

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**MARCUS AUGUSTO DE OLIVEIRA**

**INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA NINHADA SOBRE O DECLÍNIO COGNITIVO E  
A MORFOLOGIA MICROGLIAL DA CAMADA MOLECULAR DO GIRO  
DENTEADO EM *Rattus norvegicus***

BELÉM – PARÁ

2012

**MARCUS AUGUSTO DE OLIVEIRA**

**INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA NINHADA SOBRE O DECLÍNIO COGNITIVO E  
A MORFOLOGIA MICROGLIAL DA CAMADA MOLECULAR DO GIRO  
DENTEADO EM *Rattus norvegicus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências.

**Orientador:** Prof. Dr. José Antonio Picanço Diniz Jr

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

BELÉM – PARÁ

2012

MARCUS AUGUSTO DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA NINHADA SOBRE O DECLÍNIO COGNITIVO E  
A MORFOLOGIA MICROGLIAL DA CAMADA MOLECULAR DO GIRO  
DENTEADO EM *Rattus norvegicus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências.

**Banca Examinadora:**

---

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior/IEC.

---

Profa Dr. Rommel Burbano/UFPA

---

Profa Dra. Lucidia Fonseca Santiago/UFPA

*Dedico este trabalho à minha mãe Vânia Oliveira, minha maior referência, despertando em mim a vontade de buscar sempre o melhor. Dedico profunda gratidão e todo meu amor.*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Vânia oliveira, pelo apoio, incentivo, amizade, confiança, e por todo o amor dedicado a mim. Sou imensamente grato.

Ao meu irmão, Marcelo Oliveira, por todos os conselhos e por toda a amizade, me dando o suporte que preciso.

Ao meu pai, Ângelo Oliveira, por todo amor e oportunidade a mim proporcionado.

À minha namorada, Gabriela Arrifano, por todo o amor, compreensão e pela ajuda incansável com formatação e detalhes finais do manuscrito e por sempre me incentivar a melhorar.

Ao prof. Cristovam Diniz, pela orientação, paciência, pelos constantes ensinamentos e por todo seu empenho, sem os quais o desenvolvimento deste trabalho nao seria possível.

Ao Prof Rubem Guedes e sua equipe do Lab de Fisiologia da Nutrição Profa Naide Teodósio do Dep. de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco onde grande parte dos experimentos foram realizados e sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Ao prof. João Bento, pelas sugestões e pela ajuda com as figuras.

À Camila Lima, por toda a ajuda.

À todos os amigos do LNI, que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento do trabalho.

“O sucesso é construído à noite!  
Durante o dia você faz o que todos fazem.”  
(Roberto Shinyashiki)

## RESUMO

Tem sido proposto que o envelhecimento está associado à alteração inflamatória no sistema nervoso central de roedores, mas não se sabe se as mudanças microgliais induzidas pelo envelhecimento são afetadas pelo ambiente pós-natal associado ao tamanho da ninhada. Por outro lado a camada molecular do giro denteado tem sido reconhecida como o alvo principal do input da via perfurante cuja integridade sináptica é essencial para formação de memória da identidade e da localização espacial de objetos. No presente trabalho investigamos se as mudanças morfológicas microgliais induzidas pelo envelhecimento são influenciadas por mudanças no tamanho da ninhada no início da vida. Para avaliar essas questões, ratos da variedade Wistar amamentados em ninhadas de 6 ou 12 filhotes por nutriz foram mantidos sedentários em grupos de 2-3 do 21º dia pós-natal em diante. Aos 4 (adulto) ou aos 23 (velho) meses de idade, os animais foram submetidos a testes de memória espacial e de reconhecimento da forma de objetos, sacrificados, perfundidos com fixador aldeídico e tiveram seus cérebros processados para imunomarcagem seletiva para microglias/macrófagos com anticorpo anti Iba-1. A seguir uma fração representativa das células imunomarcadas da camada molecular do giro denteado foi reconstruída em três dimensões usando o programa Neurolucida e as características morfológicas de cada célula foram quantificadas com o software Neuroexplorer. Foi encontrado que os animais mantidos em gaiolas padrão de laboratório durante toda a vida apresentaram déficits de memória espacial independente da idade e não importando o tamanho da ninhada. Por outro lado todos os indivíduos idosos não importando o tamanho da ninhada tiveram sua memória de reconhecimento de objeto prejudicada. A análise da morfologia microglial revelou que a área e o perímetro do corpo celular e o volume dos ramos parecem ser afetados mais intensamente pelo envelhecimento e que essa alteração é mais acentuada nos animais de ninhada grande. Além disso, observou-se retração e espessamento dos ramos nos animais velhos em maior proporção nos animais de ninhadas grandes. Tomados em conjunto os resultados sugerem que a memória espacial parece ser mais suscetível ao processo de envelhecimento do que a memória de reconhecimento de objeto e que essas mudanças estão associadas a efeitos distintos sobre o soma e o padrão de ramificação das microglias da camada molecular dos animais maduros e idosos.

**Palavras chaves:** tamanho da ninhada, declínio cognitivo, microglia, envelhecimento, morfologia.

## ABSTRACT

It has been proposed that aging is associated with neuroinflammation in the central nervous system but it is not known whether microglial changes induced by aging are affected by early in life effects of litter size. On the other hand the molecular layer of dentate gyrus has been recognized as the main target of the perforant pathway, whose synaptic integrity is essential for the recognition memories of identity and spatial location. In the present report we investigated if aging cognitive decline and microglial morphological changes in the molecular layer are influenced by litter size changes early in life and aging. To assess these questions Wistar rats suckled in litters of six or 12 pups/mother were raised sedentarily in groups of 2-3 from the 21<sup>st</sup> post-natal day onwards. At four (mature adult) or 23 (aged) months of age were submitted to spatial memory and object identity recognition tests, sacrificed, perfused with aldehyde fixatives and had their brains processed for selective microglia/macrophages immunolabeling with anti-IBA-1 antibodies. A representative sample of the immunolabeled cells in the molecular layer of dentate gyrus was analyzed after three-dimensional reconstruction with Neurolucida software (Microbright Field Inc.) and morphological features of each cell were quantified by Neuroexplorer (Microbright Field Inc.). It was found that Wistar rats maintained all life in standard laboratory cages showed spatial memory deficits in both mature and aged subjects no matter the litter size. On the other hand all aged subjects independent of the litter size had their object recognition identity memory impaired. Microglial morphological analysis revealed that cell soma area and perimeter and branches volume seem to be more intensely affected by aging and that these changes are mainly associated with animals from large litters. In addition it was observed important shrinkage and thickening of the microglial branches in aged individuals in higher proportion in the group from large litters. Taken together the results suggest that spatial memory seems to be more susceptible to the aging process than object recognition and that these changes are associated with distinct effects on the soma and branching patterns of microglia of molecular layer from young and aged subjects.

**Key words:** litter size, cognitive decline, microglia, aging, morphology



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> O período de desenvolvimento encefálico rápido de espécies representativas da classe dos mamíferos expressada em função do acréscimo do peso corporal. Para normalizar as escalas e permitir sua representação em uma única figura as taxas são indicadas como valores percentuais do peso do adulto nas seguintes unidades: porquinho-da-índia, cada unidade da escala corresponde a 1 dia; no macaco Rhesus, cada unidade corresponde a 4 dias; no carneiro, 5 dias; no porco, 2 semanas; no homem, um mês; no coelho, 2 dias; no rato 1 dia (ERECINSKA, CHERIAN & SILVER 2004).....	3
<b>Figura 2.</b> Como distinguir memórias de duas festas de aniversário que ocorreram em anos diferentes? Numerosas experiências semelhantes a essa (que ocorreram no mesmo lugar, contem as mesmas pessoas mas são distintas no tempo) precisam ter suas diferenças acentuadas para serem lembradas como experiências separadas antes de serem codificadas, e esse papel de acentuar as diferenças parece ser do giro denteado (LEUTGEB & MOSER, 2007).....	11
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografias para ilustrar a via perfurante marcada por transporte anterógrado (A) e as células granulares com suas fibras musgosas correspondentes marcadas por transporte retrógrado (B) com injeção de Dextrana biotilada de diferentes pesos moleculares. (A) Neurônios da camada II do Córtex Entorrinal enviam projeções através da via perfurante (seta) para o terço médio da camada molecular do giro denteado (estrelas), onde fazem sinapses com dendritos dos neurônios da camada granular. (B) Células granulares (seta branca) enviam seus axônios (seta preta), as fibras musgosas, para o stratum lucidum de CA3 (não ilustrado); (OLIVEIRA, 2009 não publicado).....	11
<b>Figura 4:</b> Sequência experimental em função do tempo. Os números indicam o tempo decorrido em dias após o nascimento. A sequência de procedimentos é a mesma para ninhadas grandes (12 filhotes por nutriz) e pequenas (6 filhotes por nutriz).....	18
<b>Figura 5:</b> Aparato dos testes comportamentais. Diagrama esquemático ilustrando os testes de memória espacial e de reconhecimento de objeto. A) Reconhecimento da identidade do objeto: nesse teste é esperado que os ratos gastem mais tempo explorando o objeto novo do que o familiar. B) Reconhecimento da nova localização do objeto: nesse teste é esperado que os ratos gastem mais tempo explorando o objeto deslocado do que o estacionário. (Modificado de ENNACEUR et al. 2005).....	19
<b>Figura 6:</b> Tortuosidade (T) é a razão entre os valores de L e R ( $T=L/R$ ). (Adaptado de SANTOS-FILHO, 2007).....	23
<b>Figura 7:</b> Desenho esquemático mostrando os parâmetros analisados pelo programa Neurolucida.....	25
<b>Figura 8:</b> Peso dos animais. Evolução do peso corporal nos diferentes grupos experimentais. O eixo dos Y representa as médias aritméticas dos pesos corporais (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande) em função da idade. (*) indica diferenças significativas após teste T bi-caudal. ( $p<0,05$ ).....	26
<b>Figura 9:</b> Teste de memória. Reconhecimento da forma (A) e da localização espacial (B) dos objetos. Os resultados são expressos em valores percentuais do tempo total de exploração. (*) $p<0.05$ e (**) $p<0.01$ indicam diferentes níveis de significância estatística em testes T bi-caudais para eventos interdependentes.....	27
<b>Figura 10:</b> Perímetro do soma. O eixo Y representa as médias aritméticas dos perímetros corporais (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande-NG) em função da	

idade: adulto e velho; (*) indica diferenças significativas entre idades; e (#) entre ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	28
<b>Figura 11:</b> Área do soma. O eixo Y representa as médias aritméticas das áreas dos somas (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: adulto e velho. (*) indica diferenças significativas entre as idades, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	29
<b>Figura 12:</b> Convexidade. O eixo Y representa as médias aritméticas das convexidades (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande-NG) em função da idade: adulto e velho; (*) indica diferenças significativas entre as idades; e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	29
<b>Figura 13:</b> Número de protruções. O eixo Y representa as médias aritméticas dos números de espinhas (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande-NG) em função da idade: adulto e velho.(*) indica diferenças significativas entre as idades; e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	30
<b>Figura 14:</b> Número de pontos de ramificações. O eixo Y representa as médias aritméticas dos números de pontos de ramificações (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande-NG) em função da idade: adulto e velho; (*) indica diferenças significativas entre as idades; e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	30
<b>Figura 15:</b> Comprimento dos ramos. O eixo Y representa as médias aritméticas dos comprimentos dos ramos (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande-NG) em função da idade: adulto e velho; (*) indica diferenças significativas entre as idades; e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	31
<b>Figura 16:</b> Volume dos ramos. O eixo Y representa as médias aritméticas dos volumes dos ramos (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande-NG) em função da idade: adulto e velho; (*) indica diferenças significativas entre as idades; e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	31
<b>Figura 17:</b> Tortuosidade. O eixo Y representa as médias aritméticas das tortuosidades (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande-NG) em função da idade: adulto e velho; (*) indica diferenças significativas entre as idades; e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	32
<b>Figura 18:</b> Diâmetro da base do ramo primário. O eixo Y representa as médias aritméticas dos diâmetros das bases dos ramos primários (média $\pm$ erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande-NG) em função da idade: adulto e velho; (*) indica diferenças significativas entre as idades; e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).....	32
<b>Figura 19:</b> Imunomarcção para Iba-1 e reconstruções tridimensionais de microglias dos animais adultos. Fotomicrografias de microglias imunomarcadas por anticorpo anti Iba-1 dos animais adultos de ninhadas grandes (NG) e pequenas (NP), obtidas através da objetiva de 100x em diferentes planos de foco. À esquerda, reconstruções tridimensionais das microglias dos animais que mais se aproximaram dos valores médios de cada grupo experimental. Escala: 25 $\mu$ m.....	33
<b>Figura 20:</b> Imunomarcção para Iba-1 e reconstruções tridimensionais de microglias dos animais velhos. Fotomicrografias de microglias imunomarcadas por anticorpo anti Iba-1	

dos animais adultos de ninhadas grandes (NG) e pequenas (NP), obtidas através da objetiva de 100x em diferentes planos de foco. À esquerda, reconstruções tridimensionais das microglias dos animais que mais se aproximaram dos valores médios de cada grupo experimental. Escala: 25µm.....	36
<b>Figura 21:</b> Reconstruções tridimensionais e dendrogramas. Microglias dos animais adultos e velhos, de ninhadas grandes e pequenas, dos grupos sedentários e exercitados, cujos valores morfométricos mais se aproximaram dos valores médios de cada grupo experimental. Note evidente retração e espessamento dos ramos nos animais velhos, assim como aumento do soma microglial, quando comparados aos animais adultos de meia idade.....	37
<b>Figura 22:</b> Modelo esquemático incluindo as várias dimensões que interagem com o envelhecimento. O modelo pretende mostrar as interações entre aspectos estruturais e comportamentais que podem ser afetados pelo envelhecimento. As setas são bidirecionais para indicar que a influência pode potencialmente se originar dos fatores envolvidos fluindo numa direção ou noutra ou ainda em ambas as direções. Apesar de que é provavelmente impossível reunir informação acerca de tais influências num único estudo, deve-se naturalmente desenvolver esforços para avaliar múltiplas medidas da estrutura e da função cerebral sempre que possível (Figura extraída de GRADY, 2012)....	44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1. Cuidado Materno e Estresse Pós-Natal.....	01
1.2. Memória, Plasticidade Sináptica e Microglia.....	06
1.3. A Contribuição do Giro Denteado no Reconhecimento da Forma e da Localização Espacial .....	10
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>16</b>
2.1. Objetivos específicos.....	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1. Grupos experimentais.....	17
3.2. Ambiente e condições sedentárias.....	18
3.3. Testes comportamentais.....	19
3.4. Procedimentos histológicos e microscopia tridimensional.....	21
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1. Evolução do peso corporal.....	26
4.2. Teste de memória.....	27
4.2.1. Teste de reconhecimento de identidade do objeto (o quê?).....	27
4.2.2. Teste de reconhecimento da localização espacial (onde?).....	28
4.3. Análise tridimensional da morfologia microglial da camada molecular do giro denteado.....	28
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
5.1. Cuidado Materno, Competição Entre Irmãos E Plasticidade Cerebral.....	38
5.2. Possíveis Implicações Funcionais Das Alterações Senis Do Giro Denteado Agravadas Pelo Estresse Pós-Natal Imediato.....	40
5.3. Limitações do Ensaio Experimental e o Escopo da Dissertação.....	43
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO 01.....</b>	<b>59</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

O presente trabalho de dissertação é parte de uma linha de pesquisa dedicada ao estudo da neurobiologia do envelhecimento realizado em cooperação com o Laboratório de Fisiologia da Nutrição Profa. Naíde Teodósio da Universidade Federal de Pernambuco sob liderança do Prof. Rubem Guedes. Neste capítulo do projeto dedica-se esforço concentrado em investigar as possíveis influências de longo prazo de modificações do ambiente pós-natal imediato sobre o declínio cognitivo senil em correlação com as alterações morfológicas das células microgliais da camada molecular do giro denteado de ratos Wistar.

### **1.1. Cuidado Materno e Estresse Pós-Natal**

A mãe representa no primeiro período de vida a fonte primordial de estímulos térmicos, somatosensórios, olfatórios, visuais e auditivos, indispensáveis para o desenvolvimento dos sistemas neurais e é a fonte nutricional exclusiva dos filhotes nas primeiras fases de vida. No entanto, a relação complexa entre mãe e filhos vai além do simples suprimento das necessidades nutricionais tendo o ato de lambar, carregar e amamentar os filhotes com o dorso arcado, bem como arrumá-los reunindo-os debaixo de seu corpo influência significativa sobre o perfil cognitivo e a vulnerabilidade ao estresse na vida adulta (FISH et al., 2004).

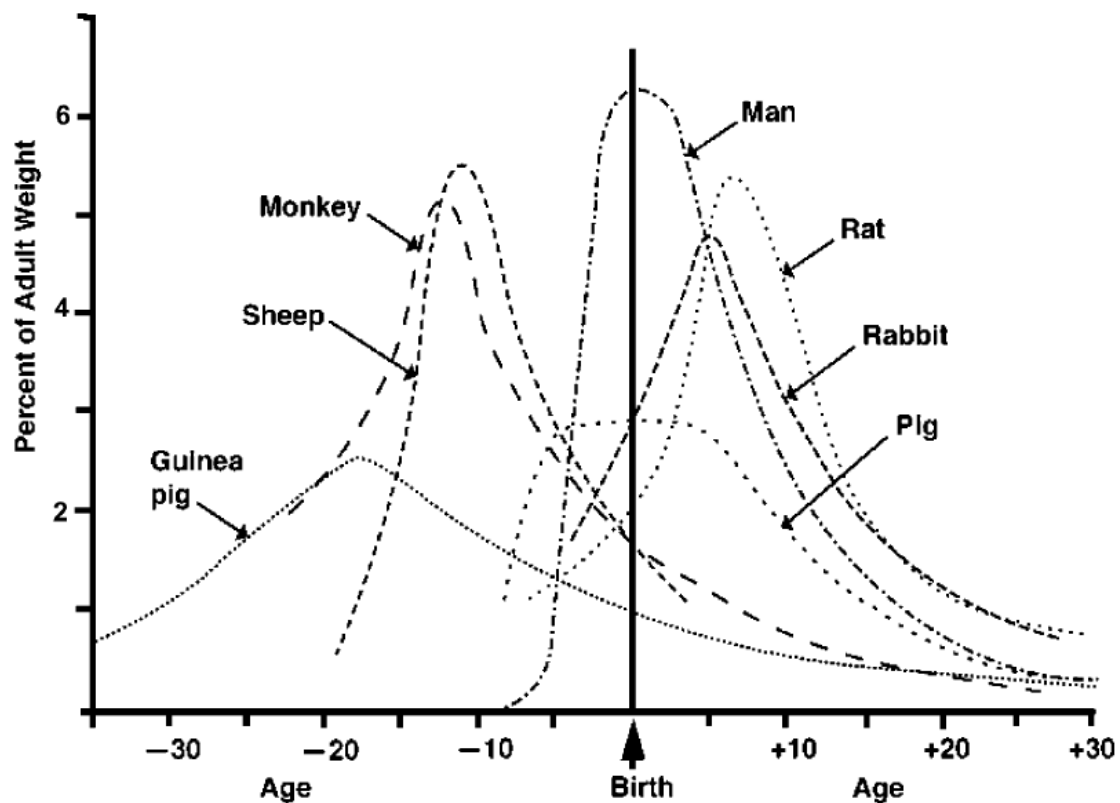
Esse conjunto de comportamentos maternos tem sido descrito na literatura pela sigla LG-ABN (Licking and Grooming & Arched-Back Nursing) e sua variação em quantidade contribui para transmissão epigenética de alterações comportamentais entre gerações através de mudanças nas alças endócrinas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (FRANCIS et al., 1999). Essa alça é responsável pela manutenção da homeostase do organismo e funciona em conjunto com os neurônios noradrenérgicos do sistema nervoso central sendo o seu controle feito pelos núcleos do sistema nervoso autônomo e pelo sistema límbico.

Os estímulos estressores convergem para os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo gerando a ativação do eixo HPA, através da liberação de hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e vasopressina (VP) pelos neurônios hipotalâmicos (HAUSSMANN et al., 2000). CRH e VP estimulam a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior, estimulando a liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal. Os glicocorticoides agem em diversos tecidos-alvo, e potencializam a síntese e ação das catecolaminas (AGUILERA, 2011).

A ativação do eixo HPA é essencial para a manutenção à vida promovendo a manutenção do funcionamento do organismo. Quando mantidos em concentrações suficientes, os glicocorticóides exercem importante papel na manutenção da homeostase. Entretanto, a exposição contínua a elevadas concentrações desses hormônios representa risco para o organismo. Exposição crônica a níveis elevados de glicocorticóides resultam no catabolismo de proteínas, supressão dos processos anabólicos, hiperglicemia, imunossupressão, depressão, distúrbios do sistema nervoso central, redução do volume hipocampal e prejuízo do desempenho cognitivo (MEANEY et al., 1993; MCEWEN & SAPOLSKY, 1995). A inativação das respostas de estresse no eixo HPA acontece numa alça de retroalimentação negativa onde os glicocorticóides inibem a liberação do ACTH, reduzindo as concentrações de RNAm para a expressão de CRH e inibição do núcleo paraventricular do hipotálamo (MEANEY et al., 1993).

Os cuidados maternos e os períodos intercalados de amamentação são mediados por fatores hormonais e pela complexa inter-relação entre a sinalização materna e dos filhotes, e o ambiente proporcionado durante o aleitamento pode produzir impactos que influenciam respostas metabólicas para o resto da vida (PRYCE, BETTSCHEN & FELDON, 2001). O comportamento materno adequado durante o período pós-natal imediato parece ativamente inibir o eixo HPA nos filhotes. Para Levine o comportamento de lambar a prole no sentido anogenital exerce controle inibitório sobre a liberação de ACTH no filhote, assim como o aleitamento que também reduz as concentrações de corticosterona (LEVINE, 2000). Assim, manipulações que alteram o comportamento materno durante o período crítico de desenvolvimento podem modificar permanentemente o nível de responsividade do eixo HPA (VAZQUEZ et al., 2006).

No rato, animal de interesse para o presente trabalho, durante o período de desenvolvimento encefálico rápido (Figura 1), existe uma janela temporal no qual os níveis basais de CRH hipotalâmico, de ACTH hipofisário e de corticosterona no plasma são baixos. Esse período, que ocorre durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal é denominado período hiporresponsivo ao estresse (VAZQUEZ et al., 2006). Durante esse período, um estímulo que resultaria no adulto em um aumento das concentrações dos hormônios relacionados ao estresse, não é capaz de gerar tal resposta nos filhotes (LEVINE, 2001).



**Figura 1.** O período de desenvolvimento encefálico rápido de espécies representativas da classe dos mamíferos expressada em função do acréscimo do peso corporal. Para normalizar as escalas e permitir sua representação em uma única figura as taxas são indicadas como valores percentuais do peso do adulto nas seguintes unidades: porquinho-da-índia, cada unidade da escala corresponde a 1 dia; no macaco Rhesus, cada unidade corresponde a 4 dias; no carneiro, 5 dias; no porco, 2 semanas; no homem, um mes; no coelho, 2 dias; no rato 1 dia (ERECINSKA et al., 2004).

Portanto a responsividade do eixo HPA a fatores estressores é mínima nesse período, sendo atribuída à eficácia da retroalimentação negativa exercida pela corticosterona, principalmente sobre o hipocampo (VÁZQUEZ et al., 1996; GALEEVA et al., 2006). Diversos experimentos têm confirmado esses dados demonstrando que o aleitamento (alimentação) e a manutenção do cuidado materno são críticos para a regulação da responsividade do eixo HPA do filhote e manutenção do período de hiporresponsividade (ROSENFELD et al., 1993; RHEES, LEPHART & ELIASON, 2001).

O período de hiporresponsividade ao estresse é fundamental para o desenvolvimento neural, durante o qual processos de crescimento e morte celular, divisão, diferenciação, migração neuronal e glial assim como a sinaptogênese ocorrem e constituem o substrato morfofuncional do período de crescimento rápido do encéfalo (GONZÁLEZ et al., 1994)(Figura 1).

Essa hiporresponsividade a fatores estressantes permite o desenvolvimento de tais eventos na ausência de secreção de altos níveis de glicocorticoides, que acarretariam redução no padrão mitótico, redução da mielinização e da diferenciação prejudicando o desenvolvimento funcional normal do encéfalo (LEVINE, 2001; SANCHEZ, 2006).

Existem diversos protocolos experimentais que podem induzir alterações para mais ou para menos no nível de responsividade ao estresse do filhote, e geralmente estes protocolos estão centrados na alteração do nível de cuidado materno ofertado (DE KLOET, ROTS & COOLS, 1996; ENTHOVEN, DE KLOET & OITZL, 2008).

Períodos curtos de privação materna causam um aumento do cuidado materno subsequente, com maior estimulação sensorial, causando efeito modulatório no eixo HPA. Como resultado, animais que sofrem privação materna por curtos períodos apresentam aumento da resistência ao estresse e à diminuição da capacidade cognitiva quando adultos (PRYCE et al., 2001; PRYCE & FELDON, 2003).

Entretanto, períodos prolongados de privação ou redução do cuidado materno geram a interrupção do período de hiporresponsividade ao estresse, causando um aumento inapropriado dos níveis de corticosterona, sendo observadas diferentes alterações neurobiológicas que, por ocorrerem no período crítico de desenvolvimento, podem ser duradouras apresentando-se como fator de risco ao desenvolvimento de patologias na vida adulta (SCHMIDT et al., 2004). De Kloet e colaboradores (DE KLOET et al., 1996; BERRY et al., 2008) demonstraram que tais fatores são críticos para o funcionamento dos receptores de corticosterona e podem alterar o fenótipo dos sistemas dopaminérgicos na vida adulta.

Além disso, outra série de ensaios dedicados a medir os efeitos potenciais do tamanho da ninhada como ameaça à vida pós-natal demonstrou que a competição entre os indivíduos da mesma ninhada é função do número daqueles e do acesso ao leite materno proveniente de tetas funcionais (STOCKLEY & PARKER, 2002; ZHANG, ZHANG & WANG, 2011). De fato essa competição pode ser fatal quando o número de filhotes excede o número de tetas (CAMERON, 1973).

Há, entretanto, uma série de consequências não letais dessa competição natural que pode induzir diferenças individuais importantes na vida pós-natal. Por exemplo, as taxas de crescimento mais altas favorecendo indivíduos com maior acesso ao leite materno podem beneficiá-los com maior sucesso reprodutivo e vida mais longa o que pode se traduzir em vantagens evolucionárias (AZZAM, NIELSEN & DICKERSON, 1984; VAN ENGELEN, NIELSEN & RIBEIRO, 1995; STOCKLEY & PARKER, 2002; RODEL et al., 2008; RODEL et al., 2010). A associação entre redução de cuidado materno e aumento de padrão



competitivo acarreta um retardo no desenvolvimento somático e funcional dos animais criados em ninhadas maiores (CHAHOU & PAUMGARTTEN, 2009). Esses dados corroboram outros estudos onde animais criados em ninhadas maiores apresentaram não somente redução significativa do peso corporal como também alterações em diversas áreas encefálicas e no desenvolvimento de fatores emocionais (PICANÇO-DINIZ et al., 1998; BORBA et al., 2000; ROCHA-DE-MELO et al., 2004; MAIA et al., 2006; DIMITSANTOS et al., 2007; VIANA et al., 2007).

Alinhado com esse ponto de vista está a demonstração de que mudanças espontâneas no tamanho da ninhada podem afetar a emocionalidade na vida adulta e que essas mudanças não podem ser explicadas apenas por mudanças concomitantes no cuidado materno (DIMITSANTOS et al., 2007). Em ratos, onde as fêmeas são as únicas cuidadoras da ninhada, a redução do cuidado materno está associada à alterações na neurogênese e na sobrevivência neuronal no hipocampo adulto, complexidade de ramos dendríticos, LTP e redução na performance em testes cognitivos (OITZL et al., 2000; BREDY et al., 2003a; MIRESCU, PETERS & GOULD, 2004; CHAMPAGNE et al., 2008).

Da mesma forma, o aumento do cuidado materno promove sinaptogênese e a melhora do desempenho cognitivo na vida adulta em testes de aprendizado espacial em ratos (LIU et al., 2000). Tais dados corroboram os achados de van Hasselt e colaboradores que observaram que as variações individuais de cuidado materno recebidos por animais de uma mesma ninhada estão relacionados com as alterações dos comportamentos sociais dos mesmos durante a adolescência (VAN HASSELT et al., 2012).

Um dos métodos experimentais mais simples para induzir uma redução na oferta de leite e cuidados maternos por indivíduo consiste na manipulação da quantidade de filhotes por ninhada, entretanto muitos dos ensaios realizados com o objetivo de observar a influência do cuidado materno sobre o desenvolvimento dos filhotes têm utilizado como modelo experimental fêmeas apresentando comportamentos extremos de baixa e alta frequência de cuidados com os filhotes (MEANEY, 2001). Todavia, observações realizadas acerca do comportamento de fêmeas de *Rattus norvegicus* espécie adotada nos ensaios do presente trabalho demonstram que a frequência nos cuidados de lambar, carregar, amamentar com o dorso arcado e outros cuidados maternos característicos dessa espécie são normalmente distribuídos entre as fêmeas (GROTA & ADER, 1969; ADER & GROTA, 1970; MEANEY, 2001).

Assim, os padrões comportamentais de cuidados maternos observados em um grande número de fêmeas são estáveis apresentando uma distribuição normal não bimodal, sendo as

fêmeas que apresentam altos e baixos índices de tais cuidados as duas extremidades desse contínuo, e não duas populações distintas (CHAMPAGNE et al., 2001). Dessa forma a simples manipulação da relação do número de filhotes por nutriz, empregado no presente trabalho pode ser suficiente para subtrair ou aumentar os cuidados com os filhotes durante o período de amamentação.

## **1.2 Memória, Plasticidade Sináptica e Microglia**

Em trabalho anterior dedicado aos mecanismos do declínio cognitivo e da plasticidade sináptica tardia associado ao estresse induzido por fragmentação do cuidado materno durante o período de amamentação, Brunson e colaboradores (BRUNSON et al., 2005) revelaram deterioração nas memórias espacial e de reconhecimento de objeto na meia idade (mas não antes) e que esses déficits estavam associados a prejuízo da potenciação de longo prazo com atrofia dos dendritos dos neurônios piramidais de CA1 e expansão das fibras musgosas. Entretanto, na maioria dos estudos dedicados a desvendar os mecanismos relacionados à memória de reconhecimento da forma e da localização espacial de objetos e seus déficits, grande parte do esforço dispêndio concentrou-se em identificar as regiões envolvidas, suas conexões neurais e correlações entre eventos celulares, moleculares e sistêmicos (VANN & ALBASSER, 2011).

Para isso numerosas técnicas foram utilizadas, incluindo registros eletrofisiológicos de unidades isoladas, potenciais pós-sinápticos subsequentes à estimulação elétrica, imunomarcção de genes de expressão rápida, imunomarcção para neurogênese, estudos de lesão seguida de análise comportamental e manipulação genética, tornando-se cada vez mais aparente desses ensaios o envolvimento de redes de conexões superpostas, partilhando células que codificam isolada ou simultaneamente localização espacial e identidade do objeto (VANN & ALBASSER, 2011). Ainda que se tenha avançado muito o conhecimento relacionado a essas formas de memória, esse esforço sistemático concentrou-se em sua maior proporção nos componentes neurais, deixando-se por investigar em detalhe as contribuições de células não neurais e da matriz extracelular nesses processos.

No presente trabalho decidimos investigar a alteração morfológica das células da glia em ratos adultos e envelhecidos frente a uma redução do cuidado materno durante o período pós-natal imediato (1 a 21 dias de vida). Para isso escolhemos investigar as alterações da célula microglial e as razões para essa escolha são de diferentes naturezas. A função e a forma das células microgliais são influenciadas por numerosos fatores do microambiente

extracelular durante o desenvolvimento e no cérebro adulto. A grande maioria dos trabalhos anteriores dedicados à microglia se dedicaram a investigar sua contribuição no contexto da doença (CARDONA et al., 2006; HANISCH & KETTENMANN, 2007; LYONS et al., 2007).

As células microgliciais já são reconhecidas como o 4<sup>o</sup> elemento da sinapse, atuando como sensores sinápticos durante o desenvolvimento e no cérebro adulto, sendo capazes de responder a mudanças na atividade neural e à liberação de neurotransmissores (SCHAFER, LEHRMAN & STEVENS, 2012). Durante o desenvolvimento as células microgliciais parecem influir em eventos associados à proliferação e diferenciação neuronais, vascularização, sinaptogênese e mielinização, assim como participam da remoção de neurônios em apoptose, de detritos celulares e de conexões sinápticas (SCHAFER et al., 2012; WAKE, MOORHOUSE & NABEKURA, 2011; BITZER-QUINTERO & GONZÁLEZ-BURGOS, 2012).

As células microgliciais modulam a neurogênese, controlam o *turnover* de neurotransmissores e dão suporte ao metabolismo neuronal participando da regulação da angiogênese e do fluxo sanguíneo cerebral (BLANK & PRIZ, 2012; TREMBLAY et al., 2011). Mais recentemente as células microgliciais têm sido implicadas na restauração de circuitos sinápticos lesionados, além de modular a faixa de operação sináptica através do assim chamado “synaptic scaling”. O monitoramento constante dos contatos sinápticos e parte de sua regulação extra-sináptica através da matriz extracelular realizada pelas micróglia, revela bem o seu potencial no controle do desenvolvimento, estabilização e função de redes neurais (KETTENMANN et al., 2011).

No que concerne ao aprendizado e memória, a interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), uma interleucina pró-inflamatória produzida pela micróglia durante tarefas de aprendizado e memória parece ter papel importante nas tarefas hipocampo-dependentes em condições normais, mas quando em níveis alterados compromete o desempenho cognitivo podendo induzir neurodegeneração (WILLIAMSON et al., 2011). De fato essa interleucina em níveis normais parece ser essencial para LTP no hipocampo, inibindo esse processo quando em níveis alterados (ROSS et al., 2003; SCHNEIDER et al., 1998). Além disso, camundongos *knockouts* para essa interleucina ou para seus receptores do tipo 1 tem péssimo desempenho em tarefas de aprendizado e memória hipocampo-dependentes (GOSHEN et al., 2007; SPULBER et al., 2009).

Durante o desenvolvimento, alterações neuroimunes de qualquer natureza induzidas por condições perinatais desfavoráveis como, por exemplo, o estresse por redução do cuidado materno utilizado no presente trabalho, podem alterar o fenótipo microglial e aumentar a

vulnerabilidade do sistema nervoso a um insulto subsequente na vida adulta amplificando a resposta inflamatória das células microgliais previamente ativadas (HARRY & KRAFT, 2012).

As micróglia em situação normal se apresentam em todas as regiões do SNC de forma organizada com ramificações em todas as direções e sem sobreposição, definindo domínios ou territórios. Essas células normalmente têm suas funções inflamatórias reguladas para baixo por conta de numerosas influências inibitórias no microambiente que as circunda (RANSOHOFF & PERRY, 2009). Apesar desse fenótipo regulado para baixo, no cérebro normal, estudos que coletaram imagens microgliais *in vivo* revelaram que elas costumam deslocar seus processos ao longo do território que ocupam para monitorar o microambiente local (DAVALOS et al., 2005; NIMMERJAHN, KIRCHHOFF & HELMCHEN, 2005).

As populações microgliais de diferentes regiões do SNC variam em densidade tanto em roedores quanto em humanos, com pequenas diferenças em sua morfologia nas várias regiões citoarquitetônicas (LAWSON et al., 1990). Não se sabe ainda que fatores locais determinam essa variação numérica e morfológica ou se essas pequenas variações refletem contribuições funcionais diferentes, apesar de haver igualmente variações regionais na expressão de receptores imunológicos (DE HAAS, BODDEKE & BIBER, 2008; RANSOHOFF & PERRY, 2009).

Em resposta a qualquer distúrbio da homeostase do sistema nervoso essas células podem mudar rapidamente seus fenótipos passando a ser referidas como microglia ativadas com base na mudança de sua morfologia ou na expressão de antígenos em sua superfície (RANSOHOFF & PERRY, 2009). A retração dos processos microgliais é aparente durante a neurodegeneração e neuroinflamação e está fortemente correlacionada com sua transformação funcional para o estado pró-inflamatório ou ativado. As alterações morfológicas associadas à ativação consistem em processos citoplasmáticos encurtados e mais espessos e um corpo celular arredondado representando um contínuo de estágios de ativação que para fins didáticos podem ser classificados em inicial, intermediário e avançado e são acompanhadas pelo aumento da expressão de genes envolvidos em respostas imunes (ZIELASEK & HARTUNG, 1996).

Além da mudança morfológica, a ativação microglial também é caracterizada pela indução da liberação de várias moléculas, tais como marcadores mielóides, citocinas, radicais livres e óxido nítrico (STREIT & KREUTZBERG, 1988; BECHMANN & NITSCH, 1997; STREIT, WALTER & PENNELL, 1999). A ativação da célula microglial pode ocorrer em resposta a variados estímulos, tais como lesões, isquemia e processos inflamatórios, levando a

microglia a assumir um fenótipo ativado associado à proliferação, migração para o local da lesão, fagocitose das células infectadas e em processo de morte celular e liberação de fatores neurotóxicos e neurotróficos (POWER & PROUDFOOT, 2001). No que concerne ao envelhecimento, tem sido descrito que o número de microglias é significativamente aumentado, particularmente no hipocampo, uma das regiões mais precocemente alteradas pelo envelhecimento, e que aquelas células naquela faixa etária parecem adotar um perfil pró-inflamatório (CHOI et al., 2007; ver CHOI & WON, 2011 para revisão).

Para investigar possíveis relações entre alterações microgliais e disfunção cognitiva em ratos adultos e envelhecidos, utilizamos testes que se apropriam de comportamentos naturais de roedores, os chamados testes etológicos. Os animais pertencentes a essa ordem tendem naturalmente a se aproximar e explorar objetos novos em relação aos familiares mostrando maior preferência pelos primeiros em relação aos últimos (SUZUKI & CLAYTON 2000). Essa aparente preferência é considerada como uma indicação de que uma representação do objeto familiar já existe na memória (ver ALBASSER et al., 2010; ENNACEUR, 2010, para revisão).

A memória de reconhecimento de objetos refere-se, portanto à capacidade dos indivíduos de reconhecer objetos já encontrados previamente, identificando a presença de objetos novos entre eles (ENNACEUR et al., 2005; ENNACEUR AND DELACOUR, 1988). O teste comportamental de uma única tentativa para essa capacidade é a tarefa de reconhecimento de objeto (ver ENNACEUR, 2010 para revisão). Essa tarefa compreende duas fases: uma fase de exposição prévia onde um grupo de dois ou mais objetos iguais é apresentado ao animal a ser testado e uma fase de teste propriamente dita que ocorre após um intervalo de tempo variável (usualmente 50 minutos) onde um dos objetos expostos anteriormente é substituído por um novo. É esperado que o objeto novo seja o preferido do animal e essa preferência pode ser medida por um maior tempo de exploração dedicado a ele (ENNACEUR & DELACOUR, 1988; DERE, HUSTON & DE SOUZA SILVA, 2007). Essa tarefa envolve um substrato neural complexo e parece ser composta por dois processos que parecem indissociáveis em modelos animais: a familiarização de um lado, e do outro lado a detecção e codificação do objeto novo (BROWN, WARBURTON & AGGLETON, 2010; ENNACEUR, 2010). Tais processos parecem envolver o córtex perirrinal e o hipocampo, respectivamente (BROWN & AGGLETON, 2001).

A memória de reconhecimento espacial ou simplesmente memória espacial refere-se à capacidade dos indivíduos que expostos a um grupo de objetos são capazes de reconhecer alterações na localização espacial prévia e identificar os objetos deslocados entre eles

(ENNACEUR & DELACOUR, 1988). O teste comportamental de uma única tentativa para essa capacidade é a tarefa de reconhecimento da localização espacial de objetos (MUMBY et al., 2002) adotada no presente trabalho, e que compreende igualmente duas fases: uma fase prévia de exposição onde um grupo de dois ou mais objetos iguais é apresentado ao animal a ser testado, e uma fase de teste propriamente dita onde um dos objetos previamente apresentados é deslocado de sua posição original para uma nova posição (DERE et al., 2007). É esperado que o objeto deslocado seja o preferido do animal e essa preferência pode ser medida por um maior tempo de exploração a ele dedicado. Essa tarefa parece envolver CA1, CA3 e o giro denteado com diferentes contribuições de cada qual (LEE & KESNER, 2004; MARTIN & CLARK, 2007).

### **1.3 A Contribuição do Giro Denteado no Reconhecimento da Forma e da Localização Espacial**

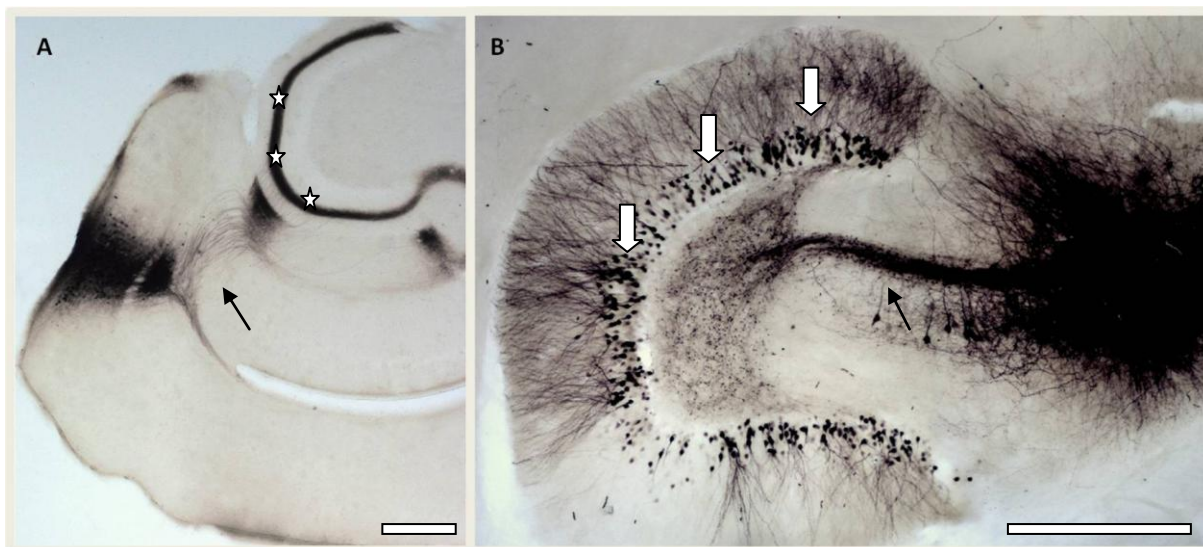
Dados de numerosos ensaios experimentais consolidaram a noção de que a integridade do hipocampo é essencial para a formação de memória episódica (em humanos) ou similar à episódica (em outros animais). Essas memórias respondem basicamente a três perguntas acerca do objeto que se examina: O que é?, onde estava? e quando?, possibilitando a distinção inambígua entre objetos novos e familiares (CRYSTAL, 2010). Para dar conta dessa tarefa o cérebro precisa acentuar as diferenças entre as experiências antigas e novas (Figura 2) antes que a codificação ocorra de modo a poder distingui-las (SCHMIDT, MARRONE & MARKUS, 2012). Para tanto, numerosas evidências apontam que a integridade do giro denteado é fundamental para esse processo e o seu comprometimento diminui a capacidade dos indivíduos lesionados de distinguir objetos (padrões) similares com padrões espaciais diferentes (GILBERT, KESNER & LEE, 2001). No mesmo trabalho esses autores demonstram que a separação de padrões temporais é função de CA1 (GILBERT et al., 2001). A figura 2 é um exemplo do desafio que nos é imposto quando temos que lembrar de eventos similares mas separados no tempo.

Na formação hipocampal dos mamíferos o giro denteado é caracterizado por enviar projeções unidirecionais poderosas para as células piramidais de CA3 através das fibras musgosas. Essas fibras formam um tipo único de sinapse rica em zinco que parece oferecer uma duplicata da informação que as células piramidais de CA3 já haviam recebido dos neurônios da camada II do córtex entorrinal e que projetam tanto para a camada molecular do giro denteado quanto para CA3, (Figura 3). Essa duplicata parece preencher os requisitos

necessários para lidar com o problema de ter que acentuar as diferenças entre os eventos, antes de codificá-los para poder distinguir o novo do velho, e essa tarefa tem sido denominada separação de padrões (do inglês “pattern separation”) (LEUTGEB & MOSER, 2007).



**Figura 2.** Como distinguir memórias de duas festas de aniversário que ocorreram em anos diferentes? Numerosas experiências semelhantes a essa (que ocorreram no mesmo lugar, contem as mesmas pessoas mas são distintas no tempo) precisam ter suas diferenças acentuadas para serem lembradas como experiências separadas antes de serem codificadas, e esse papel de acentuar as diferenças parece ser do giro dentado (LEUTGEB & MOSER, 2007).



**Figura 3.** Fotomicrografias para ilustrar a via perfurante marcada por transporte anterógrado (A) e as células granulares com suas fibras musgosas correspondentes marcadas por transporte retrógrado (B) com injeção de Dextrana biotinilada de diferentes pesos moleculares. (A) Neurônios da camada II do Córtex Entorrinal enviam projeções através da via perfurante (seta) para o terço médio da camada molecular do giro dentado (estrelas), onde fazem sinapses com dendritos dos neurônios da camada granular. (B) Células granulares (setas brancas) enviam seus axônios (seta preta), as fibras musgosas, para o stratum lucidum de CA3 (não ilustrado). (Oliveira, 2009, não publicado). Escala A - 250 $\mu$ m e B - 200 $\mu$ m.

Em estudos com camundongo knockouts para receptores de NMDA no giro denteado, incapazes portanto de originar LTP de forma seletiva nas sinapses da via perfurante com os dendritos das células granulares, observou-se que a performance dos camundongos no paradigma padrão de condicionamento para medo contextual não foi afetada em relação aos controles quando o teste de “freezing” (imobilidade do camundongo) era aplicado em uma segunda câmara com diferenças visuais marcantes. Entretanto quando as duas câmaras de teste eram tornadas menos distintas uma da outra e o condicionamento aplicado, o camundongo knockout era incapaz de distingui-las sendo punido com o estímulo aversivo (choques) pela escolha incorreta, enquanto que os animais controle aprendiam a evitar a escolha incorreta (MCHUGH et al., 2007).

Estudo subsequente comparou as propriedades das células granulares jovens (recém nascidas) em comparação com as velhas e encontrou que as células granulares jovens são a peça fundamental para a tarefa de separação de padrões espaciais, enquanto que as células granulares velhas responderiam pela propriedade de completar uma versão parcial de um padrão espacial familiar (NAKASHIBA et al., 2012). Estudos de ressonância magnética funcional em humanos revelaram que as regiões do giro denteado e CA3 estavam especialmente ativas durante as tarefas que exigiam a separação de padrões espaciais (LACY et al., 2011). Durante o envelhecimento a tarefa de separação de padrões espaciais parece tornar-se menos eficiente e esse decréscimo pode ser a origem dos déficits de memória espacial encontrados nesse período da vida (HOLDEN & GILBERT, 2012).

A capacidade de detectar quando um estímulo é novo ajuda o animal a focar sua atenção aos eventos no ambiente que potencialmente representam novas ameaças ou novas oportunidades. Qual seria a contribuição do giro denteado para essa tarefa?

A memória de reconhecimento de objeto pode ser subdividida em duas categorias: o reconhecimento do objeto em si mesmo e o reconhecimento associativo. O reconhecimento do objeto está relacionado ao item sob observação e identifica se se trata de um objeto novo ou familiar enquanto que o reconhecimento associativo identifica se um grupo de elementos familiares foi ou não espacialmente reconfigurado (AGGLETON, BROWN & ALBASSER, 2012).

Empregando genes de expressão rápida que não requerem síntese proteica prévia para serem ativados foi possível correlacionar o padrão de sua ativação com as tarefas comportamentais de interesse. Existem numerosos genes de expressão rápida e eles são classificados em dois grupos: fatores reguladores de transcrição que influenciam a função



celular através da ativação de outros genes que eles regulam e os genes denominados de fatores efetores que controlam diretamente a função celular de maneira específica. Os genes C-Fos e zif268 são fatores reguladores de transcrição e desempenham papéis na plasticidade de longo prazo (GUZOWSKI, 2002). A expressão transitória desses genes após estimulação de diferentes naturezas precede a de outros genes, daí a sua denominação (HERRERA & ROBERTSON, 1996).

As regiões que tiveram suas células ativas mapeadas através de genes de expressão rápida durante a estimulação, revelaram diferenças chave nos dois componentes da memória de reconhecimento de objeto indicando que a novidade do objeto é consistentemente associada à ativação em apenas duas regiões, o córtex perirrinal e a área visual associativa adjacente a área Temporal 2, enquanto que o reconhecimento associativo ativou C-Fos no hipocampo mas não no córtex perirrinal (AGGLETON et al., 2012). A falta da expressão de C-Fos no córtex perirrinal na tarefa de reconhecimento associativo foi interpretado como refletindo o fato de que o(s) item(s) sob observação permanece(m) familiar(es) ainda que apresentado(s) sob uma nova combinação. Por outro lado quando o reconhecimento foi associado com atividade C-Fos no hipocampo, havia sempre a exploração ativa do objeto novo envolvendo estimulação e processamento multissensorial e ativação das vias de projeção do córtex entorrinal para o hipocampo incluindo a via perfurante para o giro denteado e a projeção de CA3 previamente mencionada. Assim o giro denteado parece essencial para a tarefa de reconhecimento associativo.

Finalmente é importante ressaltar a contribuição do giro denteado para a neurogênese, função sem a qual o aprendizado espacial novo e as novas memórias espacial e de reconhecimento de objeto são dificultadas; (ver VUKOVIC et al., 2011 para revisão). A atividade de neurogênese na camada subgranular do giro denteado parece estreitamente relacionada à atividade sináptica normalmente aumentada pelo exercício voluntário e a estimulação nova multissensorial e cognitiva (VAN PRAAG et al., 2005; LI et al., 2010). Durante o envelhecimento, declínio cognitivo e diminuição da neurogênese caminham lado a lado, tendo sido demonstrado que a estimulação multissensorial e cognitiva através do ambiente enriquecido restaura a neurogênese e melhora o desempenho espacial em ratos velhos (SPEISMAN et al., 2012).

Para explorar mais diretamente o papel da neurogênese subgranular no processamento da novidade, avaliou-se o desempenho em tarefas de reconhecimento de objeto em camundongos adultos e velhos após a neurogênese ter sido interrompida por manipulação genética reversível ou por irradiação com R-X (DENNY et al., 2012). Nesse trabalho tornou-

se evidente que após 4-6 semanas após a irradiação ou ablação genética cessar, a exploração do objeto novo anteriormente prejudicada, tornou-se significativa, confirmando que a presença de novas células granulares é essencial para a formação de novas memórias e que a neurogênese associada era menor nos camundongos velhos em comparação aos jovens (DENNY et al., 2012). Da mesma forma o exercício voluntário melhora o desempenho em tarefas de reconhecimento de objetos, aumentando os níveis de fatores neurotróficos no córtex perirrinal e no hipocampo e esse desempenho foi tanto mais duradouro quanto mais jovem os ratos testados (HOPKINS, NITECKI & BUCCI, 2011).

Como as células neurais progenitoras residindo na camada subgranular do giro denteado são reguladas por fatores de crescimento e respondem ao microambiente ajustando seu nível de proliferação para determinar a taxa de neurogênese, é razoável supor que o giro denteado é uma peça chave para as memórias de reconhecimento de objeto (LI et al., 2012).

Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (DINIZ et al., 2012; DINIZ et al., 2010a) demonstrou-se através de avaliações comportamentais e do estudo da distribuição laminar de astrócitos no giro dentado em camundongos idosos e jovens, alojados desde o desmame, em gaiolas padrão (ambiente pobre) ou enriquecidas, que o empobrecimento ambiental agrava o declínio cognitivo associado ao envelhecimento e que esse efeito parece estar associado à mudanças na distribuição laminar astrocítica no giro denteado (DINIZ et al., 2010b). A análise quantitativa da distribuição laminar dos astrócitos no giro dentado revelou que a camada molecular desenvolveu astrocitose em resposta ao enriquecimento ambiental e ao envelhecimento, a camada polimórfica foi alterada apenas pelo envelhecimento e a camada granular não mudou o número de astrócitos. Sugeriu-se que essas duas condições (envelhecimento e enriquecimento) podem induzir a proliferação de diferentes fenótipos morfológicos de astrócitos. Esses resultados são consistentes com relatos anteriores mostrando que os ambientes empobrecido ou enriquecido poderiam impedir (SPANGLER et al., 1994; WINOCUR, 1998; VAN DER STAAAY, 2002) ou preservar (PETROSINI et al., 2009), respectivamente, o desenvolvimento cognitivo normal.

Dando prosseguimento a esses esforços iniciais voltados para os astrócitos, investigamos o impacto do estresse perinatal imediato e do exercício tardio na morfologia microglial de ratos adultos e senescentes da região septal lateral expandindo essas observações (DE LIMA, 2012). Nesse trabalho investigou-se se as mudanças morfológicas microgliais induzidas pelo envelhecimento eram influenciadas por mudanças no tamanho da ninhada no início da vida e por um estilo de vida sedentário. Para avaliar essas questões, ratos da variedade Wistar amamentados em ninhadas de 6 ou 12 filhotes por nutriz foram mantidos

sedentários em grupos de 2-3 do 21<sup>o</sup> dia pós-natal em diante. Aos 4 (adulto) ou aos 23 (velho) meses de idade, metade dos ratos sedentários foram submetidos a regime progressivo de exercício em esteira rolante, durante cinco semanas, enquanto os demais permaneceram sedentários. Depois de testes de memória espacial e de reconhecimento da forma de objetos, todos os animais foram sacrificados e tiveram seus cérebros processados para imunomarcção seletiva para microglias/macrófagos com anticorpo anti Iba-1. A seguir uma fração representativa das células imunomarcadas do septum lateral foi reconstruída em três dimensões usando o programa Neurolucida e as características morfológicas de cada célula reconstruída foi quantificada com o software Neuroexplorer. Foi encontrado que o estilo de vida sedentário de ratos Wistar mantidos em gaiolas padrão de laboratório durante toda a vida está associado a déficits de memória espacial em indivíduos maduros e idosos, não importando o tamanho da ninhada, e que o exercício reduziu esse efeito nos indivíduos de ninhadas pequenas, mas não nos de ninhadas grandes. Por outro lado todos os indivíduos idosos e sedentários não importando o tamanho da ninhada tiveram sua memória de reconhecimento de objeto prejudicada, e o exercício reduziu esse efeito em ambos os grupos. A análise da morfologia microglial revelou que a área e o perímetro do corpo celular e o volume dos ramos parecem ser afetados mais intensamente pelo envelhecimento e que essa alteração é mais acentuada nos animais de ninhada grande. Além disso, observou-se retração e espessamento dos ramos nos animais velhos em maior proporção nos animais sedentários de ninhadas grandes.

Nesta dissertação empregou-se parte dos mesmos animais empregados por De Lima, 2012, removendo apenas o grupo exercitado, mudando apenas a área alvo sob investigação que passou a ser a camada molecular do giro denteado por todas as razões previamente enumeradas.

## 2. OBJETIVO GERAL

Postas as razões, elegemos para o presente trabalho investigar possíveis alterações na morfologia glial da camada molecular do giro denteado em ratos jovens e envelhecidos submetidos a estresse pós-natal imediato, comparando o desempenho cognitivo de animais provenientes de ninhadas grandes e pequenas, predizendo que o fenótipo morfológico microglial estaria tanto mais alterado quanto maior o declínio cognitivo encontrado.

### 2.1. Objetivos Específicos

Investigar em *Rattus norvegicus* da variedade Wistar, aos 4 e aos 23 meses de idade, possíveis influências do tamanho da ninhada sobre:

- memórias de reconhecimento da identidade e da localização espacial de objetos;
- morfologia tridimensional detalhada das microglias da camada molecular do giro denteado;
- possíveis interações entre as variáveis tamanho da ninhada e idade.

### 3. MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais utilizados foram submetidos e aprovados pelo Comitê Institucional que regulamenta a utilização de animais em pesquisas científicas da Universidade Federal de Pernambuco e manuseados de acordo com as recomendações contidas no documento “Principles of Laboratory Animal Care” do National Institute of Health – NIH (USA).

#### 3.1. Grupos Experimentais

Os animais utilizados foram obtidos da colônia de ratos Wistar, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

Fêmeas adultas com acesso livre a comida e água foram alimentadas com ração para roedores peletizadas (Purina do Brazil Ltda) com 23% de proteína e mantidas em grupo de dois ou três indivíduos. Após o acasalamento e a gestação, as ratas grávidas pariram de sete a doze filhotes por ninhada. Um método direto para indução de níveis de competição entre irmãos e de cuidado materno diferenciado durante o período de lactação, consiste em alterar o número de filhotes por ninhada (RIVERA, 2003).

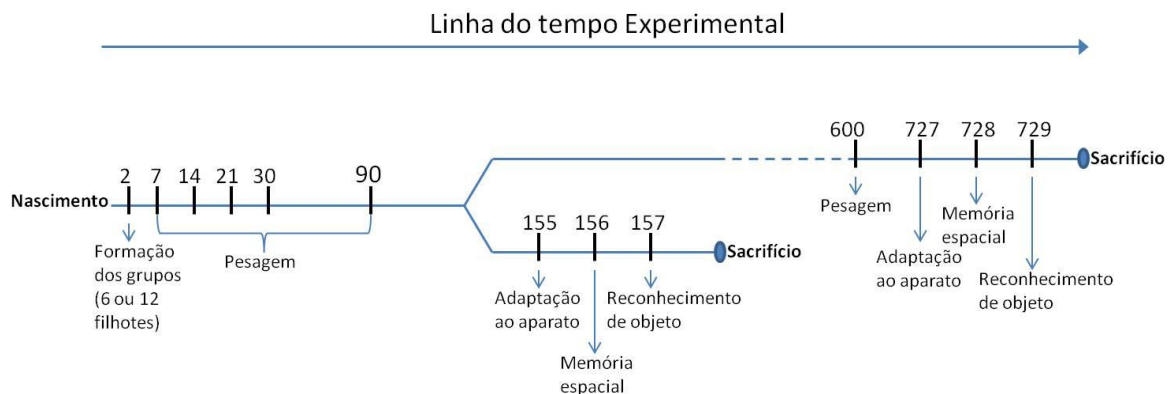
Para manipular o cuidado materno e o nível de competição pelas tetas, as ninhadas foram reorganizadas 48h após o nascimento para constituir ninhadas pequenas (seis filhotes por nutriz, N = 10) ou grandes (12 filhotes por nutriz, N = 10). Foram utilizados 20 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, mantidos sob as condições de cuidado materno regular ou cuidado materno reduzido durante o período de lactação. Dessa maneira, a quantidade de leite materno e o comportamento da nutriz são de qualidade e quantidade normal, porém os animais das ninhadas maiores recebem menor cuidado e experimentam um nível de competição maior, uma vez que a quantidade de tetas não é suficiente para amamentar todos a um só tempo e a mãe necessita dividir os cuidados maternos individuais entre os filhotes. A formação e o número de animais por grupo estão sumariados na Tabela 1.

Também se pressupôs amparados na literatura (JANS & WOODSIDE, 1987; MORAG, POPLIKER & YAGIL, 1975; YAGIL, ETZION & BERLYNE, 1976) que nesses dois tamanhos de ninhadas não ocorre subnutrição, mas que cada filhote da ninhada grande (12:1) recebeu menos lambidas e cuidados de limpeza maternos e que estariam sob maior nível de competição pelas tetas quando comparados aos filhotes da condição 6:1.

**Tabela 1- Número de Animais Por Grupo Experimental**

	NG	NP
<b>Jovem</b>	N=5	N=5
<b>Velho</b>	N=5	N=5

Os pesos corporais foram medidos em diferentes janelas temporais de modo a seguir sua evolução nas diferentes condições experimentais. A sequência experimental em função do tempo (antes e após o período de aleitamento) é apresentada na figura 4.



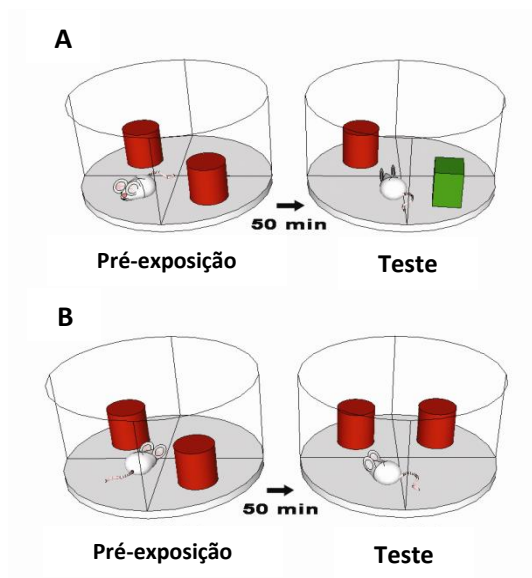
**Figura 4: Sequência experimental em função do tempo.** Os números indicam o tempo decorrido em dias após o nascimento. A sequência de procedimentos é a mesma para ninhadas grandes (12 filhotes por nutriz) e pequenas (6 filhotes por nutriz).

### 3.2. Ambiente e Condições Sedentárias

Após o período de amamentação todos os grupos experimentais foram constituídos por machos, mantidos com acesso livre a água e comida com a mesma ração peletizada adotada para as nutrizas e referida anteriormente. Os animais foram mantidos em grupos de 2 ou 3, em gaiolas de polipropileno (51 x 35.5 x 18.5 cm) em sala com controle de luminosidade e ciclos claro-escuro de 12h, iniciando o ciclo claro as 6:00h da manhã, e com temperatura ambiente de  $23^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ , reproduzindo as condições padrão da maioria dos alojamentos de animais de laboratório.

### 3.3. Testes Comportamentais

Todos os ratos, jovens e velhos, independente do tamanho da ninhada foram submetidos à testes de reconhecimento de objeto e memória espacial. A figura 5 ilustra em diagrama esquemático os fundamentos dos testes que no caso específico do presente trabalho, correspondem ao grupo de testes de uma única tentativa, onde após um período de exposição aos objetos e um intervalo de tempo previamente definido os animais são re-expostos a objetos deslocados (memória de reconhecimento espacial) ou a objetos novos (memória de reconhecimento da identidade do objeto).



**Figura 5: Aparato dos testes comportamentais.** Diagrama esquemático ilustrando os testes de memória espacial e de reconhecimento de objeto. A- Reconhecimento da identidade do objeto: nesse teste é esperado que os ratos gastassem mais tempo explorando o objeto novo do que o familiar. B- Reconhecimento da nova localização do objeto: nesse teste é esperado que os ratos gastassem mais tempo explorando o objeto deslocado do que o estacionário. Figura modificada a partir de (ENNACEUR et al. 2005).

O equipamento para o teste de reconhecimento de objeto e memória espacial consistiu de uma arena circular de madeira de paredes envernizadas. O chão era pintado com linhas que o dividiam em 4 quadrantes e a luminância no centro da arena estava em torno de 2.4 cd/m<sup>2</sup>. O protocolo detalhado e as razões para escolha dos testes foram providas e discutidas em publicação prévia (DERE et al., 2007; Tulving, 2001; ENNACEUR et al., 2005).

Em poucas palavras os ensaios comportamentais a seguir descritos foram realizados em cinco dias: um dia para habituação ao campo aberto, dois dias para habituação aos objetos e dois dias para os testes propriamente ditos: um dia para cada teste. Para minimizar a influência da preferência natural por um ou outro objeto, escolhemos objetos de mesmo material, mas de geometrias diferentes que poderiam ser facilmente discriminados e tinham possibilidades de interação comparáveis (DERE, HUSTON & DE SOUZA SILVA, 2005).

Assim, todos os objetos usados eram de plástico, com formas, alturas, e cores diferentes. Antes da entrada do rato na arena, os objetos, o assoalho e as paredes da arena eram limpos com álcool a 75% para minimizar as pistas olfatórias.

- *Habituação ao campo aberto*: cada sujeito era colocado na arena livre de objetos, por cinco minutos para que explorasse o campo aberto.
- *Habituação aos objetos*: cada sujeito era exposto a dois objetos idênticos colocados em dois quadrantes da arena por cinco minutos, três vezes, com 50 minutos de intervalo entre as exposições durante os quais eles retornavam as suas gaiolas. Esses objetos utilizados na habituação não eram usados no dia do teste.
- *Fase de Teste*: o teste de reconhecimento de uma única tentativa foi aplicado em dois dias consecutivos e corresponderam aos testes de reconhecimento da identidade (reconhecimento da forma) e da localização espacial do objeto (reconhecimento da localização espacial).
- *Teste de Reconhecimento da Identidade do Objeto*: consistiu de três momentos: exposição de cinco minutos de duração (fase de pré-exposição) durante os quais os sujeitos exploravam dois objetos idênticos, intervalo de 50 minutos e nova exposição (fase de teste) de cinco minutos durante os quais um dos objetos familiares (já explorados durante a fase pré-exposição) era substituído por um objeto novo. Os objetos utilizados diferiam em forma, dimensões e textura e não tinham nenhum significado etológico para os ratos. Nesse teste era esperado que os sujeitos gastassem mais tempo explorando o objeto novo em comparação ao familiar.
- *Teste de Reconhecimento da Localização Espacial do Objeto*: seguia o mesmo procedimento adotado para o teste de reconhecimento da identidade do objeto exceto que os objetos permaneciam os mesmos e que na fase de teste um dos objetos idênticos era deslocado para uma nova posição (objeto deslocado). Nesse teste era esperado que os ratos gastassem mais tempo explorando o objeto deslocado quando comparado ao estacionário.

O registro consistia essencialmente em medir o tempo (em segundos) que os sujeitos gastavam em cada objeto durante a fase de teste em relação ao tempo de exploração total dos objetos, definindo-se valores para o reconhecimento da identidade do objeto (novo *versus* familiar) e para o reconhecimento da localização espacial (deslocado *versus* estacionário).



Para padronizar o início e o fim da contagem do tempo de exploração em cada objeto, os cronômetros controlados por dois experimentadores eram disparados sempre que um rato se aproximava de um objeto permanecendo com a cabeça voltada para o objeto a uma distância não maior do que 3 cm deste. Para dar precisão a essa medida pintou-se no assoalho um círculo concêntrico em torno do objeto de modo que os experimentadores pudessem acionar os cronômetros sempre que a cabeça invadia essa região. Essa definição exigia que os objetos permanecessem no mesmo lugar durante a exploração e para isso escolhiam-se objetos pesados para a interação.

Os dados comportamentais foram analisados utilizando estatística paramétrica e teste t bicaudal para grupos interdependentes, estabelecendo-se como significantes as diferenças nos valores percentuais de exploração dos objetos calculados em relação ao tempo total de exploração, cujos valores de p (densidade de probabilidade) não eram maiores do que 0,05 (Dix and Aggleton 1999). Critério adicional era exigido para que se considerassem diferentes os tempos percentuais de exploração, definindo como 60% o valor mínimo aceitável no tempo de exploração do objeto mais explorado.

### **3.4. Procedimentos Histológicos e Microscopia Tridimensional**

Após os testes comportamentais todos os animais foram pesados e anestesiados com uma dose letal de tribromoetanol (0.04ml/g de peso corporal) e a seguir perfundidos com solução salina heparinizada seguida de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 – 7.4. Séries alternadas de secções de 70µm de espessura obtidas em um vibrátomo (Micron), foram imunomarcadas com anticorpo policlonal (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure Chemical Industries Ltda., Osaka, Japan) dirigido contra a proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado Iba-1, um marcador seletivo para microglia/macrófagos. Normalmente a proteína Iba-1 funciona como uma molécula adaptadora ligante de cálcio na linhagem monocítica, que inclui a microglia (ITO et al., 1998). Para imunomarcção as secções foram tratadas para recuperação antigênica flutuando livremente em uma solução de ácido bórico 0.2 M pH 9.0, durante 60 minutos à 65-75°C, resfriadas a temperatura ambiente no mesmo tampão e então lavadas em tampão fosfato/solução salina 0,1M pH 7.2 – 7.4 (PBS) por três vezes durante 2 minutos. A seguir foram imersas por 20 minutos em soro normal de cabra a 10% e então incubadas no anticorpo primário anti Iba-1 (2µg/ml em PBS), por três dias a 4° C com agitação suave e contínua. Após essa etapa as secções foram lavadas novamente em PBS e imersas em solução contendo o anticorpo secundário por 12h (cabra anti-coelho 1:250 em

PBS, Vector Laboratories), inativamos a enzima peroxidase endógena imergindo as secções em uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio em PBS durante 2 minutos. As secções foram lavadas em PBS três vezes por dois minutos e então transferidas para uma solução de avidina-peroxidase diluída em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 – 7.4 (ABC) e após uma hora foram lavadas novamente em PBS por três vezes durante dois minutos e incubadas em tampão acetato 0.1 M (pH 6,0) por quatro minutos antes de serem incubadas na solução de glucose-oxidase/DAB/Níquel (0.6 mg/ml diaminobenzidina; 2,5 mg/ml de cloreto de níquel e amônio e 0,1 mg/ml de glicose oxidase (GND) (SHU, JU & FAN, 1988). A solução de GND foi utilizada para acentuar o contraste entre os sítios de marcação e a coloração de fundo inespecífica através da utilização do níquel, e ao mesmo tempo prolongar o tempo de reação pela liberação lenta de oxigênio nascente permitindo maior controle dos resultados. A confirmação da especificidade da reação foi feita pela remoção do anticorpo primário o que resultou na ausência de imunoreatividade nas secções (SAPER & SAWCHENKO, 2003).

Para a reconstrução tridimensional das microglias da camada molecular do Giro denteado utilizou-se o microscópio óptico (Optiphot2, NIKON) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para conversão digital da informação relativa às coordenadas espaciais (X, Y, Z) de cada ponto digitalizado. Esse sistema é acoplado a microprocessador que controla os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (NeuroLucida, MicroBrightField, Williston, VT, USA) e estoca as coordenadas dos pontos de interesse. No sentido de se evitar ambiguidades na identificação dos objetos de interesse e garantir maior precisão nas reconstruções, primeiro localizou-se a camada com a objetiva de 4,0 x e após fez-se a substituição pela objetiva PLANFLUOR, 100X (NA 1.3; DF = 0.2  $\mu$ m; Nikon, Japan) utilizada para as reconstruções tridimensionais.

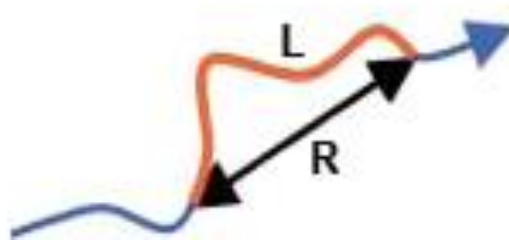
O estudo morfológico fornece dados para uma análise qualitativa e quantitativa e permite também a determinação da distribuição dos objetos de interesse reconstruídos (ACSADY et al., 1998).

As reconstruções microglicais foram feitas a partir da camada molecular do Giro Denteado e somente aquelas que apresentavam terminações completas foram utilizadas.

Ao final a seleção da microglia a ser reconstruída permitiu garantir que apenas aquelas com arborizações completas (íntegras) foram utilizados para análise. As microglias seccionadas durante o corte por vibrátomo foram excluídas. Nós aplicamos correção para retração induzida pelo processamento histológico nos dados da morfometria de forma linear para todos os grupos experimentais exclusivamente para o eixo z onde presumiu-se 60% de

retração. Em cada grupo foram reconstruídas 30 microglias, no total de 120. Essas células foram submetidas à análise morfológica realizada com o programa Neuroexplorer (MicroBrightField, Williston, VT, USA).

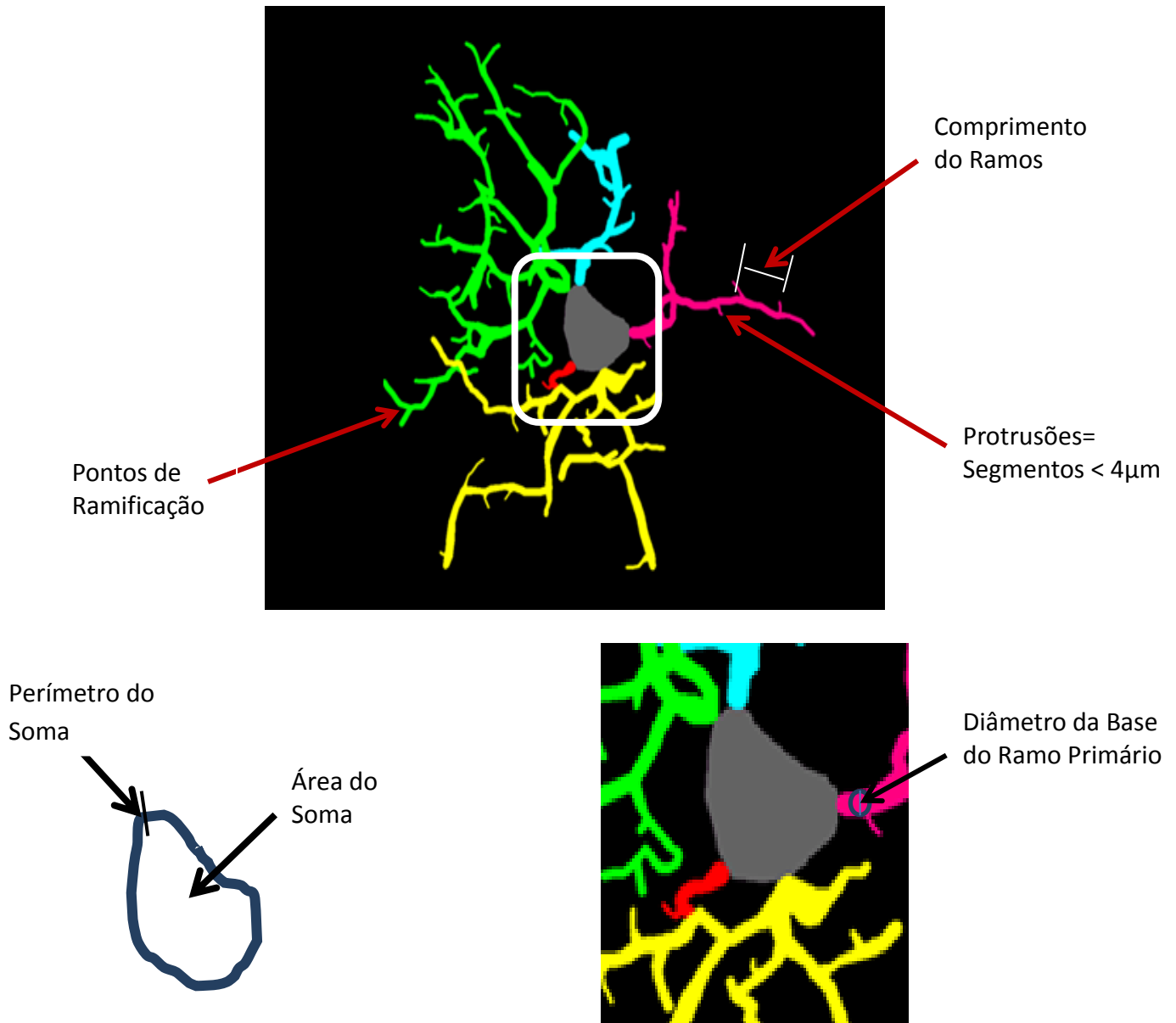
Os itens morfológicos das microglias reconstruídas submetidos à análise quantitativa estão indicados na tabela 2 e alguns destes itens são representados na figura 6 e 7. A média aritmética e o erro padrão foram calculados para cada variável morfológica para todos os grupos experimentais. Em raras ocasiões valores extremos foram detectados e excluídos de todas as amostras com base em análises de quartis para detectar valores extremos em amostras com distribuição normal. A normalidade foi testada com o software BioEstate 5.0 utilizando o teste D'Agostino's K-squared test, assumindo distribuição normal para valores de  $p < 0,05$ . As análises de variância com ANOVA dois critérios foram realizadas com o software GraphPad Instat 3.10, considerando valores de  $p < 0,05$ .



**Figura 6:** Tortuosidade (T) é a razão entre os valores de L e R ( $T=L/R$ ). (Adaptado de SANTOS-FILHO, 2007).

**Tabela 2 – Parâmetros morfológicos analisados**

Perímetro do soma	Medida do contorno do soma
Área do soma	Área definida pelo contorno do soma
Convexidade	Comprimento do envoltório convexo dividido pelo comprimento do perímetro real. O envoltório convexo é um contorno imaginário, no qual o ângulo entre quaisquer dois segmentos de linhas adjacentes é convexo, de tal forma que este contorno imaginário se encaixa no contorno real o mais próximo possível
Número de protrusões	Soma total do número de processos $\leq 2,5\mu\text{m}$ de cada microglia
Número de pontos de ramificações	Soma total de todos os pontos de ramificação originando dois ou mais segmentos
Quantidade de ramos	Número total de ramos (que não sejam protrusões)
Área dos ramos	Área específica de um ramo
Volume dos ramos (segmentos)	$V = 1/3 * \text{Pi} * L ((R1 * R1) + (R2 * R2) + (R1 * R2)), \text{ onde:}$ <p>L = comprimento do segmento; R1=raio no início do segmento</p> <p>R2 = raio no fim do segmento</p>
Tortuosidade	A tortuosidade da arborização microglial é a relação entre o comprimento de um ramo (segmento) e a distância entre os seus pontos de finalizações
Diâmetro da base do ramo primário	O diâmetro do primeiro ponto de cada ramo

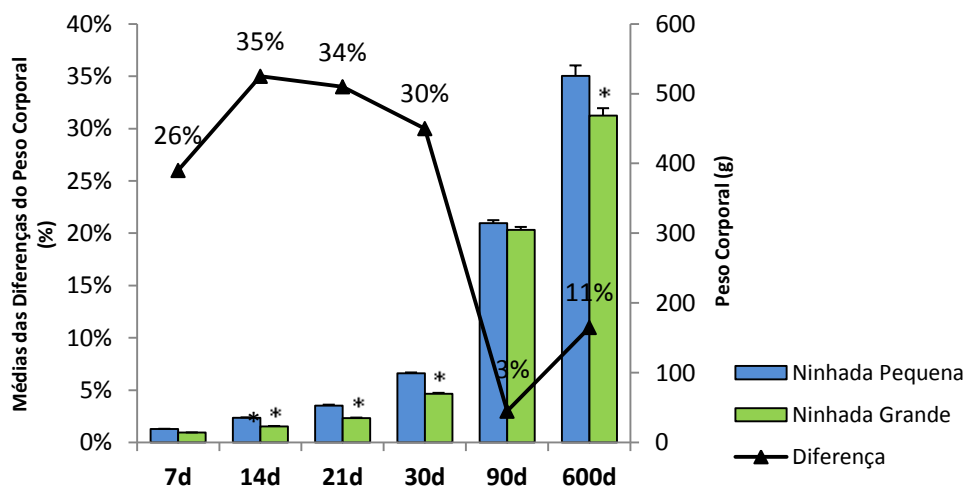


**Figura 7:** Desenho esquemático mostrando alguns dos parâmetros morfométricos analisados pelo programa Neurolúcida.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evolução do Peso Corporal

A figura 8 ilustra a evolução do peso corporal dos diversos grupos experimentais indicando a média e os erros padrão para cada grupo após 7, 14, 21, 30, 90, e 600 dias pós-natal. Foi detectado ganho de peso progressivo e significativo independente do tamanho da ninhada em todas as janelas temporais. Quando comparados aos animais de ninhadas pequenas os valores médios dos pesos dos animais das ninhadas grandes foram significativamente menores do 7º ao 30º dia pós-natal. Após esse período as diferenças dos pesos corporais médios dos diferentes grupos desapareceram. Entretanto aos 600 dias após o nascimento os animais das ninhadas pequenas apresentaram peso corporais maiores do que os das ninhadas grandes. As diferenças médias maiores foram encontradas entre os pesos dos animais de 14 e 21 dias pós-natal.

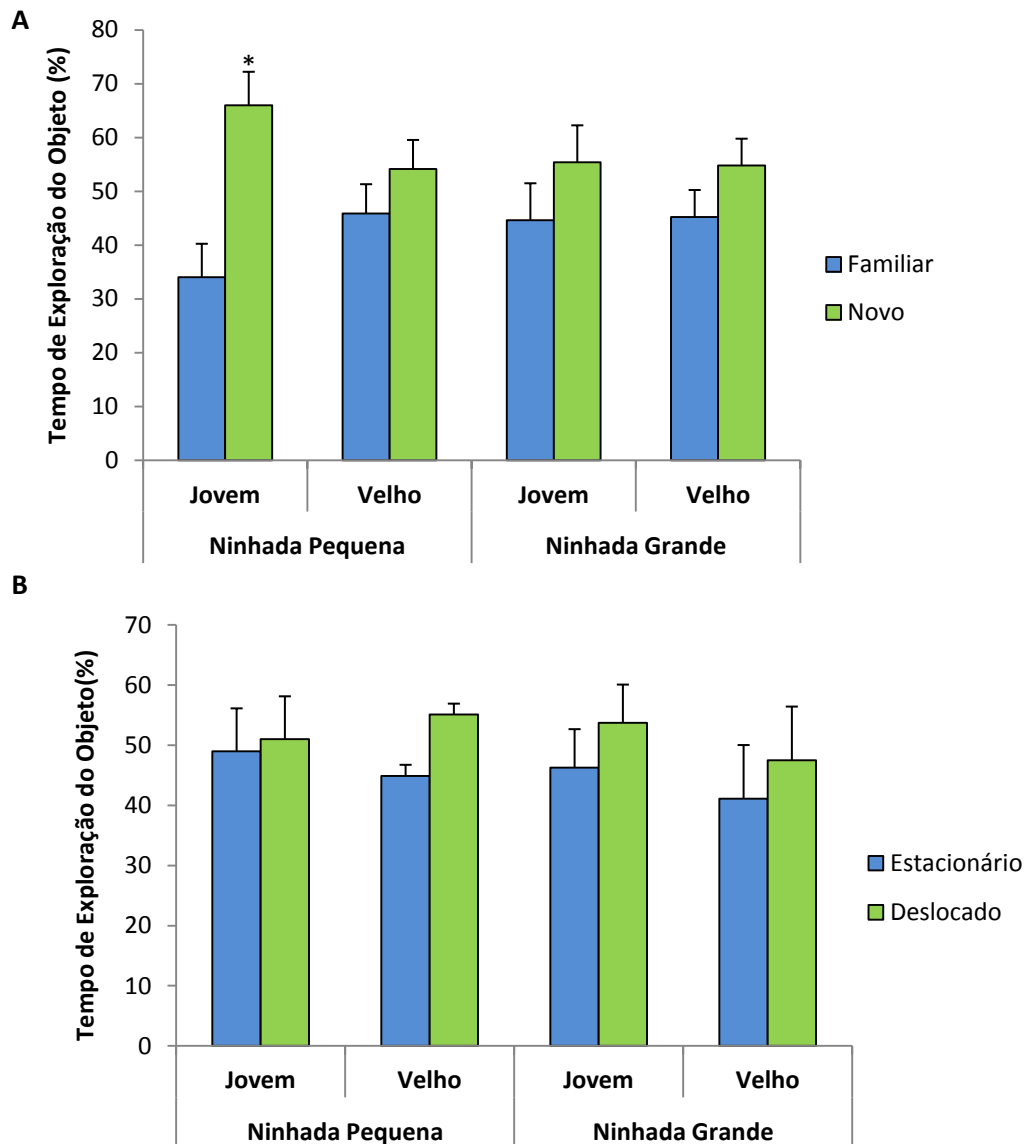


**Figura 8: Peso dos animais.** Evolução do peso corporal nos diferentes grupos experimentais. O eixo dos Y representa as médias aritméticas dos pesos corporais (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande) em função da idade. (\*) indica diferenças significativas após teste T bi-caudal ( $p < 0,05$ ).

### 4.2. Teste de Memória

Os resultados dos testes de reconhecimento da identidade (figura 9) e da localização espacial de objetos (figura 9B) são ilustrados na figura 9. Em conjunto, eles demonstram que a vida sedentária prejudica a memória espacial de ratos Wistar adultos e velhos independente

do tamanho da ninhada e que o exercício reduz esse efeito nos animais velhos oriundos de ninhadas pequenas, mas não nos de ninhada grande. Por outro lado, todos os animais velhos sedentários independentemente do tamanho da ninhada e os sedentários adultos de ninhada grande tiveram prejudicada sua memória de reconhecimento da identidade do objeto e que o exercício reduziu esse impacto em todos os animais (De Lima, 2012)



**Figura 9: Teste de memória.** Reconhecimento da forma (A) e da localização espacial (B) dos objetos. Os resultados são expressos em valores percentuais do tempo total de exploração. (\*) indica diferença significativa Após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1. Teste de Reconhecimento de Identidade do Objeto (O quê?)

Os ratos jovens de ninhadas pequenas, mas não os de ninhadas grandes, puderam

distinguir objetos novos de objetos familiares; em contraposição, os animais velhos independentemente do tamanho da ninhada não puderam distinguir os objetos.

#### 4.2.2 Teste de Reconhecimento da Localização Espacial (Onde?)

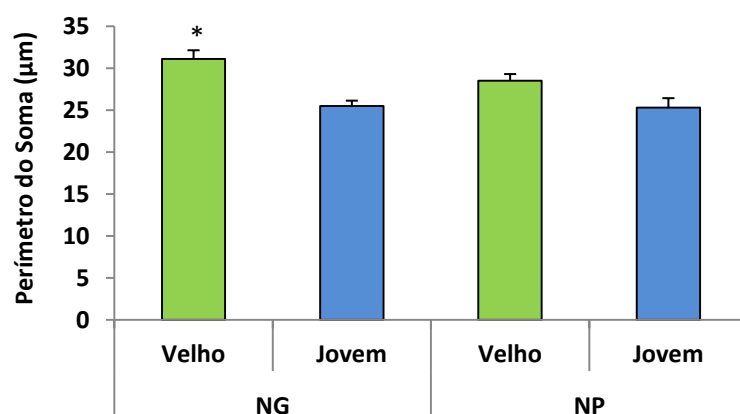
Todos os animais independentemente do tamanho da ninhada foram incapazes de distinguir os objetos estacionários dos deslocados.

#### 4.3. Análise Tridimensional da Morfologia Microglial da Camada Molecular do Giro Denteado

A análise estatística empregando ANOVA dois critérios para cada variável morfométrica aplicada a todos os grupos experimentais revelou influência variável do tamanho da ninhada e envelhecimento (Tabelas 3 e 4).

De posse dos resultados observamos que dos 10 parâmetros morfométricos analisados seis foram influenciados pelo tamanho da ninhada (Figuras 11, 13, 16, 17, 18, 19), dez foram influenciados pela idade (Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19), e seis foram influenciados por ambas as variáveis (Figuras 11, 13, 16, 17, 18, 19).

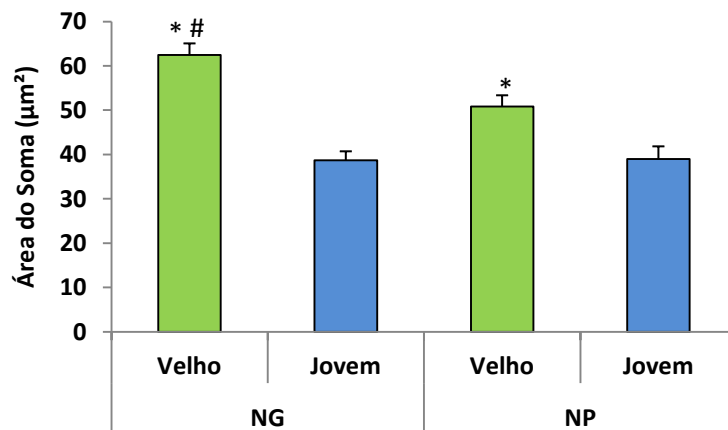
Com relação ao perímetro do soma, observamos que as microglias de animais velhos possuem somas com maior perímetro quando comparadas as microglias de animais novos. Foi encontrada diferença significativa entre os animais velhos e jovens oriundos de ninhada grandes (Figura 10).



**Figura 10: Perímetro do soma.** O eixo Y representa as médias aritméticas dos perímetros do soma (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idades, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

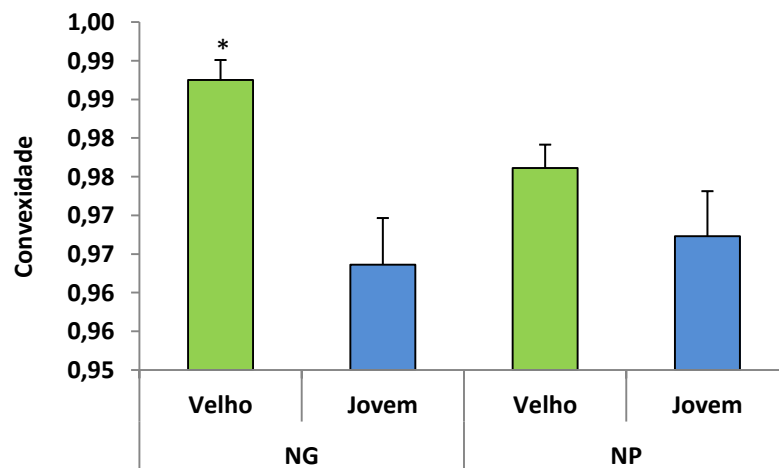


Analisando a área do soma, foi observado que microglias de animais velhos possuem somas com maior área quando comparados com as de animais jovens, encontrando-se diferença significativa entre animais velhos de ninhada grande e ninhada pequena, entre animais jovens e velhos de ninhada grande e entre animais jovens e velhos de ninhada pequena (Figura 11).



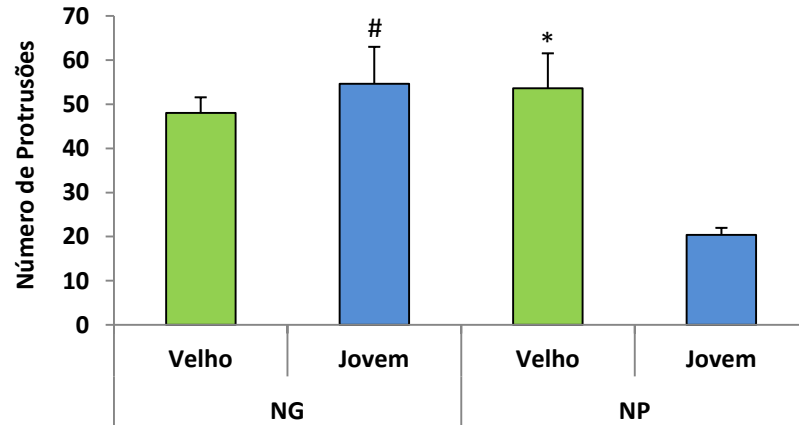
**Figura 11: Área do soma.** O eixo Y representa as médias aritméticas da área do soma (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idades e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

Quando analisamos a convexidade, encontramos que microglias de animais velhos são mais convexas do que as de animais novos, observando diferença significativa entre animais jovens e velhos de ninhada grande (Figura 12).



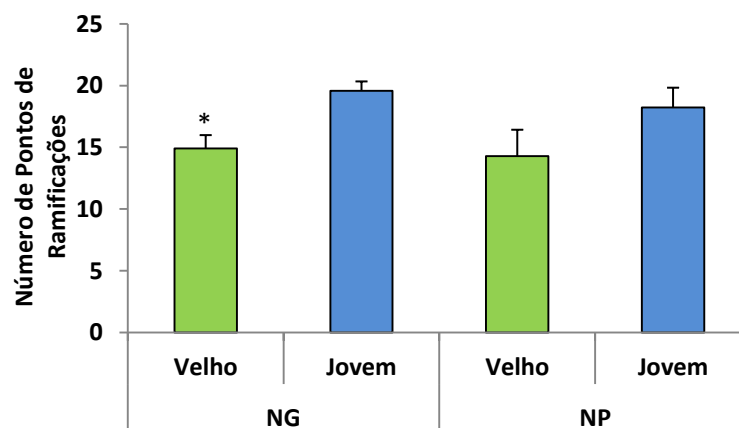
**Figura 12: Convexidade.** O eixo Y representa as médias aritméticas das convexidades (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idade, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao número de protrusões, foi observada diferença significativa entre os animais jovens de ninhada grande e ninhada pequena e entre animais jovens e velhos de ninhada pequena.



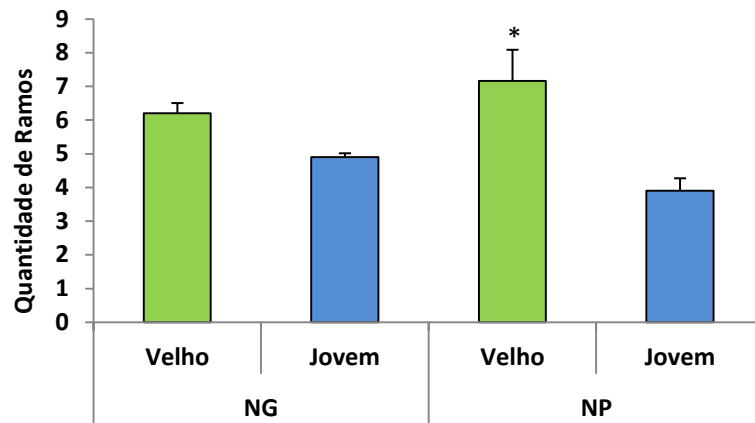
**Figura 13: Número de protrusões.** O eixo Y representa as médias aritméticas do número de protrusões (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idades e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ )

Com relação ao número de pontos de ramificações, foi encontrado que animais jovens possuem microglias com maior número de pontos de ramificação quando comparado com animais velhos, observando diferença significativa entre animais velhos e jovens de ninhada grande (Figura 14).



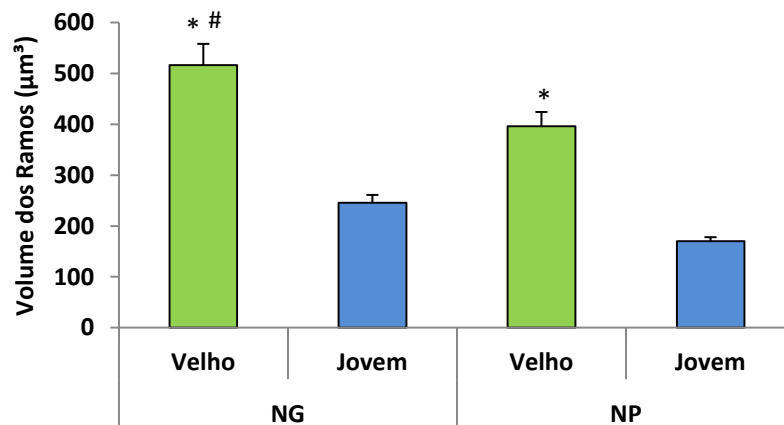
**Figura 14: Número de pontos de ramificações.** O eixo Y representa as médias aritméticas do número de pontos de ramificações (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idades, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

Em se tratando do número de ramos, foi encontrado que animais velhos possuem microglias mais ramificadas quando comparadas com animais jovens, sendo observada diferença significativa entre animais jovens e velhos de ninhada pequena (Figura 15).



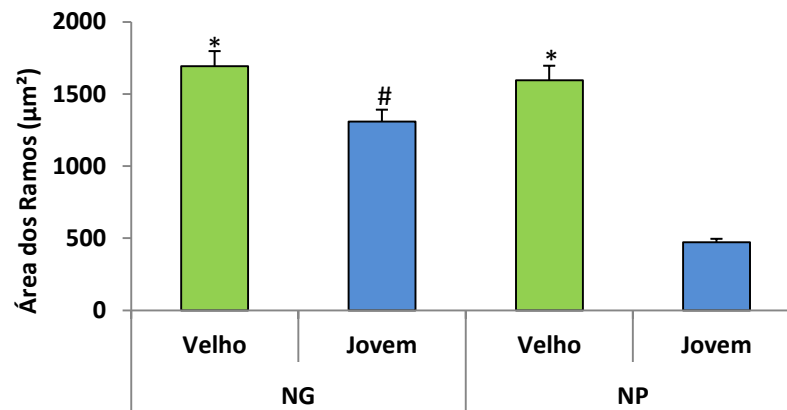
**Figura 15: Quantidade de ramos.** O eixo Y representa as médias aritméticas da quantidade de ramos (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idades, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao volume dos ramos, foi encontrado que animais velhos possuem microglias com ramos mais volumosos quando comparados com animais jovens, sendo observada diferença significativa entre animais velhos de ninhada grande e ninhada pequena, animais jovens e velhos de ninhada grande e animais jovens e velhos de ninhada pequena (Figura 16).



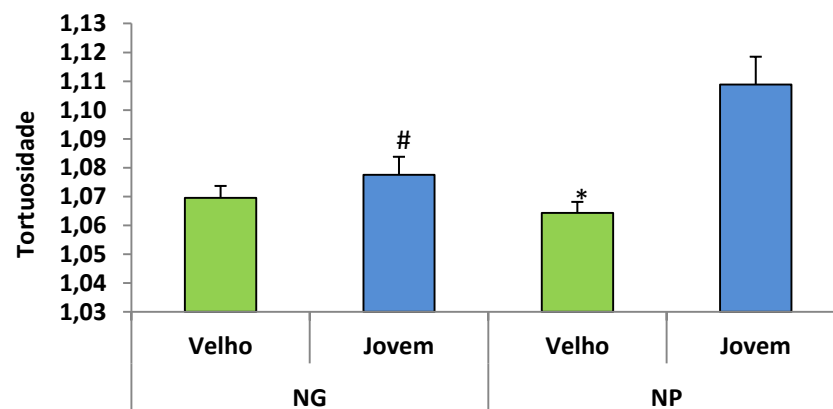
**Figura 16: Volume dos ramos.** O eixo Y representa as médias aritméticas do volume dos ramos (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idades e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

Com relação à área dos ramos, encontrou-se que microglias de animais velhos possuem ramos com maior área quando comparadas com microglias de animais jovens, observando-se diferença significativa entre animais jovens de ninhada grande e ninhada pequena, entre animais jovens e velhos de ninhada grande e entre animais jovens e velhos de ninhada pequena (Figura 17).



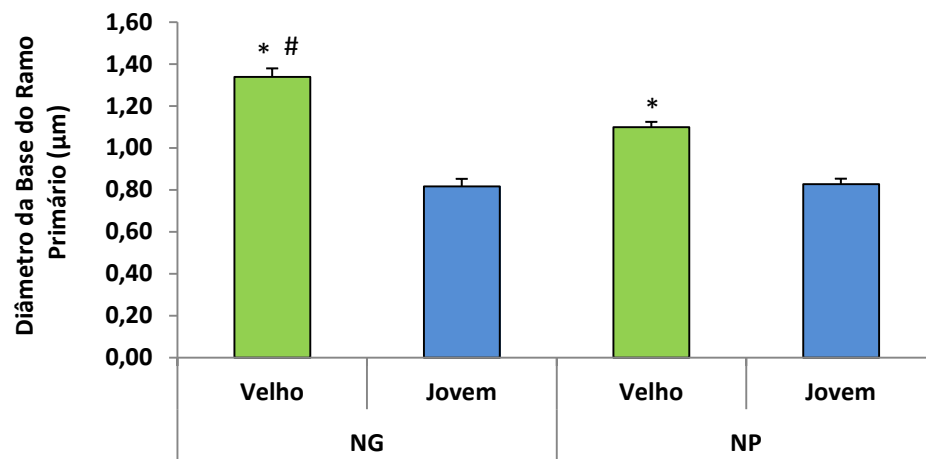
**Figura 17: Área dos ramos.** O eixo Y representa as médias aritméticas da área dos ramos (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idades e (#) ninhada, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

Quanto à tortuosidade, encontramos que animais jovens possuem microglias mais tortuosas quando comparados com animais velhos, observando-se diferença significativa entre animais jovens de ninhada grande e ninhada pequena (Figura 18).



**Figura 18: Tortuosidade.** O eixo Y representa as médias aritméticas da tortuosidade (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) idades e (#) ninhada, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

Por fim, com relação ao diâmetro da base do ramo primário, encontramos que animais velhos possuem microglias com os ramos primários de maior diâmetro quando comparados com animais jovens, observando-se diferença significativa entre animais velhos de ninhada grande e ninhada pequena, entre animais velhos de ninhada grande e entre animais velhos de ninhada pequena (Figura 19).



**Figura 19: Diâmetro da base do ramo primário.** O eixo Y representa as médias aritméticas do diâmetro da base do ramo primário (média  $\pm$  erro padrão da média) de ratos oriundos de ninhadas de 6 filhotes (ninhada pequena - NP) e 12 filhotes por nutriz (ninhada grande - NG) em função da idade: jovem e velho; (\*) indica diferenças significativas entre as idades e (#) ninhadas, após ANOVA dois critérios ( $p < 0,05$ ).

Os valores estatísticos encontrados após a análise das variáveis morfométricas relativas ao soma microglial e relativas aos ramos microgliais, avaliadas no presente trabalho, estão expostos nas tabelas 3 e 4.

TABELA 3. Variáveis morfométricas relativas ao soma microglial.

SOMA								
COMPRIMENTO			ÁREA			CONVEXIDADE		
Interaction	F (1.16)= 1.63	p=0,2197	Interaction	F (1.16)= 5.40	p=0,0336	Interaction	F (1.16)= 3	p=0,073
Idade	F (1.16)= 22.63	p=0,0002	Idade	F (1.6)= 48.13	p< 0.0001	Idade	F (1.6)= 13	p=0,0023
TN	F (1.16)= 2.32	p=0,1474	TN	F (1.16)= 4.89	p=0,0419	TN	F (1.16)= 0	p=0,5315
	<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>		<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>		<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>
<b>VELHO-NG</b>	P > 0.05	P<0.01	<b>VELHO-NG</b>	P < 0.05	P<0.001	<b>VELHO-NG</b>	P > 0.05	P<0.01
<b>JOVEM-NP</b>	P > 0.05	P > 0.05	<b>JOVEM-NP</b>	P<0.01	P > 0.05	<b>JOVEM-NP</b>	P > 0.05	P > 0.05

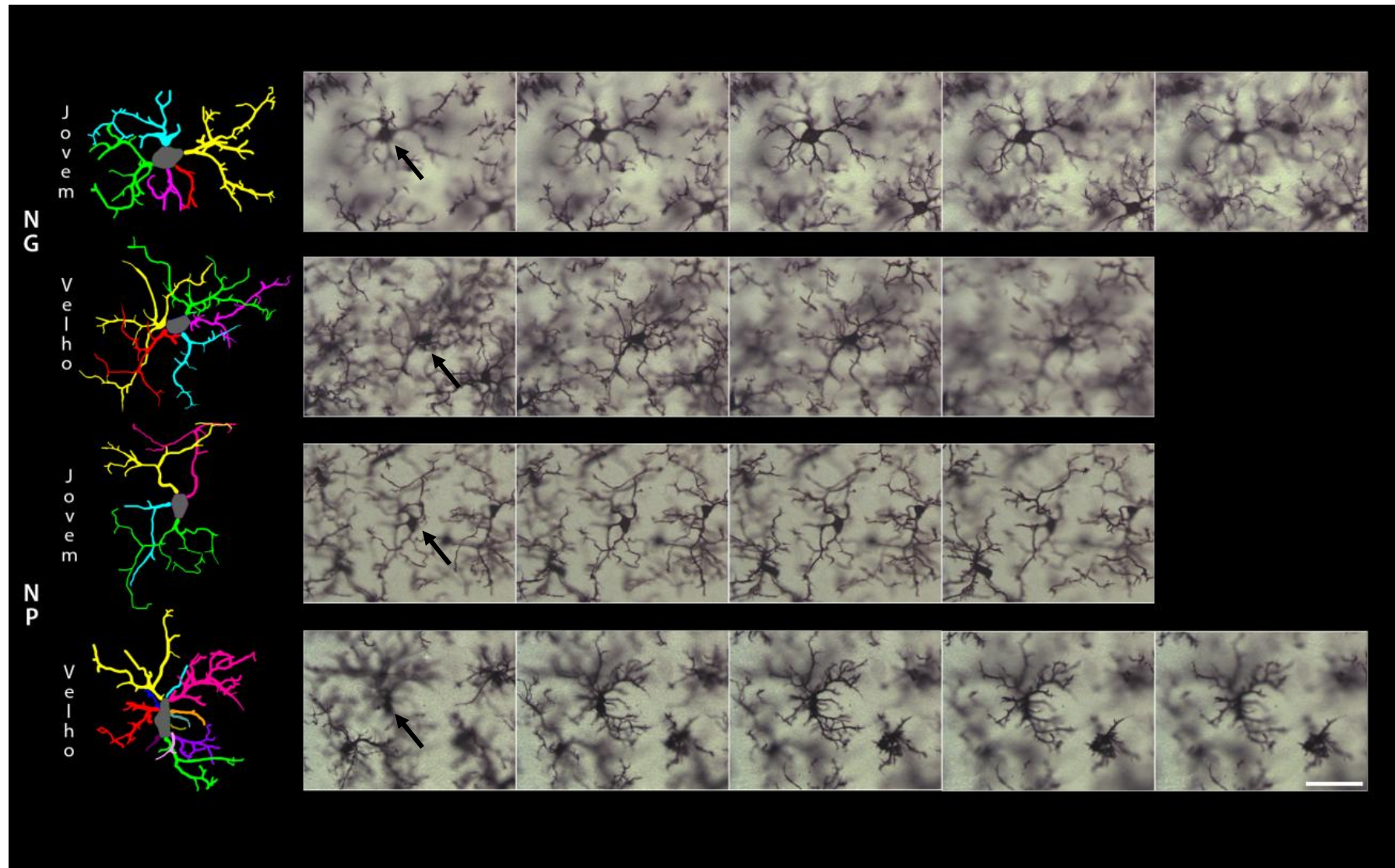
TABELA 4. Variáveis morfométricas relativas aos ramos microgliais.

RAMOS											
ÁREA			VOLUME			QUANTIDADE			TORTUOSIDADE		
Interaction	F (1.16)=19.33	p=0.0005	Interaction	F (1.16)= 0.71	p=0,412	Interaction	F (1.16)= 3.5	p=0,077	Interaction	F (1.6)= 8.40	p=0,0105
TN	F (1.16)= 80.59	p< 0.0001	Idade	F (1.16)= 86.0	p< 0.0001	Idade	F (1.16)= 19.1	p=0,0005	Idade	F (1.6)= 16.95	p=0,0008
Idade	F (1.16)= 30.85	p< 0.0001	TN	F (1.16)= 13.3	p=0,0021	TN	F (1.16)= 0.0	p=0,9744	TN	F (1.6)= 2.81	p=0,1129
	<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>		<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>		<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>		<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>
<b>VELHO-NG</b>	p> 0.05	p< 0.05	<b>VELHO-NG</b>	P < 0.05	P<0.001	<b>VELHO-NG</b>	P > 0.05	P > 0.05	<b>VELHO-NG</b>	P > 0.05	P > 0.05
<b>JOVEM-NP</b>	p<0.001	p<0.001	<b>JOVEM-NP</b>	P<0.001	P > 0.05	<b>JOVEM-NP</b>	P<0.001	P > 0.05	<b>JOVEM-NP</b>	P<0.001	P < 0.05
NÚMERO DE PROTUSÕES			DIÂMETRO DA BASE DO RAMO PRIMÁRIO			NÚMERO DE PONTOS DE RAMIFICAÇÃO					
Interaction	F (1.16)= 0.47	p=0,5021	Interaction	F (1.16)= 14.71	p=0,0015	Interaction	F (1.16)= 0.06	p=0,8108			
Idade	F (1.16)= 0.47	p=0,5021	IDADE	F (1.16)= 148.30	p< 0.0001	IDADE	F (1.16)= 8.40	p=0,0105			
TN	F (1.16)= 38.19	p< 0.0001	TN	F (1.16)= 12.40	p=0,0028	TN	F (1.16)= 0.43	p=0,5224			
	<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>		<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>		<b>VELHO-NP</b>	<b>JOVEM-NG</b>			
<b>VELHO-NG</b>	P > 0.05	P > 0.05	<b>VELHO-NG</b>	P<0.001	P<0.001	<b>VELHO-NG</b>	P > 0.05	P > 0.05			
<b>JOVEM-NP</b>	P > 0.05	P<0.001	<b>JOVEM-NP</b>	P<0.001	P > 0.05	<b>JOVEM-NP</b>	P > 0.05	P > 0.05			

A figura 20 ilustra as fotomicrografias, obtidas com a objetiva de 100x em diferentes planos de foco e as reconstruções tridimensionais correspondentes, obtidas pelo programa Neurolucida, para os animais adultos e velhos que mais se aproximaram da média de cada grupo experimental.

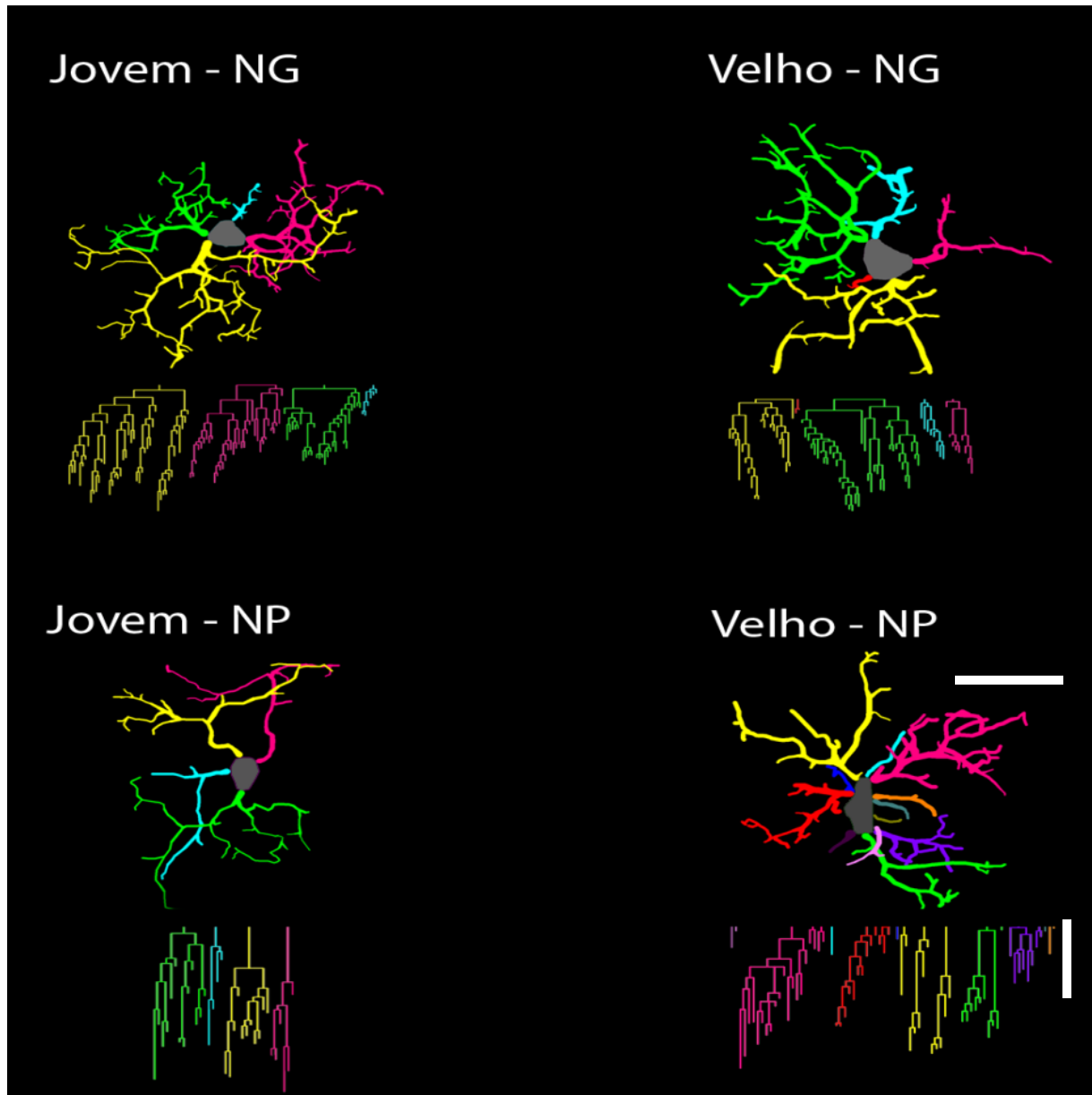
Note o aumento do soma nos animais velhos quando comparados aos animais jovens, além do espessamento e aumento do número de ramos, sendo estes mais curtos.

Os dendrogramas e reconstruções tridimensionais dos animais médios de cada grupo experimental, adultos e velhos, de ninhadas grandes e pequenas, obtidos através dos programas Neuroexplorer e Neurolucida, respectivamente, estão ilustrados na figura 21.



**Figura 20: Imunomarcaco para Iba-1 e reconstruoes tridimensionais de microglias dos animais.** Fotomicrografias de microglias imunomarcadas para anti Iba-1 dos animais de ninhadas grandes (NG) e pequenas (NP), obtidas atravs da objetiva de 100x em diferentes planos de foco.  esquerda, reconstruoes tridimensionais das microglias dos animais que mais se aproximaram dos valores mdios de cada grupo experimental. Escala: 25µm.





**Figura 21: Reconstruções tridimensionais e dendrogramas.** Microglias dos animais adultos e velhos, de ninhadas grandes e pequenas, cujos valores morfométricos mais se aproximaram dos valores médios de cada grupo experimental. Note evidente retração e espessamento dos ramos nos animais velhos, assim como aumento do soma microglial, quando comparados aos animais adultos. Escalas 30 $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho encontramos alterações morfológicas microgliais induzidas pelo envelhecimento em *Rattus norvegicus*, influenciadas por mudanças no tamanho da ninhada no período pós-natal imediato (2 a 21 dias). De fato em animais velhos e de ninhadas grandes (12 filhotes por nutriz) em comparação com os animais de ninhada pequena (6 filhotes por nutriz) encontramos aumento da área do soma, espessamento e número de ramos aumentados. Além disso, encontramos que em testes de memória de reconhecimento de objeto, o único grupo que obteve êxito foi o jovem de ninhada pequena, enquanto que no teste de memória espacial, todos os grupos demonstraram prejuízo em sua memória espacial. Tomados em conjunto, nossos achados sugerem que as alterações no tamanho da ninhada tem efeitos de longo prazo sobre o sistema neuroimune, com implicações diretas na morfologia microglial e no desempenho cognitivo.

### 5.1. Cuidado Materno, Competição Entre Irmãos E Plasticidade Cerebral.

A manipulação experimental adotada no presente trabalho seguiu a estratégia utilizada anteriormente (CELEDON, SANTANDER & COLOMBO, 1979) com adaptação importante no sentido de reduzir o número máximo de filhotes para 12 por nutriz para evitar subnutrição. De fato outro trabalho prévio realizado com número expressivo de animais (CHAHOUUD & PAUMGARTTEN, 2009) revelou três classes de tamanhos naturais de ninhadas em ratos Wistar onde apenas diferenças menores foram encontradas no que concerne ao desenvolvimento e maturação somática: na classe 1 estariam as ninhadas com 6 a 8 filhotes (representando 27% de todos os nascimentos); na classe 2 estariam as ninhadas com 9 e 10 filhotes (com 42% dos nascimentos) e na classe 3 ninhadas com 11 e 12 filhotes (23% dos nascimentos). Nossa escolha recaiu nas classes 1 (6 filhotes por nutriz) e 3 (12 filhotes por nutriz).

A suposição associada ao desenho escolhido foi, portanto, de que sem induzir subnutrição um número mais elevado de filhotes por nutriz nas ninhadas grandes resultaria em menor aleitamento por filhote, com maior redução do cuidado materno e maior competição por tetas funcionais entre os filhotes quando comparadas as ninhadas pequenas caracterizando o estresse pós-natal imediato. A curva de evolução ponderal do presente trabalho pareceu alinhada com essas suposições em que as diferenças significantes encontradas no período de aleitamento revelaram menor peso médio dos filhotes oriundos das ninhadas grandes (30% a

menos), permanecendo assim até pelo menos o 30º dia pós-natal. Medidas posteriores realizadas aos 90 dias de vida revelaram que tais diferenças já tinham desaparecido. Aos 600 dias após o nascimento as diferenças ponderais previamente descritas voltaram a se estabelecer ainda que em menor proporção (11%). Esses achados de evolução ponderal estão de acordo com descrições anteriores que demonstram que o crescimento e desenvolvimento são dependentes do tamanho da ninhada, estabelecendo-se uma correlação inversa entre essas variáveis (CHAHOUUD & PAUMGARTTEN, 2009). Outros estudos demonstram igualmente de forma inequívoca que o desenvolvimento somático, neural e comportamental pós-natal é mais lento quando os animais são criados em ninhadas grandes (BARTON & CAPELLINI, 2011).

Durante o período de aleitamento o sistema nervoso experimenta crescimento rápido e é constituído por um número significativo de mudanças onde o grau de plasticidade e vulnerabilidade alcança proporções não observadas em nenhuma outra fase da vida (DOBBING & SANDS, 1979; DOBBING, 1974; DOBBING, 1971). Nessa fase, fatores adversos como a redução do cuidado materno ou alterações na competição entre os filhotes podem influenciar dramaticamente o desenvolvimento do encéfalo, que é geneticamente programado para crescer mais rapidamente que o restante do organismo (MORGANE, MOKLER & GALLER, 2002; LAUS et al., 2011; DOBBING & SANDS, 1973).

No presente trabalho essas duas variáveis foram alteradas durante o desenvolvimento encefálico rápido pelo aumento do tamanho da ninhada e os efeitos observados em animais sedentários jovens e envelhecidos. Encontrou-se que as microglias da camada molecular do giro denteado alteram sua morfologia pelo envelhecimento e essa alteração é mais evidente em animais oriundos de ninhadas grandes. De fato tal como previamente descrito (DAMANI et al., 2011) encontramos que as microglias dos animais velhos têm ramos em menor número, mais curtos e mais espessos e corpos celulares maiores do que os dos animais jovens (VAUGHAN & PETERS, 1974).

Levando em consideração que o nível de stress no período pós-natal imediato pode ter consequências fisiológicas e comportamentais (PFEIFER et al., 1976; STANTON, WALLSTROM & LEVINE, 1987; KAFFMAN & MEANEY, 2007; LANGER, 2008; URIARTE et al., 2008), durante o desenvolvimento e na vida adulta tardia (CALDJI et al., 1998; LIU et al., 2000; MENARD, CHAMPAGNE & MEANEY, 2004; VAN HASSELT et al., 2011; LIU et al., 1997) e que menor cuidado materno (MEANEY & SZYF, 2005) e maior nível de competição por tetas funcionais podem gerar maior nível de stress (ZHANG,

ZHANG & WANG, 2011; STOCKLEY & PARKER, 2002) é razoável supor que os animais de ninhadas grandes possam tê-lo sofrido em maior proporção do que os de ninhadas pequenas.

Tomados em conjunto nossos resultados sugerem que o tamanho da ninhada pode alterar a morfologia microglial tanto em animais adultos quanto em velhos.

## **5.2. Possíveis Implicações Funcionais Das Alterações Senis Do Giro Denteado Agravadas Pelo Estresse Pós-Natal Imediato**

A aquisição e a recuperação da informação espacial são tarefas hipocampo-dependentes que podem ser prejudicadas por mudanças estruturais e funcionais induzidas pelo envelhecimento (RIEDEL et al., 1999; D'HOOGHE & DE DEYN, 2001; DA SILVA COSTA et al., 2009). O declínio da memória espacial em particular foi associado às mudanças em áreas envolvidas com essa tarefa tais como as que constituem a formação hipocampal (ROSENZWEIG & BARNES, 2003; TEATHER et al., 2002; FRICK & FERNANDEZ, 2003; WIMMER et al., 2011) incluindo-se aí o córtex entorrinal, o giro denteado e o hipocampo propriamente dito. Por outro lado o prejuízo da memória de reconhecimento de objeto durante o envelhecimento parece ser dependente de mudanças estruturais que incluem a formação hipocampal e em particular o córtex perirrinal (BURKE et al., 2012; BURKE et al., 2010).

Estudos recentes utilizando o macaco Rhesus revelaram que alterações estruturais no giro denteado relacionadas a duas proteínas sabidamente associadas à estocagem de informação através da regulação do transporte do receptor AMPA estavam alteradas nos macacos senis, mas não nos jovens e que essa alteração foi mais intensa no giro denteado dos animais com pior performance nos testes de pareamento de amostras com intervalos crescentes - DNMS (HARA et al., 2012). Esses mesmos autores demonstraram que as sinapses que as fibras musgosas quando alteradas fazem sobre as células piramidais de CA3 revelam maior correlação com os prejuízos mnemônicos identificados pela técnica do DNMS previamente mencionada (HARA, RAPP & MORRISON, 2011).

Por outro lado evidências crescentes ligando regulação epigenética à plasticidade sináptica relacionada à memória levantou a possibilidade de que a dinâmica da cromatina uma vez alterada pode contribuir para o declínio cognitivo associado ao envelhecimento. No hipocampo em particular foi recentemente demonstrado que a orquestração da regulação epigenética dependente de experiência observada no jovem adulto, é perdida durante o

envelhecimento e que não há apenas um marcador epigenético ou modificação dependente de experiência associada ao declínio capaz de prever a alteração hipocampal, mas vários deles (CASTELLANO et al., 2012). A partir desse trabalho restou demonstrado que um padrão multivariado bidirecional da cromatina pode ocorrer, e que essa modificação é dependente da experiência comportamental recente, da idade cronológica, do status cognitivo e da região hipocampal. De fato muitos marcadores epigenéticos acoplados com a capacidade de memória foram identificados em adultos jovens e velhos cognitivamente preservados mas não em animais com baixo desempenho em tarefas hipocampo-dependentes.

Coerentemente os padrões de acetilação/desacetilação envolvendo histonas em CA1, CA3 e giro denteado foram diferentes nas diferentes regiões em jovens e velhos cognitivamente preservados, e dependentes da experiência recente, sugerindo um grau de resolução anatômica maior do que se predizia anteriormente (CASTELLANO et al., 2012). O giro denteado em particular mostrou robusta fosforilação da histona 3 identificada através da imunomarcagem para H3pS10 após experiência de aprendizado recente.

No presente trabalho, após submissão a estresse pós-natal imediato identificamos alterações da morfologia microglial e redução das memórias espacial e de reconhecimento de objeto na vida adulta e durante o envelhecimento em animais que permaneceram sedentários a vida inteira. Nós sugerimos que tendo sido demonstrado a presença de alterações epigenéticas durante o desenvolvimento, na vida adulta e durante o envelhecimento, no hipocampo e no giro denteado, é razoável supor que o declínio cognitivo detectado nos animais sedentários, adultos e velhos empregados no presente trabalho possa estar associado pelo menos em parte a essas transformações.

Tal como previamente arguido (ver discussão em DE LIMA, 2012) é sabido que durante o envelhecimento normal é comum observar declínio cognitivo com comprometimento importante da memória de reconhecimento de objetos prontamente detectado em tarefas que envolvem aprendizado e localização espacial (memória do lugar onde estavam os objetos) e menos intensamente do reconhecimento da identidade daqueles (memória da forma dos objetos). Esse declínio começa a ser observado na meia idade e parece estar estreitamente relacionado ao estresse oxidativo que aumenta à medida que o envelhecimento progride. Afetando mais e mais as funções dependentes da homeostase do cálcio e da plasticidade sináptica dele dependente, o envelhecimento parece associado à alterações funcionais dos canais de cálcio dependentes de voltagem e dos receptores de rianodina associados à regulação dos estoques de cálcio intracelulares, bem como de receptores de NMDA cuja

ativação é igualmente dependente de cálcio, no hipocampo e em outras áreas relacionadas do sistema límbico (FOSTER, 2012).

Em De Lima 2012 recupera-se a proposta de Barrientos e colaboradores, (BARRIENTOS et al., 2012) que sugere uma sequência de eventos associados às transformações microgliais a partir da vida adulta e que culminam com as alterações cognitivas induzidas por eventos infecciosos ou estressantes durante o envelhecimento. Nesses episódios a resposta inflamatória é amplificada por uma população microglial previamente alterada pela inflamação senil, que diante de um evento estressor de qualquer natureza, leva a secreção exagerada de citocinas pró-inflamatórias (ver para revisão Perry, 2010). Estas por sua vez afetam no longo prazo a cascata de eventos indispensáveis à formação e consolidação da memória (LTP, LTD, BDNF, Arc) tornando o envelhecimento mais vulnerável a eventos outrora minimamente impactantes (BARRIENTOS et al., 2012). Alinhado com essa proposição Jurgens e Johnson sugerem que o estresse e o envelhecimento podem alterar a reatividade da microglia intensificando a resposta inflamatória com consequências importantes para o declínio cognitivo senil. No presente trabalho concordamos com De Lima, 2012 que sugere para a região septal lateral que a vida sedentária, o envelhecimento e o estresse causado pela diminuição do cuidado materno possivelmente ampliaram a resposta inflamatória microglial induzindo as alterações morfológicas. Nós sugerimos que essa interpretação pode ser estendida à interpretação dos resultados colhidos na camada molecular do giro denteado ressalvadas as pequenas diferenças encontradas na magnitude das alterações. De fato encontramos diferenças importantes em alguns dos parâmetros morfométricos analisados quando comparamos as alterações microgliais da região septal com aquelas encontradas na camada molecular do giro denteado: com relação ao perímetro e a área do soma, as microglias das duas regiões se assemelham, tendo os animais velhos valores mais altos do que os animais jovens.

Quanto à convexidade, observou-se que as microglias da camada molecular do giro denteado são mais convexas em animais velhos oriundos de ninhada grande, enquanto que as microglias da região septal lateral são mais convexas nos animais jovens de ninhada pequena. Com relação ao número de pontos de ramificação, observa-se que as microglias das duas regiões são morfológicamente semelhantes, tendo mais pontos de ramificação as microglias de animais jovens. Quando analisado o volume dos ramos microgliais das duas regiões, encontrou-se semelhança morfológica, com os ramos dos animais velhos mais volumosos. Analisando a tortuosidade microglial nas duas regiões, nota-se que a camada molecular do

giro denteado possui microglias mais tortuosas em animais jovens oriundos de ninhada pequena, enquanto que na região septal lateral não se encontra diferenças significativas. Com relação ao diâmetro da base do ramo primário, observa-se que as microglias dos animais velhos possuem o diâmetro da base do ramo primário maior quando comparados aos animais jovens, independente do tamanho da ninhada, nas duas regiões. Assim podemos dizer que em geral as alterações morfológicas microgliais das regiões septal lateral e da camada molecular do giro denteado trabalham na mesma direção sugerindo mecanismos fisiopatológicos subjacentes semelhantes.

Tal como amplamente descrito em outros trabalhos sugerimos que a prolongada ativação da microglia associada ao estresse pós-natal imediato, à vida sedentária e ao envelhecimento pode contribuir para dano neuronal assim como para a perda dos mecanismos neuroregulatórios e neuroprotetores nas regiões cuja integridade são essenciais para formação das memórias espacial e de objeto como é o caso do giro denteado investigado no presente trabalho. Os danos neuronais associados a essas áreas deixariam de controlar a reatividade microglial adequadamente, aumentando assim o riscos de efeitos inflamatórios exagerados sobre ativação subsequente. Como resultado, ciclos de retroalimentação positivas ampliariam a ativação microglial tornando-a duradoura com consequências importantes para a função neural agravando o declínio cognitivo senil (JURGENS & JOHNSON, 2012).

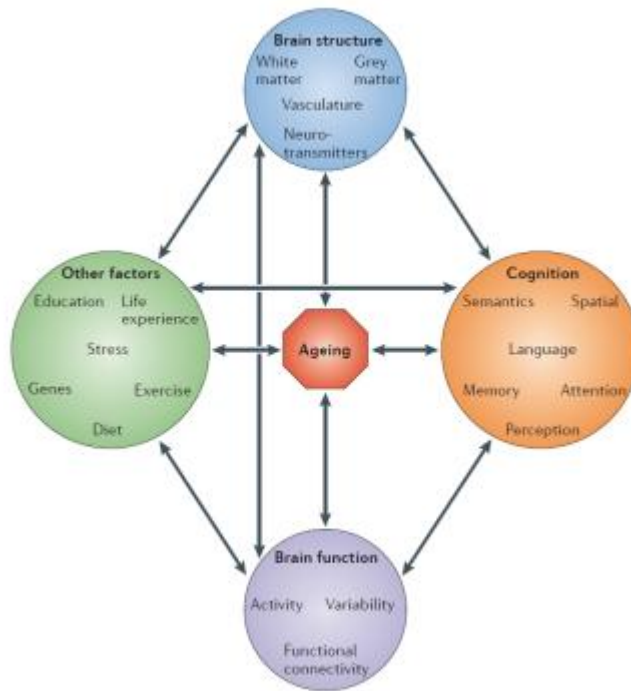
### **5.3. Limitações do Ensaio Experimental e o Escopo da Dissertação**

No domínio da cognição humana a disponibilidade da tecnologia de neuroimagem promoveu uma explosão na literatura relacionada incluindo estudos numerosos acerca do envelhecimento. Os limites desses ensaios são prontamente reconhecidos quando fica evidente que no melhor cenário se diz com auxílio dessa tecnologia, onde estão acontecendo alterações sem conseguir discernir os mecanismos subjacentes. No que concerne ao envelhecimento em particular, as limitações das medidas realizadas por ressonância magnética funcional não permitiram esclarecer como as diferenças na atividade cerebral se relacionam com as performances cognitivas associadas aos testes neuropsicológicos (GRADY, 2012). Contribuindo para tais dificuldades numerosos fatores de risco alteram tais performances adicionando um alto grau de complexidade para interpretação da neurobiologia subjacente ao envelhecimento. Esses fatores variam de indivíduo para indivíduo incluindo a genética de cada qual e as experiências aos quais foram submetidos. Por conta dessas limitações metodológicas os ensaios experimentais que permitem o controle detalhado de

múltiplas variáveis que afetam o desempenho em testes de memória e aprendizado com o sacrifício dos animais em múltiplas janelas temporais para exame detalhado do que está acontecendo nas diferentes escalas (molecular, celular, e sistêmica) tem sido fonte permanente de avanços consideráveis.

A Figura 22 é uma tentativa de prover uma representação esquemática do grau de complexidade subjacente ao envelhecimento indicando o contexto em que o presente trabalho se insere, apontando desde já suas limitações. Restrito ao domínio dos testes comportamentais e à análise das alterações da morfologia microglial os ensaios que desenvolvemos estão contidos nos círculos, verde, azul e alaranjado da Figura 22 e em suas interações com o envelhecimento (polígono central). Está fora do escopo do presente trabalho, portanto, rever em detalhe as alterações neuropatológicas ao nível molecular, como por exemplo a análise de genes de expressão rápida ou a imunohistoquímica de marcadores de acetilação de histonas, por passarem ao largo dos ensaios experimentais realizados. Limitamo-nos a medir o impacto das mudanças que fizemos em uma variável relacionado ao ambiente pós-natal imediato e contida no círculo verde da Figura 22, empregando testes comportamentais de funções de memória indicadas no círculo alaranjado. Mais especificamente medimos aos 4 e 23 meses de idade as alterações nas memórias espacial e de reconhecimento de objeto associadas à mudanças do tamanho da ninhada procurando investigar possíveis relações com alterações morfológicas da microglia na camada molecular do giro denteado. Esses ensaios estão longe de atender à recomendação proposta pelos autores de que mesmo que seja impossível atacar todos os fatores que contribuem para as alterações neurais associadas ao envelhecimento é desejável que o maior número delas seja avaliado simultaneamente.





**Figura 22:** Modelo esquemático incluindo as várias dimensões que interagem com o envelhecimento. O modelo pretende mostrar as interações entre aspectos estruturais e comportamentais que podem ser afetados pelo envelhecimento. As setas são bidirecionais para indicar que a influência pode potencialmente se originar dos fatores envolvidos fluindo numa direção ou noutra ou ainda em ambas as direções. Apesar de que é provavelmente impossível reunir informação acerca de tais influências num único estudo, deve-se naturalmente desenvolver esforços para avaliar múltiplas medidas da estrutura e da função cerebral sempre que possível (Figura extraída de GRADY, 2012).

Além disso, é importante chamar atenção para as limitações técnicas associadas ao processamento do tecido utilizado para imunomarcagem seletiva para micróglia em sua reconstrução tridimensional. Impostas pela fixação e pelos fatores mecânicos associados ao seccionamento do encéfalo dos animais pelo vibrátomo, assim como pelo subsequente processo de desidratação, o tecido sofre retração não uniforme no eixo z em comparação aos eixos x-y prontamente evidente nas secções montadas em lâmina (HOSSEINI-SHARIFABAD & NYENGAARD, 2007). Assim as estimativas de possíveis modificações nos eixos x/y após o processo de desidratação não podem ser extrapoladas linearmente para o eixo z. Essa impossibilidade difícil de ser circunscrita por sua influência multifatorial, impõe limitações que precisam ser consideradas quando analisando o conjunto dos dados aqui

apresentados. Entretanto é preciso realçar que uma indicação segura da ocorrência de retração severa do eixo z é a ondulação frequente dos ramos retraídos normalmente mais evidentes na superfície das secções, o que indica que os processos individuais não retraem de forma homogênea como um todo, mas refletem variações de retração regionais da fatia que tendem a ser de maior amplitude na superfície, decrescendo em profundidade no eixo z. Esse padrão entretanto, não foi observado nas microglias eleitas para reconstrução neste estudo que normalmente foram selecionadas da região média do eixo z, onde o impacto dessas alterações são menores. Ainda assim a taxa de retração nos eixos x-y foi 60% menor do que a do eixo z. Para minimizar esse efeito aplicou-se fator de correção linear para o eixo z na mesma proporção para cada micróglia reconstruída e nenhum fator de correção para os eixos x-y.

## 6. CONCLUSÕES

- O aumento do número de filhotes de 6 para 12/nutriz durante o período pós-natal imediato parece agravar o declínio cognitivo senil e isto foi associado a alterações morfológicas microgliais na camada molecular do giro denteado.
- A memória espacial parece ser mais afetada pelo aumento do tamanho da ninhada e pelo envelhecimento do que a memória de reconhecimento de objeto.
- As alterações da microglia traduzidas em aumento da área e do perímetro somáticos afetam predominantemente os animais velhos enquanto que as alterações dos ramos incluem animais velhos e jovens.
- O ambiente pós-natal imediato afeta o sistema neuroimune deixando marcas permanentes que se expressam tanto na vida adulta quanto durante o envelhecimento.

## 7. REFERÊNCIAS

- ACSADY, L., A. KAMONDI, A. SIK, T. FREUND & G. BUZSAKI. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. **J Neurosci**, 18, 3386-403, 1998.
- ADER, R. & L. J. GROTA. Rhythmicity in the maternal behaviour of *Rattus norvegicus*. **Anim Behav**, 18, 144-50, 1970.
- AGGLETON, J. P., M. W. BROWN & M. M. ALBASSER. Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate-early gene functional imaging. **Neuropsychologia**, 2012;
- AGUILERA, G. HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. **Exp Gerontol**, 46, 90-5, 2011.
- ALBASSER, M. M., R. J. CHAPMAN, E. AMIN, M. D. IORDANOVA, S. D. VANN & J. P. AGGLETON. New behavioral protocols to extend our knowledge of rodent object recognition memory. **Learn Mem**, 17, 407-19, 2010.
- BARRIENTOS, R. M., M. G. FRANK, L. R. WATKINS & S. F. MAIER. Aging-related changes in neuroimmune-endocrine function: Implications for hippocampal-dependent cognition. **Horm Behav**, 2012.
- BARTON, R. A. & I. CAPELLINI. Maternal investment, life histories, and the costs of brain growth in mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, 6169-74, 2011.
- BECHMANN, I. & R. NITSCH. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electronmicroscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. **Glia**, 20, 145-154, 1997.
- BERRY, A., A. GRECO, M. GIORGIO, P. G. PELICCI, R. DE KLOET, E. ALLEVA, L. MINGHETTI & F. CIRULLI. Deletion of the lifespan determinant p66(Shc) improves performance in a spatial memory task, decreases levels of oxidative stress markers in the hippocampus and increases levels of the neurotrophin BDNF in adult mice. **Exp Gerontol**, 43, 200-8, 2008.
- BITZER-QUINTERO, O. K. & I. GONZÁLEZ-BURGOS. Immune system in the brain: a modulatory role on dendritic spine morphophysiology? **Neural Plast**, 2012.
- BLANK, T. & M. PRINZ. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. **Glia**, 2012.
- BROWN, M. W. & J. P. AGGLETON. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? **Nat Rev Neurosci**, 2, 51-61, 2001.
- BROWN, M. W., E. C. WARBURTON & J. P. AGGLETON. Recognition memory: material, processes, and substrates. **Hippocampus**, 20, 1228-44, 2010.

BURKE, S. N., A. L. HARTZELL, J. P. LISTER, L. T. HOANG & C. A. BARNES (2012) Layer V perirhinal cortical ensemble activity during object exploration: A comparison between young and aged rats. **Hippocampus**, 22, 2080-93.

BURKE, S. N., J. L. WALLACE, S. NEMATOLLAHI, A. R. UPRETY & C. A. BARNES (2010) Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. **Behav Neurosci**, 124, 559-73.

CALDJI, C., B. TANNENBAUM, S. SHARMA, D. FRANCIS, P. M. PLOTSKY & M. J. MEANEY (1998) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, 5335-40.

CASTELLANO, J. F., B. R. FLETCHER, B. KELLEY-BELL, D. H. KIM, M. GALLAGHER & P. R. RAPP (2012) Age-related memory impairment is associated with disrupted multivariate epigenetic coordination in the hippocampus. **PLoS One**, 7, e33249.

CELEDON, J. M., M. SANTANDER & M. COLOMBO (1979) Long-term effects of early undernutrition and environmental stimulation on learning performance of adult rats. **J Nutr**, 109, 1880-6.

CHAHOUD, I. & F. J. PAUMGARTTEN (2009) Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? **Environ Res**, 109, 1021-7.

CHAMPAGNE, F., J. DIORIO, S. SHARMA & M. J. MEANEY (2001) Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, 12736-41.

Choi, J. H., C. H. Lee, I. K. Hwang, M. H. Won, J. K. Seong, Y. S. Yoon, H. S. Lee & I. S. Lee (2007) Age-related changes in ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity and protein level in the gerbil hippocampal CA1 region. **j vet med sci**, 69, 1131-6.

CHOI, J. H. & M. H. WON (2011) Microglia in the normally aged hippocampus. **Lab Anim Res**, 27, 181-7.

CRYSTAL, J. D. (2010) Episodic-like memory in animals. **Behav Brain Res**, 215, 235-43.

D'HOOGHE, R. & P. P. DE DEYN (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Res Brain Res Rev**, 36, 60-90.

DA SILVA COSTA, V., P. DUCHATELLE, M. BOULOUARD & F. DAUPHIN (2009) Selective 5-HT<sub>6</sub> receptor blockade improves spatial recognition memory and reverses age-related deficits in spatial recognition memory in the mouse. **Neuropsychopharmacology**, 34, 488-500.

DAMANI, M. R., L. ZHAO, A. M. FONTAINHAS, J. AMARAL, R. N. FARISS & W. T. WONG (2011) Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. **Aging Cell**, 10, 263-76.

DAVALOS, D., J. GRUTZENDLER, G. YANG, J. V. KIM, Y. ZUO, S. JUNG, D. R. LITTMAN, M. L. DUSTIN & W. B. GAN (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, 8, 752-8.

DE HAAS, A. H., H. W. BODDEKE & K. BIBER (2008) Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. **Glia**, 56, 888-94.

DE KLOET, E. R., N. Y. ROTS & A. R. COOLS (1996) Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent. **Cell Mol Neurobiol**, 16, 345-56.

DE LIMA, C.M. (2012) Influência do tamanho da ninhada e da vida sedentária sobre o declínio cognitivo senil e sobre a morfologia microglial do septum lateral em *Rattus norvegicus*. Belém: UFPA, 2012.

DENNY, C. A., N. S. BURGHARDT, D. M. SCHACHTER, R. HEN & M. R. DREW (2012) 4- to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. **Hippocampus**, 22, 1188-201.

DERE, E., J. P. HUSTON & M. A. DE SOUZA SILVA (2005) Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Res Brain Res Protoc**, 16, 10-9.

DERE, E., J. P. HUSTON & M. A. DE SOUZA SILVA (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, 31, 673-704.

DINIZ, D., C. FORO, J. BENTO-TORRES, P. VASCONCELOS & P.-D. CW (2012) Aging, environmental enrichment, object recognition and astrocyte plasticity in dentate gyrus In *Astrocytes: Structure, Functions and Role in Disease*, ed. O. Gonzalez-Perez, in press. New York: **Nova Science Publisher Inc**.

DINIZ, D., C. FORO, C. REGO, D. GLORIA, F. DE OLIVEIRA, J. PAES, A. DE SOUSA, T. TOKUHASHI, L. TRINDADE, M. TURIEL, E. VASCONCELOS, J. TORRES, C. CUNNIGHAM, V. PERRY, P. VASCONCELOS & C. DINIZ (2010A) Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **European Journal of Neuroscience**, 32, 509-519.

DINIZ, D. G., C. A. FORO, C. M. REGO, D. A. GLORIA, F. R. DE OLIVEIRA, J. M. PAES, A. A. DE SOUSA, T. P. TOKUHASHI, L. S. TRINDADE, M. C. TURIEL, E. G. VASCONCELOS, J. B. TORRES, C. CUNNIGHAM, V. H. PERRY, P. F. VASCONCELOS & C. W. DINIZ (2010B) Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **Eur J Neurosci**, 32, 509-19.

DIX, S. L. & J. P. AGGLETON (1999) Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. **Behav Brain Res**, 99, 191-200.

DOBBING, J. (1971) Vulnerable periods of brain development. In: lipids, malnutrition & the developing brain. **Ciba Found Symp**, 9-29.

DOBBING, J. (1974) The later growth of the brain and its vulnerability. **Pediatrics**, 53, 2-6.

DOBBING, J. & J. SANDS (1973) Quantitative growth and development of human brain. **Arch Dis Child**, 48, 757-67.

DOBBING, J. & J. SANDS (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. **Early Hum Dev**, 3, 79-83.

ENNACEUR, A. (2010) One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behav Brain Res**, 215, 244-54.

ENNACEUR, A. & J. DELACOUR (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, 31, 47-59.

ENNACEUR, A., S. MICHALIKOVA, A. BRADFORD & S. AHMED (2005) Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. **Behav Brain Res**, 159, 247-66.

ENTHOVEN, L., E. R. DE KLOET & M. S. OITZL (2008) Differential development of stress system (re)activity at weaning dependent on time of disruption of maternal care. **Brain Res**, 1217, 62-9.

ERECINSKA, M., S. CHERIAN & I. A. SILVER (2004) Energy metabolism in mammalian brain during development. **Prog Neurobiol**, 73, 397-445.

FISH, E. W., D. SHAHROKH, R. BAGOT, C. CALDJI, T. BREDY, M. SZYF & M. J. MEANEY (2004) Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. **Ann N Y Acad Sci**, 1036, 167-80.

FOSTER, T. C. (2012) Dissecting the age-related decline on spatial learning and memory tasks in rodent models: N-methyl-D-aspartate receptors and voltage-dependent Ca(2+) channels in senescent synaptic plasticity. **Prog Neurobiol**, 96, 283-303.

FRANCIS, D. D., F. A. CHAMPAGNE, D. LIU & M. J. MEANEY (1999) Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. **Ann N Y Acad Sci**, 896, 66-84.

FRICK, K. M. & S. M. FERNANDEZ (2003) Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. **Neurobiol Aging**, 24, 615-26.

GALEEVA, A., N. ORDYAN, S. PIVINA & M. PELTO-HUIKKO (2006) Expression of glucocorticoid receptors in the hippocampal region of the rat brain during postnatal development. **J Chem Neuroanat**, 31, 216-25.

GILBERT, P. E., R. P. KESNER & I. LEE (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. **Hippocampus**, 11, 626-36.

GONZÁLEZ, A. S., E. L. RODRÍGUEZ ECHANDÍA, R. CABRERA & M. R. FÓSCOLO (1994) Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats: II. Effects on estrous cycle in females. **Physiol Behav**, 56, 591-5.

GOSHEN, I., T. KREISEL, H. OUNALLAH-SAAD, P. RENBAUM, Y. ZALZSTEIN, T. BEN-HUR, E. LEVY-LAHAD & R. YIRMIYA (2007) A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. **Psychoneuroendocrinology**, 32, 1106-15.

GRADY, D. The Flip Side of Performance Measures: Limiting Overtreatment : Comment on "The Other Side of Quality Improvement in Diabetes for Seniors". **Arch Intern Med**. 2012

GROTA, L. J. & R. ADER (1969) Effects of litter size on emotionality, adrenocortical reactivity, and susceptibility to gastric erosions in the rat. **Psychol Rep**, 24, 547-9.

GUZOWSKI, J. F. (2002) Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. **Hippocampus**, 12, 86-104.

HARA, Y., M. PUNSONI, F. YUK, C. S. PARK, W. G. JANSSEN, P. R. RAPP & J. H. MORRISON (2012) Synaptic distributions of GluA2 and PKM $\zeta$  in the monkey dentate gyrus and their relationships with aging and memory. **J Neurosci**, 32, 7336-44.

HARA, Y., P. R. RAPP & J. H. MORRISON (2011) Neuronal and morphological bases of cognitive decline in aged rhesus monkeys. **Age (Dordr)**.

HARRY, G. J. & A. D. KRAFT (2012) Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. **Neurotoxicology**, 33, 191-206.

HAUSSMANN, M. F., J. A. CARROLL, G. D. WEESNER, M. J. DANIELS, R. L. MATTERI & D. C. LAY (2000) Administration of ACTH to restrained, pregnant sows alters their pigs' hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. **J Anim Sci**, 78, 2399-411.

HERRERA, D. G. & H. A. ROBERTSON (1996) Activation of c-fos in the brain. **Prog Neurobiol**, 50, 83-107.

HOLDEN, H. M. & P. E. GILBERT (2012) Less efficient pattern separation may contribute to age-related spatial memory deficits. **Front Aging Neurosci**, 4, 9.



HOPKINS, M. E., R. NITECKI & D. J. BUCCI (2011) Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. **Neuroscience**, 194, 84-94.

HOSSEINI-SHARIFABAD, M. & J. R. NYENGAARD (2007) Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. **J Neurosci Methods**, 162, 206-14.

ITO, D., Y. IMAI, K. OHSAWA, K. NAKAJIMA, Y. FUKUUCHI & S. KOHSAKA (1998) Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res Mol Brain Res**, 57, 1-9.

JANS, J. E. & B. WOODSIDE (1987) Effects of litter age, litter size, and ambient temperature on the milk ejection reflex in lactating rats. **Dev Psychobiol**, 20, 333-44.

JURGENS, H. A. & R. W. JOHNSON (2012) Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. **Exp Neurol**, 233, 40-8.

KAFFMAN, A. & M. J. MEANEY (2007) Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **J Child Psychol Psychiatry**, 48, 224-44.

LACY, J. W., M. A. YASSA, S. M. STARK, L. T. MUFTULER & C. E. STARK (2011) Distinct pattern separation related transfer functions in human CA3/dentate and CA1 revealed using high-resolution fMRI and variable mnemonic similarity. **Learn Mem**, 18, 15-8.

LANGER, P. (2008) The phases of maternal investment in eutherian mammals. **Zoology (Jena)**, 111, 148-62.

LAUS, M. F., L. D. VALES, T. M. COSTA & S. S. ALMEIDA (2011) Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. **Int J Environ Res Public Health**, 8, 590-612.

LAWSON, L. J., V. H. PERRY, P. DRI & S. GORDON (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, 39, 151-70.

LEE, I. & R. P. KESNER (2004) Encoding versus retrieval of spatial memory: double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. **Hippocampus**, 14, 66-76.

LEUTGEB, J. K. & E. I. MOSER (2007) Enigmas of the dentate gyrus. **Neuron**, 55, 176-8.

LEVINE, S. (2000) Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Eur J Pharmacol**, 405, 149-60.

LEVINE, S. (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. **Physiol Behav**, 73, 255-60.

LI, F., Y. Y. ZHANG, X. M. JING, C. H. YAN & X. M. SHEN (2010) Memory impairment in early sensorimotor deprived rats is associated with suppressed hippocampal neurogenesis and altered CREB signaling. **Behav Brain Res**, 207, 458-65.

LI, Y., R. M. MCKAY, D. RIETHMACHER & L. F. PARADA (2012) Neurofibromin modulates adult hippocampal neurogenesis and behavioral effects of antidepressants. **J Neurosci**, 32, 3529-39.

LIU, D., J. DIORIO, J. C. DAY, D. D. FRANCIS & M. J. MEANEY (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nat Neurosci**, 3, 799-806.

LIU, D., J. DIORIO, B. TANNENBAUM, C. CALDJI, D. FRANCIS, A. FREEDMAN, S. SHARMA, D. PEARSON, P. M. PLOTSKY & M. J. MEANEY (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, 277, 1659-62.

MARTIN, S. J. & R. E. CLARK (2007) The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. **Cell Mol Life Sci**, 64, 401-31.

MCEWEN, B. S. & R. M. SAPOLSKY (1995) Stress and cognitive function. **Curr Opin Neurobiol**, 5, 205-16.

MCHUGH, T. J., M. W. JONES, J. J. QUINN, N. BALTHASAR, R. COPPARI, J. K. ELMQUIST, B. B. LOWELL, M. S. FANSELOW, M. A. WILSON & S. TONEGAWA (2007) Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. **Science**, 317, 94-9.

MEANEY, M. J. (2001) Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annu Rev Neurosci**, 24, 1161-92.

MEANEY, M. J., S. BHATNAGAR, S. LAROCQUE, C. MCCORMICK, N. SHANKS, S. SHARMA, J. SMYTHE, V. VIAU & P. M. PLOTSKY (1993) Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. **Ann N Y Acad Sci**, 697, 70-85.

MEANEY, M. J. & M. SZYF (2005) Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. **Dialogues Clin Neurosci**, 7, 103-23.

MENARD, J. L., D. L. CHAMPAGNE & M. J. MEANEY (2004) Variations of maternal care differentially influence 'fear' reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. **Neuroscience**, 129, 297-308.

MORAG, M., F. POPLIKER & R. YAGIL (1975) Effect of litter size on milk yield in the rat. **Lab Anim**, 9, 43-7.

MORGANE, P. J., D. J. MOKLER & J. R. GALLER (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, 26, 471-83.

MUMBY, D. G., S. GASKIN, M. J. GLENN, T. E. SCHRAMEK & H. LEHMANN (2002) Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. **Learn Mem**, 9, 49-57.

NAKASHIBA, T., J. D. CUSHMAN, K. A. PELKEY, S. RENAUDINEAU, D. L. BUHL, T. J. MCHUGH, V. RODRIGUEZ BARRERA, R. CHITTAJALLU, K. S. IWAMOTO, C. J. MCBAIN, M. S. FANSELOW & S. TONEGAWA (2012) Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. **Cell**, 149, 188-201.

NIMMERJAHN, A., F. KIRCHHOFF & F. HELMCHEN (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, 308, 1314-8.

PERRY, V. H. (2010) Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. **Acta Neuropathol**, 120, 277-86.

PETROSINI, L., P. DE BARTOLO, F. FOTI, F. GELFO, D. CUTULI, M. G. LEGGIO & L. MANDOLESI (2009) On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. **Brain Res Rev**, 61, 221-39.

PFEIFER, W. D., R. ROTUNDO, M. MYERS & V. H. DENENBERG (1976) Stimulation in infancy: unique effects of handling. **Physiol Behav**, 17, 781-4.

POWER, C. A. & A. E. PROUDFOOT (2001) The chemokine system: novel broad-spectrum therapeutic targets. **curr opin pharmacol**, 1, 417- 424.

PRYCE, C. R., D. BETTSCHEN & J. FELDON (2001) Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Dev Psychobiol**, 38, 239-51.

PRYCE, C. R. & J. FELDON (2003) Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neurosci Biobehav Rev**, 27, 57-71.

RANSOHOFF, R. M. & V. H. PERRY (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, 27, 119-45.

RHEES, R. W., E. D. LEPHART & D. ELIASON (2001) Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. **Behav Brain Res**, 123, 1-10.

RIEDEL, G., J. MICHEAU, A. G. LAM, E. L. ROLOFF, S. J. MARTIN, H. BRIDGE, L. DE HOZ, B. POESCHEL, J. MCCULLOCH & R. G. MORRIS (1999) Reversible neural

inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. **Nat Neurosci**, 2, 898-905.

RIVERA, G. A. B. (2003) Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório. Institute of Laboratory Animal Resources. **National Research Council**, 1.

ROSENFELD, P., J. EKSTRAND, E. OLSON, D. SUCHECKI & S. LEVINE (1993) Maternal regulation of adrenocortical activity in the infant rat: effects of feeding. **Dev Psychobiol**, 26, 261-77.

ROSENZWEIG, E. S. & C. A. BARNES (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Prog Neurobiol**, 69, 143-79.

ROSS, F. M., S. M. ALLAN, N. J. ROTHWELL & A. VERKHRATSKY (2003) A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. **J Neuroimmunol**, 144, 61-7.

SANCHEZ, M. M. (2006) The impact of early adverse care on HPA axis development: nonhuman primate models. **Horm Behav**, 50, 623-31.

SAPER, C. B. & P. E. SAWCHENKO (2003) Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. **J Comp Neurol**, 465, 161-3.

SCHAFFER, D. P., E. K. LEHRMAN & B. STEVENS (2012) The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia**.

SCHMIDT, B., D. F. MARRONE & E. J. MARKUS (2012) Disambiguating the similar: The dentate gyrus and pattern separation. **Behav Brain Res**, 226, 56-65.

SCHNEIDER, H., F. PITOSI, D. BALSCHUN, A. WAGNER, A. DEL REY & H. O. BESEDOVSKY (1998) A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, 7778-83.

SHU, S. Y., G. JU & L. Z. FAN (1988) The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neurosci Lett**, 85, 169-71.

SPANGLER, E. L., K. S. WAGGIE, J. HENGEMIHLE, D. ROBERTS, B. HESS & D. K. INGRAM (1994) Behavioral assessment of aging in male Fischer 344 and brown Norway rat strains and their F1 hybrid. **Neurobiol Aging**, 15, 319-28.

SPULBER, S., L. MATEOS, M. OPRICA, A. CEDAZO-MINGUEZ, T. BARTFAI, B. WINBLAD & M. SCHULTZBERG (2009) Impaired long term memory consolidation in transgenic mice overexpressing the human soluble form of IL-1ra in the brain. **J Neuroimmunol**, 208, 46-53.

STANTON, M. E., J. WALLSTROM & S. LEVINE (1987) Maternal contact inhibits pituitary-adrenal stress responses in preweanling rats. **Dev Psychobiol**, 20, 131-45.

STOCKLEY, P. & G. A. PARKER (2002) Life history consequences of mammal sibling rivalry. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, 12932-7.

STREIT, W. J. & G. W. KREUTZBERG (1988) Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. **J. Comp. Neurol.**, 268, 248- 263.

STREIT, W. J., S. A. WALTER & N. A. PENNELL (1999) Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol. Aging*, 57, 563-581.

SUZUKI, W. A. & N. S. CLAYTON (2000) The hippocampus and memory: a comparative and ethological perspective. **Curr Opin Neurobiol**, 10, 768-73.

TEATHER, L. A., J. E. MAGNUSSON, C. M. CHOW & R. J. WURTMAN (2002) Environmental conditions influence hippocampus-dependent behaviours and brain levels of amyloid precursor protein in rats. **Eur J Neurosci**, 16, 2405-15.

TREMBLAY, M., B. STEVENS, A. SIERRA, H. WAKE, A. BESSIS & A. NIMMERJAHN (2011) The role of microglia in the healthy brain. **J Neurosci**, 31, 16064-9.

TULVING, E. (2001) Episodic memory and common sense: how far apart? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356, 1505-15.

URIARTE, N., A. FERREIRA, X. F. ROSA, V. SEBEN & A. B. LUCION (2008) Overlapping litters in rats: effects on maternal behavior and offspring emotionality. **Physiol Behav**, 93, 1061-70.

VAN DER STAAY, F. J. (2002) Assessment of age-associated cognitive deficits in rats: a tricky business. **Neurosci Biobehav Rev**, 26, 753-9.

VAN HASSELT, F. N., J. M. TIESKENS, V. TREZZA, H. J. KRUGERS, L. J. VANDERSCHUREN & M. JOËLS (2012) Within-litter variation in maternal care received by individual pups correlates with adolescent social play behavior in male rats. **Physiol Behav**, 106, 701-6.

VAN HASSELT, F. N., S. CORNELISSE, T. YUAN ZHANG, M. J. MEANEY, E. H. VELZING, H. J. KRUGERS & M. JOELS (2011) Adult hippocampal glucocorticoid receptor expression and dentate synaptic plasticity correlate with maternal care received by individuals early in life. **Hippocampus**.

VAN PRAAG, H., T. SHUBERT, C. ZHAO & F. H. GAGE (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neurosci**, 25, 8680-5.

VANN, S. D. & M. M. ALBASSER (2011) Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. **Curr Opin Neurobiol**, 21, 440-5.

VAUGHAN, D. W. & A. PETERS (1974) Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study. **J Neurocytol**, 3, 405-29.

VAZQUEZ, D. M., C. BAILEY, G. W. DENT, D. K. OKIMOTO, A. STEFFEK, J. F. LÓPEZ & S. LEVINE (2006) Brain corticotropin-releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: effect of maternal deprivation. **Brain Res**, 1121, 83-94.

VUKOVIC, J., D. G. BLACKMORE, D. JHAVERI & P. F. BARTLETT (2011) Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches. **Neurochem Int**, 59, 341-6.

VÁZQUEZ, D. M., H. VAN OERS, S. LEVINE & H. AKIL (1996) Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat. **Brain Res**, 731, 79-90.

WAKE, H., A. J. MOORHOUSE & J. NABEKURA (2011) Functions of microglia in the central nervous system - beyond the immune response. **Neuron Glia Biol**, 7, 47-53.

WILLIAMSON, L. L., P. W. SHOLAR, R. S. MISTRY, S. H. SMITH & S. D. BILBO (2011) Microglia and memory: modulation by early-life infection. **J Neurosci**, 31, 15511-21.

WIMMER, M. E., P. J. HERNANDEZ, J. BLACKWELL & T. ABEL (2011) Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice. **Neurobiol Aging**.

WINOCUR, G. (1998) Environmental influences on cognitive decline in aged rats. **Neurobiol Aging**, 19, 589-97.

YAGIL, R., Z. ETZION & G. M. BERLYNE (1976) Changes in rat milk quantity and quality due to variations in litter size and high ambient temperature. **Lab Anim Sci**, 26, 33-7.

ZHANG, X. Y., Q. ZHANG & D. H. WANG (2011) Litter size variation in hypothalamic gene expression determines adult metabolic phenotype in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). **PLoS One**, 6, e19913.

ZIELASEK, J. & H. HARTUNG (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. **Advances in Neuroimmunology**, 6, 191-222.

ANEXO 01-

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8940 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 10 de fevereiro de 2009

Ofício nº 107/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: **Prof. Rubem Carlos Araújo Guedes**  
Departamento de Nutrição - CCS  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.021970 / 2008 – 77

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *“Estado nutricional e exercício físico: suas repercussões sobre parâmetros eletrofisiológicos cerebrais e comportamentais durante o envelhecimento, no rato albino .”*

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

  
Prof. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA

Observação:  
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;  
Animal; Ratos Wister; Machos; Idade: até 680 dias; Número de  
animais previsto no protocolo: 288 animais.