

Enriquecimento ambiental como estratégia para promover a neurogênese na doença de Alzheimer: possível participação da fosfolipase A₂

Environmental enrichment as strategy to promote neurogenesis in Alzheimer disease: possible participation of phospholipase A₂

EVELIN L. SCHAEFFER¹

¹ Pesquisadora no Laboratório de Neurociências (LIM-27) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-HC-FMUSP), doutora em Fisiopatologia Experimental pela FMUSP, São Paulo, SP.

Recebido: 15/4/2009 – Aceito: 20/7/2009

Resumo

Contexto: Com a descoberta de que a neurogênese constitutiva persiste no cérebro adulto, surgiu a hipótese na literatura de que a doença de Alzheimer (DA) poderia ser superada, ou pelo menos melhorada, visto que a geração de novos neurônios poderia ajudar a compensar a perda de neurônios na doença. **Objetivos:** Neste trabalho, foi revisada a literatura sobre a neurogênese endógena no cérebro de sujeitos com DA e modelos animais de DA, os efeitos de atividade cognitiva sobre a neurogênese, e a relação entre a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) e a neurogênese. **Métodos:** A base de dados MedLine foi pesquisada utilizando as palavras-chave doença de Alzheimer, atividade cognitiva, fosfolipase A₂, neurogênese e neuritogênese. **Resultados:** A revisão da literatura evidenciou neuroproliferação aumentada no cérebro com DA, no entanto, os novos neurônios falham em se diferenciar em neurônios maduros. Uma estratégia não farmacológica, ambiente enriquecido, aumenta a neurogênese (incluindo amadurecimento neuronal) em animais experimentais. Relação entre PLA₂ e neurogênese tem sido demonstrada em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. **Conclusão:** Os dados indicam que o enriquecimento ambiental (com estimulações cognitivas e físicas) poderia ser uma estratégia apropriada para promover a neurogênese endógena na DA e sugerem a participação da PLA₂ na neurogênese promovida por estimulação cognitiva.

Schaeffer EL / Rev Psiq Clín. 2010;37(2):73-80

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, atividade cognitiva, fosfolipase A₂, neurogênese e neuritogênese.

Abstract

Background: With the discovery that constitutive neurogenesis persists in the adult brain, has emerged the hypothesis in the literature that Alzheimer disease (AD) could be overcome, or at least ameliorated, since the generation of new neurons might help to compensate for the loss of neurons in the disease. **Objectives:** In this work the literature on endogenous neurogenesis in the brain of subjects with AD and animal models of AD, the effects of cognitive activity on neurogenesis, and the relationship between the enzyme phospholipase A₂ (PLA₂) and neurogenesis was reviewed. **Methods:** MedLine database was searched using the keywords Alzheimer disease, cognitive activity, phospholipase A₂, neurogenesis, and neuritogenesis. **Results:** The literature review evidenced increased neuroproliferation in AD brain, however, the new neurons fail to differentiate into mature neurons. A non-pharmacological strategy, enriched environment, increases neurogenesis (including neuronal maturation) in experimental animals. Relationship between PLA₂ and neurogenesis has been demonstrated in *in vitro* and *in vivo* experimental models. **Discussion:** The data indicate that environmental enrichment (with cognitive and physical stimulations) might be a suitable strategy to promote endogenous neurogenesis in AD, and suggest the participation of PLA₂ in the neurogenesis promoted by cognitive stimulation.

Schaeffer EL / Rev Psiq Clín. 2010;37(2):73-80

Keywords: Alzheimer disease, cognitive activity, phospholipase A₂, neurogenesis, neuritogenesis.

Introdução

A suposição secular de que novas células nervosas não se originam após o desenvolvimento embrionário foi suplantada com a descoberta de duas áreas privilegiadas do cérebro de mamíferos adultos (roedores, macacos e humanos) onde a neurogênese, o nascimento de novos neurônios, ocorre constitutivamente: (a) a zona subgranular (*subgranular zone*; SGZ) do giro dentado do hipocampo e (b) a zona subventricular (*subventricular zone*; SVZ) dos ventrículos laterais¹. O processo de neurogênese adulta compreende a proliferação de células-tronco e progenitoras neurais residentes e sua subsequente migração, diferenciação em neurônios maduros e integração funcional na rede neuronal preexistente. Assim, a partir das duas zonas neurogênicas, os novos neurônios migram em direção a seus alvos finais em outras áreas cerebrais onde se diferenciam e integram aos circuitos locais². Novos neurônios deixando a SGZ migram para a camada celular granular (*granule cell layer*; GCL) adjacente do giro dentado^{3,4}. Neurônios que se originam na SVZ migram para o bulbo olfatório⁵⁻⁷. Novos neurônios residindo na SVZ também entram no

neocórtex de associação (córtices pré-frontal, temporal inferior e parietal posterior)⁸, estriado⁶, córtex piriforme⁹, amígdala e córtex entorrinal lateral¹⁰. Tem sido relatado que a neurogênese ocorre em outras áreas do cérebro adulto, tais como neocórtex^{11,12}, sub-regiões CA do hipocampo (CA1, CA2-3)¹³, amígdala, córtex piriforme¹², substância negra¹⁴ e III ventrículo¹⁵, mas esses dados têm sido fonte de debates e controvérsias e ainda precisam ser confirmados.

A doença de Alzheimer (DA), a causa mais comum de demência, é caracterizada pela presença no cérebro de placas senis extracelulares contendo peptídeo β-amiloide (Aβ) derivado da proteína precursora de amiloide (APP), e de emaranhados neurofibrilares intracelulares contendo proteína Tau hiperfosforilada. Essas alterações induzem disfunção e degeneração neuronal progressivas, resultando em atrofia cerebral grave e déficits cognitivos^{16,17}. A neurodegeneração na DA ocorre no giro dentado e na sub-região CA1 do hipocampo, no córtex entorrinal¹⁸⁻²⁶ e no neocórtex de associação (córtex parietotemporal, córtex temporal inferolateral, córtex pré-frontal)²⁷⁻³² mesmo em estágios iniciais. Com a descoberta de que a neurogênese constitutiva persiste no cérebro de mamíferos adultos, incluindo regiões cerebrais

afetadas pela DA, surgiu a hipótese na literatura de que a DA poderia ser superada, ou pelo menos melhorada, uma vez que a geração de novos neurônios poderia ajudar a compensar a perda de neurônios na doença. Em vista dessa hipótese, os principais objetivos deste trabalho foram revisar a literatura sobre a ocorrência de neurogênese endógena no cérebro de sujeitos com DA e modelos animais de DA, bem como os efeitos de atividade cognitiva sobre a neurogênese em animais experimentais. Esse segundo objetivo se baseia em estudos mostrando que treinamento cognitivo tem sido realizado clinicamente e tem sido eficaz na melhora da função de memória em sujeitos idosos com comprometimento cognitivo leve³³⁻³⁵ e DA inicial³⁶⁻³⁸. Com base em estudos recentes de nosso laboratório mostrando que treinamento de memória aumenta a atividade da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) em animais experimentais^{39,40} e sujeitos idosos saudáveis⁴¹, um terceiro objetivo deste trabalho foi revisar a literatura sobre a relação entre a PLA₂ e a neurogênese.

Métodos

A base de dados MedLine foi pesquisada sem restrições de data para todos os artigos publicados escritos em inglês utilizando as palavras-chave doença de Alzheimer, atividade cognitiva, fosfolipase A₂, neurogênese e neuritogênese. Somente artigos relacionados aos objetivos desta revisão que foram identificados por meio da pesquisa na MedLine foram incluídos. As listas de referências dos artigos identificados foram examinadas para selecionar estudos adicionais de interesse.

Resultados

Neurogênese endógena na doença de Alzheimer

Neurogênese adulta no tecido cerebral danificado de sujeitos com DA tem se tornado foco de interesse e diversos estudos têm sido conduzidos em ambos, tecido cerebral humano *postmortem* e modelos animais experimentais. Diversos estudos recentes têm fornecido evidência de que a neurogênese endógena pode estar ativa no cérebro de sujeitos com DA. Por exemplo, expressão aumentada da proteína Ki-67, um marcador de proliferação celular, foi encontrada em núcleos de neurônios do hipocampo (todas as sub-regiões juntas) de sujeitos com DA senil⁴². Além disso, expressão aumentada de marcadores de neurônios imaturos, tais como *doublecortin* (DCX) e TUC-4, foi relatada no hipocampo de sujeitos com DA senil. Mais especificamente, expressão aumentada de DCX e TUC-4 se associou com neurônios na SGZ e na GCL; DCX se colocou com a molécula de adesão celular neuronal polissialilada (PSA-NCAM), uma glicoproteína da membrana plasmática expressada por progenitores neurais e por neurônios e astrócitos em diferenciação em resposta a insultos tóxicos. Expressão aumentada de DCX também se associou com neurônios na sub-região CA1 do hipocampo. Um aumento da proteína fator de diferenciação neurogênica (NeuroD), um marcador da diferenciação neuronal terminal, também foi encontrado no hipocampo com DA, mas em extensão menor. Ao contrário, nenhum aumento da expressão da proteína calbindina e da proteína nuclear específica de neurônios (NeuN), marcadores de neurônios maduros, foi observado no hipocampo⁴³. Essa falta de aumento dos marcadores de neurônios maduros no hipocampo com DA tem sido recentemente confirmada por Li *et al.*⁴⁴, os quais relataram uma diminuição dramática da expressão da proteína associada aos microtúbulos (MAP), um marcador de neurônios maduros, mais especificamente das isoformas MAP2a e MAP2b, no giro denteado de sujeitos com DA senil. Em outro estudo, expressão aumentada de Ki-67 foi observada em núcleos neuronais do córtex entorrinal, e expressão aumentada da proteína de manutenção de minicromossomas 2 (MCM2), um marcador de replicação cromossomal, foi vista em núcleos de neurônios do córtex temporal medial de sujeitos com DA senil⁴⁵.

Atividade progenitora na outra principal zona neurogênica, a SVZ, também foi investigada no cérebro de sujeitos com DA senil, utilizando anticorpos para as proteínas Musashi-1 e nestina. Anti-

Musashi-1 reage com células proliferativas, não diferenciadas no sistema nervoso central⁴⁶. A expressão de nestina poderia indicar o começo da diferenciação em direção a células neuronais⁴⁷. Uma diminuição significativa da imunoreatividade para Musashi-1, a qual marcou células pequenas, foi identificada na SVZ de sujeitos com DA. As células marcadas com Musashi-1 mostraram poucos processos neuronais e não tinham as características de astrócitos, sugerindo uma redução de progenitores neurais não diferenciados. Ao contrário, um aumento significativo da imunoreatividade para nestina, a qual marcou predominantemente células grandes, foi identificado na mesma região. As células marcadas com nestina não eram astrócitos, sugerindo que um aumento da atividade progenitora mais cedo no curso da doença resultou em um aumento de progenitores neurais residuais, permanecendo nos estágios intermediários de diferenciação⁴⁸. Dados descritos nesse parágrafo e no anterior são resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Expressão de proteínas marcadoras de proliferação celular e diferenciação em neurônios imaturos e maduros no cérebro de sujeitos com doença de Alzheimer senil

	Proliferação celular	Neurônios imaturos	Neurônios maduros
Hipocampo (todas as sub-regiões juntas)	↑ Ki-67 em núcleos neuronais	~↑ NeuroD	~ calbindina, NeuN
Giro denteado			↓ MAP2a, MAP2b
SGZ		↑ DCX ↑ TUC-4 ↑ PSA-NCAM	
GCL		↑ DCX ↑ TUC-4 ↑ PSA-NCAM	
Sub-região CA1 do hipocampo		↑ DCX	
Córtex entorrinal	↑ Ki-67 em núcleos neuronais		
Córtex temporal medial	↑ MCM2 em núcleos neuronais		
SVZ	↓ Musashi-1	↑ nestina	

SGZ: zona subgranular, GCL: camada celular granular, SVZ: zona subventricular
↓: reduzido, ~: estável, ~↑: levemente aumentado, ↑: aumentado.

Em diversos modelos de DA em camundongos, tem sido demonstrado que a neurogênese e o número de novos neurônios maduros nas sub-regiões hipocampais estão significativamente aumentados em estágio inicial de neurodegeneração (estágio de início de placas de Aβ) e que, embora a neurogênese e a diferenciação dos novos neurônios em um fenótipo maduro estejam ainda significativamente aumentadas em estágio tardio de neurodegeneração (estágio de acúmulo de placas de Aβ), elas estão prejudicadas em comparação com o estágio inicial. Por exemplo, Jin *et al.*⁴⁹ investigaram o efeito da patologia da DA sobre o processo de neurogênese no camundongo transgênico PDGF-APP_{Sw,Ind}, o qual expressa as mutações sueca e indiana do gene APP. Esse camundongo exibe depósitos de Aβ extracelulares e perda sináptica, bem como perda neuronal leve detectáveis a partir dos 6 aos 9 meses de idade. De fato, os pesquisadores encontraram deposição de Aβ ao 1º ano de idade (estágio tardio de neurodegeneração), mas não aos 3 meses (estágio sem neurodegeneração). Em camundongos PDGF-APP_{Sw,Ind} de 3 meses de idade, a proliferação de progenitores neurais (marcações de DCX e *bromodeoxyuridine* [BrdU], um análogo da timidina que se incorpora ao DNA de células mitóticas) estava aumentada ~2 vezes na SGZ. Ao 1º ano de idade, a proliferação em camundongos controles estava reduzida a ~10% dos níveis medidos aos 3 meses, mas o número de progenitores neurais estava ~2 vezes tão alto na SGZ de camundongos PDGF-APP_{Sw,Ind}.

quanto de camundongos controles. Ao 1º ano de idade, mas não aos 3 meses, camundongos PDGF-APP_{Sw,Ind} mostraram proliferação neuronal aumentada na SVZ. Da mesma forma, López-Toledano e Shelanski⁵⁰ relataram que camundongos PDGF-APP_{Sw,Ind} mostram proliferação e diferenciação neuronal aumentadas no hipocampo aos 3 meses de idade, que revertem quando os animais se tornam mais velhos. Eles relataram também que o aumento da diferenciação neuronal se correlacionou com níveis detectáveis de A β oligomérico (uma forma “solúvel” de A β antes de sua deposição em placas), assim concluindo que A β oligomérico induz neurogênese diretamente *in vivo* como tem sido demonstrado *in vitro*⁵¹. Donovan *et al.*⁵² examinaram o processo de neurogênese no camundongo transgênico PDAPP (APP_{Ind}), o qual tem progressão de placas de A β e declínio cognitivo dependentes da idade. Ao 1º ano de idade, esse camundongo tem inúmeras placas de A β ₁₋₄₂ no neocórtex e no hipocampo (SGZ, GCL externa e *hilus*), enquanto aos 2 meses ele é negativo para placas de A β . Em camundongos PDAPP e controles de 2 meses, os pesquisadores encontraram um número similar de células proliferativas (marcação de BrdU) por todo o giro denteado. Ao 1º ano de idade, camundongos PDAPP tiveram proliferação diminuída de neurônios imaturos (marcação de DCX) na SGZ. Ao contrário, camundongos PDAPP tiveram proliferação aumentada de neurônios imaturos na GCL externa. Após 4 semanas, a porcentagem de células que havia se diferenciado em neurônios maduros (marcação de NeuN) na SGZ e na GCL externa juntas foi similar em camundongos PDAPP e controles. Gan *et al.*⁵³ investigaram os efeitos de placas de A β sobre o processo de neurogênese em camundongos bitransgênicos contendo ambos os transgenes, PDGF-APP_{Sw,Ind} e pNes-LacZ, os quais têm início e progressão de placas de A β dependentes da idade no neocórtex e no hipocampo (todas as sub-regiões juntas) em associação com declínio cognitivo. Camundongos bitransgênicos de 2, 8 e 12 meses de idade, correspondendo aos estágios livre de placas de A β , de início de placas e de acúmulo de placas, respectivamente, mostraram um aumento leve de células proliferativas (marcação de BrdU) no estágio livre de placas de A β , um aumento significativo no estágio de início de placas, e uma diminuição no estágio de acúmulo de placas no giro denteado, bem como na SGZ e na GCL externa separadas. Adicionalmente, um aumento leve de neurônios maduros (marcação de NeuN) foi observado no estágio livre de placas de A β e um aumento significativo foi visto nos estágios de início e acúmulo de placas no giro denteado de camundongos bitransgênicos, embora um nível maior tenha sido observado no estágio de início de placas de A β .

Chen *et al.*⁵⁴ também relataram que a neurogênese no giro denteado é dependente do estágio de neurodegeneração. Em camundongos duplo *knockout* para presenilina-1/presenilina-2 (PS1/PS2), os pesquisadores encontraram perda neuronal no córtex cerebral e no giro denteado, mas gravidade maior foi vista no córtex, em ambos os estágios, inicial (7-9 meses de idade) e tardio (18-20 meses de idade) de neurodegeneração. No córtex cerebral, um aumento leve de células proliferativas (marcação de BrdU) foi encontrado em camundongos PS1/PS2 em ambos os estágios de neurodegeneração. No giro denteado, um aumento significativo de células proliferativas

foi detectado em camundongos PS1/PS2 em estágio inicial de neurodegeneração; com o envelhecimento, essa capacidade de proliferação diminuiu, mas um aumento significativo foi ainda observado em comparação com camundongos controles. As células proliferativas no giro denteado mostraram um fenótipo neuronal imaturo (marcação de DCX) em ambos os estágios de neurodegeneração, embora um nível muito maior tenha sido observado em estágio inicial; 2 semanas mais tarde, os novos neurônios se diferenciaram em neurônios maduros (marcação de NeuN) em ambos os estágios, e 4 semanas mais tarde, ~22%-25% dos novos neurônios migraram para a GCL e ~6%-7% para o *hilus* em camundongos PS1/PS2 e controles. No entanto, em estágio inicial de neurodegeneração, o número total de novos neurônios no giro denteado de camundongos PS1/PS2 foi significativamente maior do que em camundongos controles. Finalmente, Zhang *et al.*⁵⁵ examinaram camundongos duplo *knockin* para APP/PS1. Esses camundongos mostraram deposição de A β dependente da região cerebral e da idade com início por volta dos 6 meses (estágio inicial de neurodegeneração) e exibiram ativação microglial associada com placas de A β por volta dos 9 meses (estágio tardio de neurodegeneração). Aos 9 meses de idade, camundongos APP/PS1 mostraram uma redução do número de células progenitoras neurais em três vezes e de neurônios imaturos em duas vezes no giro denteado. Dados descritos nesse parágrafo e no anterior são resumidos na tabela 2.

Treinamento cognitivo como estratégia para promover a neurogênese na doença de Alzheimer

Muitos cientistas ao redor do mundo estão buscando por estratégias para aumentar a neurogênese endógena no cérebro de sujeitos com DA e retardar ou impedir a progressão da doença. Uma medida poderia ser a atividade cognitiva. Nesse sentido, um estudo de coorte prospectivo realizado em uma comunidade do norte de Manhattan, Nova Iorque, com 593 indivíduos não demenciados com 60 anos de idade ou mais, durante um período de 4 anos, mostrou que o risco de demência estava aumentado em sujeitos tanto com baixa escolaridade quanto com baixo tempo de envolvimento ocupacional. O risco foi maior para sujeitos com ambos, baixa escolaridade e baixo tempo de envolvimento ocupacional⁵⁶. Um estudo seccional-cruzado conduzido na população de Rotterdam (Holanda) com 7.528 indivíduos com 55-106 anos de idade, durante um período de 4 anos, demonstrou uma prevalência de demência substancialmente maior em sujeitos com baixo nível educacional. Entre os sujeitos com os dois níveis educacionais mais baixos, significativamente mais demência foi diagnosticada do que entre aqueles com o nível educacional mais alto. Três quartos de todas as demências foram devido à DA. Da mesma forma, para a DA, os dois níveis educacionais mais baixos foram associados com risco relativo de demência aumentado. A tendência de uma prevalência de demência mais alta com menos educação foi altamente significativa. Tendências similares foram observadas para a DA. O risco relativo de demência diminuiu com o aumento do estado educacional⁵⁷.

Tabela 2. Expressão de proteínas marcadoras de proliferação celular e diferenciação em neurônios imaturos e maduros no cérebro de modelos animais de doença de Alzheimer em diferentes estágios de neurodegeneração

	Estágio inicial de neurodegeneração			Estágio tardio de neurodegeneração		
	Proliferação celular	Neurônios imaturos	Neurônios maduros	Proliferação celular	Neurônios imaturos	Neurônios maduros
Giro denteado	↑↑ BrdU	↑↑ DCX	↑↑ NeuN	↑ ou ↓ BrdU	↑ ou ↓ DCX	↑ NeuN
SGZ	↑↑ BrdU			↑ ou ↓ BrdU	↑ ou ↓ DCX	
GCL	↑↑ BrdU			↓ BrdU	↑ DCX	~ NeuN
Córtex cerebral	~↑ BrdU			~↑ BrdU		
SVZ				↑ BrdU	↑ DCX	

SGZ: zona subgranular, GCL: camada celular granular, SVZ: zona subventricular,
↓: reduzido, ~: estável, ~↑: levemente aumentado, ↑: aumentado, ↑↑: muito maior.

Pessoas com nível educacional mais alto têm reserva cognitiva maior. Isso pode ser explicado pelo fato de que níveis educacionais maiores levam a mais engajamento em atividades cognitivamente estimuladoras, e reserva cognitiva pode se basear em nível educacional e envolvimento ocupacional aumentados⁵⁸. O termo reserva cognitiva é algumas vezes utilizado para se referir diretamente ao tamanho do cérebro ou à densidade sináptica no córtex. Em outros momentos, reserva cognitiva é definida como a habilidade para compensar uma patologia cerebral adquirida⁵⁹. Em um estudo conduzido por Katzman *et al.*⁵⁸, foi realizado exame *postmortem* em 137 residentes (idade média de 85,5 anos) de uma moradia para enfermeiras especializadas cujos estado mental, memória e estado funcional foram avaliados ao longo da vida. Os pesquisadores encontraram que 10 sujeitos, cujos desempenhos funcional e cognitivo foram tão bons quanto ou melhores do que os desempenhos do quinto superior de residentes sem patologia cerebral (sujeitos controles), mostraram os aspectos patológicos de DA leve, com muitas placas de A β neocorticais. As contagens de placas foram 80% daquelas de sujeitos com DA grave, enquanto os níveis de colina acetiltransferase (marcador de neurônios colinérgicos) foram intermediários entre controles e sujeitos com DA. Os achados inesperados nesses sujeitos foram pesos cerebrais mais altos e número maior de neurônios no córtex cerebral em comparação com sujeitos controles. Os pesquisadores concluíram que esses indivíduos podem ter tido DA incipiente, mas escaparam da perda de grande número de neurônios ou, alternativamente, começaram com cérebros maiores e mais neurônios e assim poder-se-ia dizer que têm tido uma reserva maior. De acordo com isso, um estudo de coorte prospectivo conduzido em uma comunidade do norte de Manhattan, Nova Iorque, com 1.772 indivíduos não demenciados com 65 anos de idade ou mais, por até 7 anos (média de 2,9 anos), mostrou que o risco de demência estava diminuído em sujeitos com engajamento alto em atividades de lazer. Os pesquisadores concluíram que tal engajamento pode reduzir o risco de demência possivelmente ao fornecer uma reserva que retarda o início das manifestações clínicas da doença⁶⁰. Um estudo de coorte longitudinal realizado nos Estados Unidos com 801 freiras, padres e irmãos católicos idosos sem demência, durante um seguimento médio de 4,5 anos, sugeriu que a participação frequente em atividades cognitivamente estimuladoras (assistir à televisão, ouvir música, ler jornais, revistas e livros, jogar cartas, xadrez, palavras-cruzadas e quebra-cabeças, e ir a museus) na velhice está associada com um risco reduzido de DA⁶¹.

Diversos estudos em animais de laboratório têm mostrado um aumento no processo de neurogênese no hipocampo em resposta a estímulos fisiológicos, tais como aprendizagem e memória. Por exemplo, exposição a um ambiente enriquecido com oportunidades para interação social, exploração e atividade física aumentou a proliferação celular, a sobrevivência de novos neurônios e o número de neurônios maduros no giro denteado de camundongos adultos^{62,63}. Estimulação ambiental também aumentou a sobrevivência de novos neurônios no giro denteado de ratos adultos⁶⁴ e camundongos velhos⁶⁵. Adicionalmente, ratos adultos mantidos em um ambiente enriquecido mostraram desempenho melhorado em uma tarefa de aprendizagem espacial⁶⁴. O treinamento em tarefas de aprendizagem associativa que requerem o hipocampo aumentou a sobrevivência de novos neurô-

nios imaturos no giro denteado de ratos adultos^{66,67}. O treinamento em uma tarefa de aprendizagem espacial dependente do hipocampo (labirinto aquático de Morris) também aumentou a sobrevivência de novos neurônios imaturos no giro denteado de ratos adultos⁶⁸⁻⁷⁰. Além disso, camundongos transgênicos APP23 (um modelo de DA) com 10 semanas de idade, submetidos à exposição de longa duração (1 mês) a um ambiente enriquecido, mostraram – apesar do acúmulo estável de placas de A β – desempenho aumentado no labirinto aquático, número aumentado de novos neurônios imaturos no giro denteado e produção hipocampal aumentada de fatores neurotróficos como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), em comparação com camundongos APP23 vivendo em condições padrão⁷¹. Camundongos APP23 com 18 meses de idade, submetidos a um ambiente enriquecido ou exercício físico, mostraram – apesar do acúmulo estável de placas de A β – razão A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ hipocampal reduzida quando comparados com animais submetidos a condições padrão. Nessa idade, ambos, enriquecimento ambiental e exercício físico, aumentaram o número de células granulares imaturas no giro denteado de camundongos APP23 quando comparados com animais em condições padrão. Enriquecimento ambiental aumentou o número de neurônios imaturos mais do que exercício físico, indicativo de um potencial aumentado para recrutar mais neurônios novos e sugestivo de que enriquecimento ambiental poderia contribuir para uma “reserva neurogênica” apesar do acúmulo estável de placas de A β ⁷². Finalmente, um estudo recente conduzido por Herring *et al.*⁷³ em camundongos transgênicos com patologia da DA (TgCRND8) mostrou que enriquecimento ambiental com ambas as estimulações, cognitiva e física, aumenta o número de novos neurônios maduros no hipocampo. Dados descritos nesse parágrafo são resumidos na tabela 3.

Possível participação da fosfolipase A₂ na neurogênese promovida por treinamento cognitivo

Estudos de neurobiologia têm mostrado mudanças em sujeitos idosos sadios com níveis mais altos de atividade cognitiva. Em um estudo recente conduzido em nosso laboratório, investigamos o efeito de treinamento cognitivo na atividade da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) em plaquetas de sujeitos idosos sadios⁴¹. A PLA₂ é uma família de enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem de ácidos graxos da posição *sn*-2 de glicerofosfolídeos de membranas para gerar ácidos graxos livres (geralmente ácido araquidônico) e lisofosfolídeos (principalmente lisofosfatidilcolina), os quais são mediadores importantes na transdução de sinais^{74,75}. A família de enzimas PLA₂ é classificada em três grupos principais: (a) PLA₂ extracelular ou secretada dependente de cálcio (sPLA₂), (b) PLA₂ citosólica dependente de cálcio (cPLA₂) e (c) PLA₂ intracelular independente de cálcio (iPLA₂)⁷⁶. Plaquetas são utilizadas frequentemente como marcadores biológicos para neurônios porque eles compartilham algumas propriedades de membrana e receptores⁷⁷. Estudos anteriores de nosso laboratório mostraram atividade reduzida da PLA₂ nos córtices parietal e frontal *postmortem* de sujeitos com DA, a qual se correlacionou com a gravidade da demência e a densidade de placas senis e emaranhados neurofibrilares⁷⁸⁻⁸⁰. Além disso, encontramos atividade diminuída da

Tabela 3. Efeitos benéficos de ambiente enriquecido, de metabólitos da PLA₂ e de vias de sinalização relacionadas à PLA₂ sobre a neurogênese em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*

Ambiente enriquecido	Ácido araquidônico	Lisofosfatidilcolina	5-lipoxigenase	Ciclo-oxigenase-2	Prostaglandina E2
↑ proliferação celular			↑ proliferação de NPCs	↑ proliferação de NPCs	↑ proliferação celular
↑ neurônios imaturos					↑ neurônios imaturos
↑ sobrevivência de NPCs	↑ sobrevivência neuronal	↑ sobrevivência neuronal			
	↑ extensão de neuritos	↑ extensão de neuritos			↑ extensão de neuritos
↑ neurônios maduros					↑ neurônios maduros
↑ aprendizagem e memória					

NPCs = células progenitoras neurais.

↑: aumentado.

PLA₂ em plaquetas de pacientes com DA⁷⁹. Os achados no cérebro foram confirmados por Ross *et al.*⁸¹, os quais relataram atividades reduzidas da cPLA₂ e da iPLA₂ nos córtices parietal e temporal *postmortem* de sujeitos com DA, bem como atividade diminuída da cPLA₂ no hipocampo. Atividade diminuída da iPLA₂ também foi encontrada no córtex pré-frontal *postmortem* de sujeitos com variante frontal da DA⁸². Mais recentemente, observamos que atividade mais baixa da iPLA₂ em plaquetas se correlacionou com a gravidade do declínio cognitivo, em amostras de pacientes com comprometimento cognitivo leve e DA⁸³.

No estudo de Talib *et al.*⁴¹, 32 sujeitos idosos sem prejuízo cognitivo foram submetidos randomicamente a treinamento de memória ou somente cuidado padrão. Ambos os grupos foram avaliados cognitivamente pelo mesmo protocolo, e o grupo experimental foi submetido a uma intervenção de treinamento de memória de quatro sessões. Após 1 mês, os sujeitos no grupo experimental tiveram atividades significativamente aumentadas da cPLA₂, da sPLA₂ e da PLA₂ total, e atividade significativamente diminuída da iPLA₂, em plaquetas. Adicionalmente, estudos de nosso laboratório em animais experimentais mostraram que o treinamento de ratos em uma tarefa de memória contextual (esquiva inibitória de descida da plataforma) aumentou a atividade da PLA₂ na sub-região CA1 do hipocampo e nos córtices frontal e parietal *postmortem*^{39,40}. Em um estudo de espectroscopia por ressonância magnética (MRS), Valenzuela *et al.*⁸⁴ relataram uma elevação dos sinais de colina e creatina no hipocampo de idosos saudáveis após cinco semanas de treinamento de memória. Aqueles em risco para disfunção neuronal, como indicado por neurometabólitos mais baixos na avaliação inicial, demonstraram os maiores aumentos na MRS após o treinamento. Os pesquisadores concluíram que tais mudanças poderiam ser um marcador de plasticidade neuronal aumentada nesses indivíduos. É interessante notar que o sinal de colina é constituído de metabólitos da fosfatidilcolina (principal substrato da PLA₂), especialmente glicerofosfolina, fosfocolina e colina livre⁸⁵. Treinamento cognitivo também tem sido realizado clinicamente e tem sido eficaz na melhora da função de memória em sujeitos idosos com comprometimento cognitivo leve³³⁻³⁵ e DA inicial³⁶⁻³⁸.

A relação entre a PLA₂ bem como entre seus metabólitos (ácido araquidônico e lisofosfatidilcolina) e o crescimento de neuritos tem sido avaliada em diversos modelos de cultura de células. Por exemplo, em culturas de neurônios cerebelares tratadas com o ativador da PLA₂ melitina ou um inibidor não seletivo da PLA₂ ou com ácido araquidônico, foi mostrado o envolvimento do ácido araquidônico em uma via de sinalização intracelular que leva ao crescimento de neuritos^{86,87}. De acordo com isso, o crescimento de neuritos foi estimulado em células NG108-15 híbridas com neuroblastos (precursores neurais) de camundongos/gliomas de ratos superexpressando ciclo-oxigenase-2 (enzima que metaboliza o ácido araquidônico) e mostrando níveis elevados de prostaglandina E₂ (produto do metabolismo do ácido araquidônico pela ciclo-oxigenase-2). Nas células NG108-15, os níveis de Aβ e uma forma secretada de APP também estavam aumentados⁸⁸. Posteriormente, foi relatado que a expressão de sPLA₂ – subtipo sPLA₂-X – em células PC12 de ratos facilitou o crescimento de neuritos, especialmente quando combinada com uma concentração subótima de fator de crescimento neural (NGF). De acordo com isso, a extensão de neuritos de células PC12 induzida por NGF foi atenuada por um anticorpo ou um RNA de interferência para sPLA₂-X. Em células PC12 diferenciadas em neurônios, a sPLA₂-X se localizou preferencialmente no aparelho de Golgi e no cone de crescimento. O efeito neurotrófico da sPLA₂-X foi mediado pela produção de lisofosfatidilcolina^{89,90}. Além disso, foi demonstrado que a sPLA₂-X protegeu neurônios granulares cerebelares em cultura contra apoptose; esse efeito neurotrófico, promotor de sobrevivência, se correlacionou com a extensão da liberação de ácido araquidônico induzida pela sPLA₂-X⁹¹. Em um estudo recente, Masuda *et al.*⁹² demonstraram que a expressão de sPLA₂ – subtipo sPLA₂-III – em células PC12 facilitou o crescimento de neuritos, enquanto a expressão de um mutante da sPLA₂-III cataliticamente inativo ou o uso de

um RNA de interferência para sPLA₂-III reduziram a neuritogênese induzida por NGF. A sPLA₂-III também controlou a morte neuronal induzida por privação de NGF; esses efeitos neurotrófico e neurotrófico foram mediados pela formação de lisofosfatidilcolina. Ambas, cPLA₂ e iPLA₂, podem desempenhar um papel no crescimento e diferenciação de neuritos, como sugerido inicialmente pelo estudo de Smalheiser *et al.*⁹³, em que o ácido araquidônico aumentou a neuritogênese em culturas de células NG108-15, enquanto a administração de um inibidor dual da cPLA₂ e da iPLA₂ retardou o crescimento de neuritos. Em um estudo recente conduzido em nosso laboratório, investigamos os efeitos do tratamento crônico de culturas primárias de neurônios de ratos com um inibidor dual da cPLA₂ e da iPLA₂ ou um inibidor seletivo da iPLA₂, e demonstramos que a inibição inicial e sustentada da PLA₂ impediu o desenvolvimento *in vitro* de neurônios corticais e hipocámpais primários. Além disso, a inibição da PLA₂ prejudicou a viabilidade de ambos os neurônios, imaturos e maduros, afetando a morfologia de seus neuritos⁹⁴.

Finalmente, a relação entre enzimas que metabolizam o ácido araquidônico – 5-lipoxigenase e ciclo-oxigenase-2 – bem como entre o metabólito prostaglandina E₂ e a neurogênese (o nascimento de novos neurônios) tem sido investigada em culturas de neurônios e/ou cérebro adulto. Por exemplo, em culturas primárias de neurônios granulares cerebelares de ratos e culturas de neuroblastos humanos (células NT2) expressando 5-lipoxigenase, foi observada proliferação dos neurônios imaturos, a qual foi reduzida pelo tratamento com inibidores da 5-lipoxigenase^{95,96}. O envolvimento da ciclo-oxigenase-2 e da prostaglandina E₂ na neurogênese tem sido descrito no cérebro de roedores adultos. Inicialmente, foi relatado que a infusão de um análogo da prostaglandina E₂ no hipocampo de ratos adultos aumentou a proliferação celular na SGZ; as células proliferativas também expressaram o marcador de diferenciação celular PSA-NCAM e o marcador de neurônios maduros NeuN⁹⁷. Posteriormente, foi observado que o tratamento de camundongos adultos com inibidores da ciclo-oxigenase-2 mascarou o aumento da proliferação de progenitores neurais no giro denteado induzido por isquemia cerebral global. Adicionalmente, camundongos *knockout* para ciclo-oxigenase-2 mostraram número significativamente menor de células proliferativas no giro denteado pós-isquêmico do que animais selvagens⁹⁸. Dados descritos nesse parágrafo e no anterior são resumidos na tabela 3.

Discussão

Os achados sobre a expressão de proteínas marcadoras de proliferação celular e diferenciação em neurônios imaturos e maduros no cérebro de sujeitos com DA senil (resumidos na tabela 1) revelam claramente uma estabilidade ou diminuição da expressão de marcadores de neurônios maduros, embora a expressão de marcadores de proliferação celular e neurônios imaturos esteja aumentada em inúmeras regiões cerebrais (hipocampo [todas as sub-regiões analisadas juntas], SGZ e GCL do giro denteado, sub-região CA1 do hipocampo, córtex entorrinal, córtex temporal medial e SVZ)⁴²⁻⁴⁸. Esses dados indicam que novos neurônios derivados da SGZ e da SVZ no cérebro com DA senil falham em se diferenciar em neurônios maduros nas regiões alvo dessas zonas neurogênicas no cérebro adulto, a saber a GCL do giro denteado^{3,4}, o neocórtex (no caso da DA, córtex temporal medial)⁸, o córtex entorrinal¹⁰ e talvez a sub-região CA1 do hipocampo¹³, embora a diferenciação em neurônios imaturos esteja aumentada. Quanto à dúvida sobre a sub-região CA1 ser alvo de alguma zona neurogênica no adulto, é interessante notar que o achado de um número aumentado de novos neurônios imaturos na sub-região CA1 do hipocampo na DA senil⁴³ é sustentado pelo achado de que há células progenitoras neurais mitoticamente ativas nas sub-regiões CA1 e CA2-3 do hipocampo de camundongos adultos¹³. Jin *et al.*⁴³ discutem que a sub-região CA1 do hipocampo também parece ser o destino de novos neurônios gerados no adulto, no entanto, essa suposição ainda precisa ser confirmada. Vale dizer aqui que desde estágios iniciais da DA ocorre perda neuronal no giro denteado e na sub-região CA1 do

hipocampo, no córtex entorrinal¹⁸⁻²⁶ e no neocórtex (córtex parietotemporal, córtex temporal inferolateral, córtex pré-frontal)²⁷⁻³², as mesmas regiões onde têm sido observados novos neurônios gerados no adulto. Portanto, como a capacidade de reparo da neurogênese endógena na DA senil é limitada, medidas destinadas a estimular o amadurecimento de novos neurônios poderiam constituir novas estratégias terapêuticas para promover a recuperação da circuitaria neuronal no cérebro danificado de sujeitos com DA.

É importante notar que os achados sobre a expressão de proteínas marcadoras de proliferação celular e diferenciação em neurônios imaturos e maduros no cérebro de modelos de DA em camundongos (resumidos na tabela 2) demonstram claramente que a proliferação celular e a diferenciação neuronal no hipocampo são muito maiores em estágio inicial de neurodegeneração do que em estágio tardio de neurodegeneração^{49,50,52-55}. Além disso, ao contrário de cérebros com DA senil (estágio tardio de neurodegeneração) onde um número estável ou diminuído de neurônios maduros foi descrito no hipocampo (Tabela 1), em modelos de DA em camundongos o número de neurônios maduros no hipocampo em estágio tardio de neurodegeneração foi encontrado estável ou aumentado (Tabela 2). Considerando o achado em modelos de DA em camundongos de que a patologia do A β é mais deletéria em estágio tardio (acúmulo de placas de A β) do que em estágio inicial de neurodegeneração (início de placas de A β)^{49,50,52-55}, hipotetiza-se que talvez o tempo maior que o cérebro de sujeitos com DA senil é exposto a depósitos de placas de A β neurotóxicas ao longo do curso da doença tenha efeitos muito mais devastadores sobre a diferenciação neuronal do que o tempo mais curto que o cérebro de modelos de DA em camundongos é exposto à patologia do A β . Em conjunto, os dados sugerem que estimular a neurogênese e o amadurecimento neuronal em estágios iniciais da DA poderia ter maior potencial terapêutico para retardar ou impedir o progresso da neurodegeneração.

Muitos cientistas ao redor do mundo estão buscando por estratégias para estimular o processo de neurogênese (incluindo amadurecimento de novos neurônios) no cérebro de sujeitos com DA e retardar ou impedir a progressão da doença. Uma estratégia poderia ser atividade cognitiva. Os estudos têm mostrado que atividade cognitiva aumentada ao longo da vida em indivíduos com nível educacional e envolvimento ocupacional maiores reduz o risco de DA^{56,57}. Engajamento alto em atividades de lazer na velhice, principalmente atividades cognitivamente estimuladoras, também está associado com um risco reduzido de DA^{60,61}. Tem sido hipotetizado na literatura que esses indivíduos poderiam ter uma reserva cognitiva maior⁵⁸, que é algumas vezes relacionada diretamente ao tamanho do cérebro ou à densidade sináptica no córtex cerebral, e outras vezes à habilidade para compensar a patologia cerebral adquirida⁵⁹. De acordo com essa hipótese de plasticidade neuronal aumentada em sujeitos com nível educacional e envolvimento ocupacional maiores, diversos estudos em animais selvagens e modelos animais de DA adultos têm mostrado que a exposição a um ambiente enriquecido com oportunidades para ambas as atividades, cognitiva e física, aumenta a proliferação e sobrevivência de células-tronco neurais e promove o amadurecimento dos novos neurônios no hipocampo, além de melhorar o desempenho em tarefas de aprendizagem e memória (Tabela 3)^{62,63,72-73}. Em conjunto, os dados sustentam o uso de enriquecimento ambiental como abordagem capaz de contribuir para a prevenção de déficits cognitivos em sujeitos idosos saudáveis e a recuperação da circuitaria neuronal no cérebro danificado de sujeitos com DA e melhora da função cognitiva, pelo menos em estágio inicial. Faltam estudos na literatura examinando os efeitos de enriquecimento ambiental sobre o processo de neurogênese (incluindo amadurecimento neuronal) em outras regiões cerebrais afetadas pela DA além do hipocampo, tais como córtex entorrinal e neocórtex, em animais adultos, incluindo modelos animais de DA. Também faltam estudos investigando os efeitos de estimulação cognitiva separada no amadurecimento de novos neurônios gerados em animais adultos, incluindo modelos animais de DA.

Com base em achados mostrando que treinamento de memória aumenta a atividade da PLA₂ no tecido cerebral de animais experimentais^{39,40} e em plaquetas de sujeitos idosos saudáveis⁴¹, aumenta

o sinal de colina (constituído de metabólitos da fosfatidilcolina, principal substrato da PLA₂) no cérebro de idosos saudáveis⁸⁴ e melhora a função de memória em sujeitos idosos com comprometimento cognitivo leve³³⁻³⁵ e DA inicial³⁶⁻³⁸, hipotetiza-se que o treinamento de memória pode ter um efeito facilitador mediado pela PLA₂ em sistemas biológicos (por exemplo, neurogênese) associados com funções cognitivas tanto em sujeitos idosos saudáveis como no contexto da patologia da DA. De fato, inúmeros estudos em modelos experimentais *in vitro* sugerem a contribuição potencial de enzimas PLA₂ e seus metabólitos ácido araquidônico e lisofosfatidilcolina para a neurogênese, incluindo sobrevivência e diferenciação neuronal em ambos, processo neurodesenvolvimental e resposta a dano neuronal (Tabela 3)⁸⁶⁻⁹⁴. Além disso, estudos em modelos experimentais *in vitro* sugerem que a via de metabolismo do ácido araquidônico pela 5-lipoxigenase desempenha um papel crucial na proliferação de progenitores neurais, pelo menos durante o processo neurodesenvolvimental^{95,96}, e estudos em modelos animais *in vivo* sugerem que a via de metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenase-2 desempenha um papel importante na proliferação de progenitores neurais em ambos, animais selvagens e modelos animais de neurodegeneração adultos, e na diferenciação em neurônios imaturos e maduros, pelo menos em animais selvagens adultos (Tabela 3)^{97,98}. Estudos adicionais são necessários para investigar a relação direta entre a PLA₂ (ou seus metabólitos) e o processo de neurogênese em animais adultos, incluindo modelos animais de DA.

Conclusão

Os dados indicam que a intervenção não farmacológica como enriquecimento ambiental com uma combinação de estimulações cognitivas e físicas poderia ser uma estratégia apropriada para promover a neurogênese endógena (incluindo amadurecimento neuronal) e melhorar a função cognitiva na DA, especialmente em estágio inicial. Os dados também sugerem a participação da PLA₂ na neurogênese (incluindo amadurecimento neuronal) promovida por estimulação cognitiva.

Referências

1. Yamashita T, Tonchev AB, Yukie M. Adult hippocampal neurogenesis in rodents and primates: endogenous, enhanced, and engrafted. *Rev Neurosci*. 2007;18:67-82.
2. Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2008;331:243-50.
3. Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*. 1990;301:365-81.
4. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996;16:2027-33.
5. Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol*. 2001;172:1-16.
6. Bédard A, Parent A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004;151:159-68.
7. Shapiro EM, Gonzalez-Perez O, Manuel García-Verdugo J, Alvarez-Buylla A, Koretsky AP. Magnetic resonance imaging of the migration of neuronal precursors generated in the adult rodent brain. *Neuroimage*. 2006;32:1150-7.
8. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. 1999a;286:548-52.
9. Shapiro LA, Ng KL, Kinyamu R, Whitaker-Azmitia P, Geisert EE, Blurton-Jones M, et al. Origin, migration and fate of newly generated neurons in the adult rodent piriform cortex. *Brain Struct Funct*. 2007;212:133-48.
10. Shapiro LA, Ng K, Zhou QY, Ribak CE. Subventricular zone-derived, newly generated neurons populate several olfactory and limbic forebrain regions. *Epilepsy Behav*. 2009;14(Suppl 1):74-80.
11. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci*. 1999;19:8487-97.

12. Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:11464-9.
13. Rietze R, Poulin P, Weiss S. Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. *J Comp Neurol*. 2000;424:397-408.
14. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7925-30.
15. Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, et al. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol*. 2005;192:251-64.
16. Selkoe DJ. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res*. 2003;28:1705-13.
17. Gallucci Neto J, Tamelini MG, Forlenza OV. Diagnóstico diferencial das demências. *Rev Psiq Clín*. 2005;32:119-30.
18. Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1996;16:4491-500.
19. Scheff SW, Price DA. Synaptic density in the inner molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57:1146-53.
20. Csernansky JG, Wang L, Joshi S, Miller JP, Gado M, Kido D, et al. Early DAT is distinguished from aging by high-dimensional mapping of the hippocampus. *Dementia of the Alzheimer type*. *Neurology*. 2000;55:1636-43.
21. Csernansky JG, Wang L, Swank J, Miller JP, Gado M, McKeel D, et al. Preclinical detection of Alzheimer's disease: hippocampal shape and volume predict dementia onset in the elderly. *Neuroimage*. 2005;25:783-92.
22. Kordower JH, Chu Y, Stebbins GT, DeKosky ST, Cochran EJ, Bennett D, et al. Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann Neurol*. 2001;49:202-13.
23. Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC. Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2001;58:1395-402.
24. Kril JJ, Hodges J, Halliday G. Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2004;361:9-12.
25. Von Gunten A, Kövari E, Rivara CB, Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P. Stereologic analysis of hippocampal Alzheimer's disease pathology in the oldest-old: evidence for sparing of the entorhinal cortex and CA1 field. *Exp Neurol*. 2005;193:198-206.
26. Wang L, Miller JP, Gado MH, McKeel DW, Rothermich M, Miller MI, et al. Abnormalities of hippocampal surface structure in very mild dementia of the Alzheimer type. *Neuroimage*. 2006;30:52-60.
27. Schuff N, Amend D, Ezekiel F, Steinman SK, Tanabe J, Norman D, et al. Changes of hippocampal N-acetyl aspartate and volume in Alzheimer's disease. A proton MR spectroscopic imaging and MRI study. *Neurology*. 1997;49:1513-21.
28. Jessen F, Block W, Traber F, Keller E, Flacke S, Papassotiropoulos A, et al. Proton MR spectroscopy detects a relative decrease of N-acetylaspartate in the medial temporal lobe of patients with AD. *Neurology*. 2000;55:684-8.
29. Kantarci K, Jack CR Jr, Xu YC, Campeau NG, O'Brien PC, Smith GE, et al. Regional metabolic patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a 1H MRS study. *Neurology*. 2000;55:210-7.
30. Kantarci K, Reynolds G, Petersen RC, Boeve BF, Knopman DS, Edland SD, et al. Proton MR spectroscopy in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: comparison of 1.5 and 3 T. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003;24:843-9.
31. Block W, Jessen F, Traber F, Flacke S, Manka C, Lamerichs R, et al. Regional N-acetylaspartate reduction in the hippocampus detected with fast proton magnetic resonance spectroscopic imaging in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2002;59:828-34.
32. Chantal S, Labelle M, Bouchard RW, Braun CM, Boulanger Y. Correlation of regional proton magnetic resonance spectroscopic metabolic changes with cognitive deficits in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2002;59:955-62.
33. Rapp S, Brenes G, Marsh AP. Memory enhancement training for older adults with mild cognitive impairment: a preliminary study. *Aging Ment Health*. 2002;6:5-11.
34. Belleville S, Gilbert B, Fontaine F, Gagnon L, Ménard E, Gauthier S. Improvement of episodic memory in persons with mild cognitive impairment and healthy older adults: evidence from a cognitive intervention program. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;22:486-99.
35. Wenisch E, Cantegreil-Kallen I, De Rotrou J, Garrigue P, Moulin F, Batouche F, et al. Cognitive stimulation intervention for elders with mild cognitive impairment compared with normal aged subjects: preliminary results. *Aging Clin Exp Res*. 2007;19:316-22.
36. Clare L, Wilson BA, Carter G, Roth I, Hodges JR. Relearning face-name associations in early Alzheimer's disease. *Neuropsychology*. 2002;16:538-47.
37. Abrisqueta-Gomez J, Canali F, Vieira VL, Aguiar AC, Ponce CS, Brucki SM, et al. A longitudinal study of a neuropsychological rehabilitation program in Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62:778-83.
38. Avila R, Bottino CM, Carvalho IA, Santos CB, Seral C, Miotto EC. Neuropsychological rehabilitation of memory deficits and activities of daily living in patients with Alzheimer's disease: a pilot study. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1721-9.
39. Schaeffer EL, Gattaz WF. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 activity in rat hippocampus impairs acquisition of short- and long-term memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;181:392-400.
40. Schaeffer EL, Zorrón Pu L, Gagliotti DA, Gattaz WF. Conditioning training and retrieval increase phospholipase A(2) activity in the cerebral cortex of rats. *J Neural Transm*. 2009;116:41-50.
41. Talib LL, Yassuda MS, Diniz BSO, Forlenza OV, Gattaz WF. Cognitive training increases platelet PLA2 activity in healthy elderly subjects. *Prostaglandins Leukot Essential Fatty Acids*. 2008;78:265-9.
42. Nagy Z, Esiri MM, Smith AD. Expression of cell division markers in the hippocampus in Alzheimer's disease and other neurodegenerative conditions. *Acta Neuropathol*. 1997;93:294-300.
43. Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004a;101:343-7.
44. Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, et al. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008a;67:78-84.
45. Wharton SB, Williams GH, Stoerber K, Gelsthorpe CH, Baxter L, Johnson AL, et al. Expression of Ki67, PCNA and the chromosome replication licensing protein Mcm2 in glial cells of the ageing human hippocampus increases with the burden of Alzheimer-type pathology. *Neurosci Lett*. 2005;383:33-8.
46. Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, et al. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci*. 2000;22:139-53.
47. Li L, Ren L, Qi H, Li F. Multipotential character of nestin-positive cells differentiated from adult mouse pancreatic islets. *Cell Research*. 2008b;18:s156.
48. Ziabreva I, Perry E, Perry R, Minger SL, Ekonomou A, Przyborski S, et al. Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Psychosom Res*. 2006;61:311-6.
49. Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004b;101:13363-7.
50. López-Toledano MA, Shelanski ML. Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind). *J Alzheimers Dis*. 2007;12:229-40.
51. López-Toledano MA, Shelanski ML. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci*. 2004;24:5439-44.
52. Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*. 2006;495:70-83.
53. Gan L, Qiao S, Lan X, Chi L, Luo C, Lien L, et al. Neurogenic responses to amyloid-beta plaques in the brain of Alzheimer's disease-like transgenic (pPDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Neurobiol Dis*. 2008;29:71-80.
54. Chen Q, Nakajima A, Choi SH, Xiong X, Sisodia SS, Tang YP. Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2008;29:316-26.
55. Zhang C, McNeil E, Dressler L, Siman R. Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2007;204:77-87.
56. Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA*. 1994;271:1004-10.

57. Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, et al. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ*. 1995;310:970-3.
58. Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, et al. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol*. 1988;23:138-44.
59. Gatz M. Educating the brain to avoid dementia: can mental exercise prevent Alzheimer disease? *PLoS Med*. 2005;2:e7.
60. Scarmeas N, Levy G, Tang MX, Manly J, Stern Y. Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease. *Neurology*. 2001;57:2236-42.
61. Wilson RS, Mendes De Leon CF, Barnes LL, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, et al. Participation in cognitively stimulating activities and risk of incident Alzheimer disease. *JAMA*. 2002;287:742-8.
62. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997;386:493-5.
63. Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*. 1998a;8:939-42.
64. Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson OS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol*. 1999;39:569-78.
65. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*. 1998b;18:3206-12.
66. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. 1999b;2:260-5.
67. Dalla C, Bangasser DA, Edgecomb C, Shors TJ. Neurogenesis and learning: acquisition and asymptotic performance predict how many new cells survive in the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;88:143-8.
68. Ambrogini P, Cuppini R, Cuppini C, Ciaroni S, Cecchini T, Ferri P, et al. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*. 2000;286:21-4.
69. Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, et al. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol*. 2007;5:e214.
70. Epp JR, Spritzer MD, Galea LA. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*. 2007;149:273-85.
71. Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufienbiel M, et al. Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2006;60:1314-23.
72. Mirochnic S, Wolf S, Staufienbiel M, Kempermann G. Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus*. 2009;19(10):1008-18.
73. Herring A, Ambrée O, Tomm M, Habermann H, Sachser N, Paulus W, et al. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp Neurol*. 2009;216:184-92.
74. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem*. 1994;269:13057-60.
75. Dennis EA. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci*. 1997;22:1-2.
76. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23:49-59.
77. Zubenko GS, Winwood E, Jacobs B, Tepy I, Stiffler JS, Hughes HB 3rd, et al. Prospective study of risk factors for Alzheimer's disease: results at 7.5 years. *Am J Psychiatry*. 1999;156:50-7.
78. Gattaz WF, Maras A, Cairns NJ, Levy R, Forstl H. Decreased phospholipase A2 activity in Alzheimer brains. *Biol Psychiatry*. 1995;37:13-7.
79. Gattaz WF, Cairns NJ, Levy R, Forstl H, Braus DF, Maras A. Decreased phospholipase A2 activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1996;246:129-31.
80. Fridman C, Gregorio SP, Dias Neto E, Ojopi EPB. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. *Rev Psiq Clin*. 2004;31:19-25.
81. Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ. Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A2 activity. *J Neurochem*. 1998;70:786-93.
82. Talbot K, Young RA, Jolly-Tornetta C, Lee VM, Trojanowski JQ, Wolf BA. A frontal variant of Alzheimer's disease exhibits decreased calcium-independent phospholipase A2 activity in the prefrontal cortex. *Neurochem Int*. 2000;37:17-31.
83. Gattaz WF, Forlenza OV, Talib LL, Barbosa NR, Bottino CM. Platelet phospholipase A2 activity in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Neural Transm*. 2004;111:591-601.
84. Valenzuela MJ, Jones M, Wen W, Rae C, Graham S, Schnier R, et al. Memory training alters hippocampal neurochemistry in healthy elderly. *Neuroreport*. 2003;14:1333-7.
85. Miller BL, Chang L, Booth R, Ernst T, Cornford M, Nikas D, et al. In vivo 1H MRS choline: correlation with in vitro chemistry/histology. *Life Sci*. 1996;58:1929-35.
86. Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGE. *Development*. 1994a;120:1685-93.
87. Williams EJ, Walsh FS, Doherty P. The production of arachidonic acid can account for calcium channel activation in the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by NCAM, N-cadherin, and L1. *J Neurochem*. 1994b;62:1231-4.
88. Kadoyama K, Takahashi Y, Higashida H, Tanabe T, Yoshimoto T. Cyclooxygenase-2 stimulates production of amyloid β -peptide in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281:483-90.
89. Ikeno Y, Konno N, Cheon SH, Bolchi A, Ottonello S, Kitamoto K, et al. Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells through lysophosphatidylcholine generation and activation of G2A receptor. *J Biol Chem*. 2005;280:28044-52.
90. Masuda S, Murakami M, Takanezawa Y, Aoki J, Arai H, Ishikawa Y, et al. Neuronal expression and neurotogenic action of group X secreted phospholipase A2. *J Biol Chem*. 2005;280:23203-14.
91. Arioka M, Cheon SH, Ikeno Y, Nakashima S, Kitamoto K. A novel neurotrophic role of secretory phospholipases A2 for cerebellar granule neurons. *FEBS Lett*. 2005;579:2693-701.
92. Masuda S, Yamamoto K, Hirabayashi T, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I, et al. Human group III secreted phospholipase A2 promotes neuronal outgrowth and survival. *Biochem J*. 2008;409:429-38.
93. Smalheiser NR, Dissanayake S, Kapil A. Rapid regulation of neurite outgrowth and retraction by phospholipase A2-derived arachidonic acid and its metabolites. *Brain Res*. 1996;721:39-48.
94. Forlenza OV, Mendes CT, Marie SK, Gattaz WF. Inhibition of phospholipase A2 reduces neurite outgrowth and neuronal viability. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007;76:47-55.
95. Manev H, Uz T, Manev R, Zhang Z. Neurogenesis and neuroprotection in the adult brain. A putative role for 5-lipoxygenase?. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:45-51.
96. Uz T, Manev R, Manev H. 5-Lipoxygenase is required for proliferation of immature cerebellar granule neurons in vitro. *Eur J Pharmacol*. 2001;418:15-22.
97. Uchida K, Kumihashi K, Kurosawa S, Kobayashi T, Itoi K, Machida T. Stimulatory effects of prostaglandin E2 on neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. *Zoolog Sci*. 2002;19:1211-6.
98. Sasaki T, Kitagawa K, Sugiura S, Omura-Matsuoka E, Tanaka S, Yagita Y, et al. Implication of cyclooxygenase-2 on enhanced proliferation of neural progenitor cells in the adult mouse hippocampus after ischemia. *J Neurosci Res*. 2003;72:461-71.