-29. 1995.