



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

**ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL REDUZ AS ALTERAÇÕES ASTROCITÁRIAS
E A PROGRESSÃO DA DOENÇA PRION EM MODELO MURINO: ensaios
morfométricos, estereológicos e comportamentais.**

JOÃO BENTO TORRES NETO

ORIENTADOR: Prof. Dr. CRISTOVAM WANDERLEY PICANÇO DINIZ

BELÉM

2014

JOÃO BENTO TORRES NETO

**ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL REDUZ AS ALTERAÇÕES ASTROCITÁRIAS
E A PROGRESSÃO DA DOENÇA PRION EM MODELO MURINO: ensaios
morfométricos, estereológicos e comportamentais.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor, área de concentração Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço
Diniz

BELÉM

2014

...cientistas de alto nível, no Brasil e na comunidade internacional, não separam sua atividade da liberdade criadora, da intuição e de fatores cósmicos que eles aproximam, mais ou menos explicitamente, de Deus; não a separam, enfim, de sua personalidade total e de um contacto envolvente e comprometido com a natureza e o universo.

LEOPOLDO DE MEIS (01/03/1938 – 07/12/2014)

AGRADEÇO

A Minha Família que sempre me apoiou e na figura do meu Pai e minha Mãe se manifestam o meu maior exemplo de doação aos filhos.

A Minha Esposa que completa em mim mais do que como conjugue, me completa como pessoa e professor.

Aos Meus colegas de trabalho que deixaram em mim um pouco de cada e contribuíram para meu trabalho e formação.

Ao Meu Amigo, Professor e Orientador que ensinou e compartilhou mais que conhecimentos e atitudes, me ensinou o valor da generosidade.

RESUMO

Já está bem estabelecido que um estilo de vida sedentário é fator de risco para uma série de doenças crônicas, dentre elas a doença de Alzheimer. A neuropatologia da doença de Alzheimer é caracterizada por depósitos amilóides, perda neuronal, gliose reativa e vacuolização da neurópila. A doença príon tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para estudar aspectos celulares e moleculares da neurodegeneração crônica em muito semelhante àquela descrita na doença de Alzheimer. O ambiente empobrecido das gaiolas padrão de laboratório tem sido usado para mimetizar um estilo de vida sedentário enquanto que o ambiente enriquecido tem sido empregado para mimetizar um estilo de vida ativo. Para testar a hipótese de que o ambiente enriquecido pode contribuir para desacelerar o curso temporal da neurodegeneração crônica associada à doença príon em modelo murino induzimos a doença príon em vinte camundongos fêmeas da variedade suíça albina que tinham sido alojadas aos seis meses de idade em ambiente enriquecido (EE) ou em ambiente padrão (SE) durante cinco meses. Após esse período foram realizadas cirurgias para injeção estereotáxica intracerebral bilateral de homocedano de cérebro de camundongo normal (NBH, n=10) ou de camundongo com sinais clínicos de doença príon terminal (ME7, n=10). Os animais foram devolvidos às suas gaiolas e condições de alojamento originais formando os seguintes grupos experimentais: NBH SE=5, NBH EE=5, ME7 SE=5, ME7 EE=5. Após três semanas foi iniciado teste semanal empregando o burrowing, uma tarefa sensível ao dano hipocampal e 18 semanas após as inoculações realizou-se os testes de memória de reconhecimento de objetos. Encerrados os testes sacrificou-se os animais realizando-se o processamento histológico do tecido nervoso visando a imunomarcagem astrocítica das áreas de interesse. A redução progressiva da atividade de burrowing teve início na décima terceira semana pós injeção no grupo ME7 SE e somente na décima quinta semana no grupo ME7 EE. A habilidade de reconhecer o objeto deslocado no teste de memória espacial foi comprometida no grupo ME7 SE, mas se manteve normal nos demais grupos experimentais. O teste de discriminação entre o objeto novo e o familiar não revelou alterações. As análises quantitativas sem viés dos astrócitos imunomarcados para proteína fibrilar ácida (GFAP) foram realizadas no stratum radiatum de CA3 e na camada polimórfica do giro denteado dorsal. As estimativas estereológicas do número total de astrócitos e do volume do corpo celular revelaram que em CA3 somente ocorre hipertrofia dos corpos celulares em animais dos grupos ME7 SE e ME7 EE em relação aos respectivos controles, sendo o volume médio dos corpos celulares do grupo ME7 EE menor que aquele do grupo ME7 SE. Na camada polimórfica houve significativo aumento do número de astrócitos no grupo ME7 SE em relação ao NBH SE e do grupo NBH EE em relação ao NBH SE. O volume do corpo celular também foi significativamente maior nos grupos ME7 em relação aos respectivos controles dos grupos NBH. As análises morfométricas tridimensionais revelaram importante aumento de volume e área de superfície dos segmentos das árvores astrocíticas nos grupos doentes em comparação aos controles. O enriquecimento ambiental reduziu o aumento de volume dos ramos observado no grupo ME7 e aumentou o número de intersecções dos ramos distais no grupo NBH EE em relação ao NBH SE e nos ramos proximais no grupo ME7 EE em relação ao ME7 SE. O emprego da análise de cluster e discriminante permitiu a identificação dos parâmetros morfométricos que mais contribuíram para a distinção entre os grupos. Para testar a hipótese de existirem subfamílias de astrócitos morfologicamente distintos dentro de cada grupo experimental, foi realizada análise de conglomerados que resultou na formação de duas famílias distintas no grupo NBH SE, três famílias nos grupos NBH EE e ME7 EE e quatro famílias no grupo ME7 SE. As bases celulares e moleculares que conduzem a formação de novas famílias de astrócitos e a neuroproteção associada ao ambiente enriquecido que diminui a velocidade de progressão da doença permanecem por serem investigadas.

Palavras-Chave: 1. Doença Prion, 2. Ambiente Enriquecido, 3. Memória Espacial, 4. Astrócitos, 5. Hipocampo, 6. Giro Denteado, 7. Estereologia, 8. Reconstrução tridimensional

ABSTRACT

It is well established that a sedentary lifestyle is a risk factor for a number of chronic diseases, including Alzheimer's disease. The neuropathology of Alzheimer's disease is characterized by amyloid deposits, neuronal loss, reactive gliosis, and vacuolization of the neuropil. Prion disease has been widely used as an experimental model for studying cellular and molecular aspects of chronic neurodegeneration much similar to that described in Alzheimer's disease. The impoverished environment of standard laboratory cages have been used to mimic a sedentary life whereas enriched environment has been used to mimic an active lifestyle. To test the hypothesis that an enriched environment can help to slow down the time course of chronic neurodegeneration associated with prion disease we induced prion disease in twenty Swiss albino female mice which had been housed at six months of age in an enriched environment (EE) or in a standard (SE) environment for five months. After this period bilateral stereotactic intracerebral injection of normal (NBH, n = 10) or infected brain homogenate (ME7, n = 10) were done. Infected brain homogenate was obtained from mice with clinical signs of terminal prion disease. The injected animals returned to their cages and housing conditions and grouped as follow: SE = NBH 5, EE = NBH 5, ME7 SE = 5, ME7 EE = 5. After three weeks post-injections the burrowing test was initiated. Burrowing is a sensitive task to hippocampal damage. 18 weeks after inoculation memory tests of object recognition was carried out. After behavioral tests animals were euthanized and their brains were histologically processed targeting astrocytic immunostaining of areas of interest. The progressive reduction of the activity of burrowing began in the thirteenth week after injection in group ME7 SE but only in the fifteenth week in ME7 EE group. The ability to recognize the displaced object in spatial memory test was impaired in ME7 SE group but remained normal in the other experimental groups. The test of discrimination between the new object and the family revealed no abnormalities. Quantitative analysis of GFAP immunostained cells were performed in the dorsal stratum radiatum of CA3 and in the polymorphic layer of the dorsal dentate gyrus. The stereological estimates of the total number of astrocytes and the volume of the cell body revealed that the number of astrocytes did not change but a significant hypertrophy occurs in CA3 cell bodies of ME7 SE and ME7 EE groups as compared to their respective controls. The average volume of the cell bodies of the ME7 EE group was smaller than that of the group ME7 SE. However similar analysis applied to the polymorphic layer revealed a significant increase in the number of astrocytes in the ME7 SE group in relation to NBH SE group and in ME7 EE compared to NBH EE. The volume of the cell body was also significantly higher in ME7 groups compared to their respective control groups. The three-dimensional morphometric analysis revealed significant increase in volume and surface area of the segments of astrocytic trees in diseased groups compared to controls. Environmental enrichment reduced swelling observed in the branches of ME7 group and increased the number of intersections of the distal branches in NBH EE group relative to NBH SE and the proximal branches in the group ME7 EE compared with ME7 SE. The use of cluster analysis and discriminant allowed the identification of morphometric parameters that contributed most to the distinction between the groups. To test the hypothesis that there are subfamilies of morphologically distinct astrocytes within each experimental group, we applied cluster and discriminant analysis to each experimental group and these analysis resulted in the formation of two distinct families in NBH SE group, three families in NBH EE and ME7 EE groups and four families in the ME7 SE group. The molecular and cellular changes, which lead to the formation of new families of astrocytes, and to the neuroprotection associated with an enriched environment slowing down the progression of the prion disease, remain to be investigated.

Palavras-Chave: 1. Prion Disease, 2. Enriched Environment, 3. Spatial Memory, 4. Astrocytes, 5. Hippocampus, 6. Dentate Gyrus, 7. Stereology, 8. Tridimensional Reconstruction

LISTA DE FIGURAS

Lista de figuras

Figura 1. Hodologia, circuitos e organização regional e laminar da formação hipocampal.	15
Figura 2. Diagrama esquemático das áreas envolvidas com o reconhecimento da identidade de objetos (O quê?) e de sua localização espacial (Onde?).	17
Figura 3. Mecanismos da doença de Alzheimer semelhantes aos da doença prion.	21
Figura 4. Principais funções astrocíticas relacionadas à GFAP.	27
Figura 5. Fotomicrografias e representação gráfica com valores médios para a estimativa da população total de astrócitos no septo lateral, camada polimórfica do giro denteado e de CA1 no grupo controle (NBH) e com doença prion 15 e 18 semanas após a injeção (W) intra-hipocampal de ME7.	29
Figura 6. A figura apresenta fotomicrografias do giro denteado do camundongo médio dos grupos de ambiente padrão (SE) e de enriquecido (EE).	30
Figura 7. Sequência temporal do desenho experimental	32
Figura 8. Foto do ambiente enriquecido (EE) equipado com rodinhas de correr e objetos de cores e formas diferentes (A), e do ambiente padrão (SE) com o mínimo de estímulos somatomotores e visuoespaciais (B).	33
Figura 9. Aparato utilizado para realização do teste de burrowing	35
Figura 10. Representação esquemática dos testes de reconhecimento da identidade do objeto (acima) e da localização espacial (abaixo)	37
Figura 11. Representação esquemática da distribuição das caixas de contagem com as linhas de inclusão (verdes) e linhas de exclusão (vermelhas) nas interseções da matriz de contagem.	44
Figura 12. Fotomicrografia de astrócito com as linhas radiais cruzando o centro do marcador de contagem do fracionador óptico	46
Figura 9. Quantidade de ração removida durante o burrowing como uma função da progressão da doença prion.	43
Figura 10. Reconhecimento da identidade e localização espacial de objetos na 18 spi.	44
Figura 11. Ambiente e doença influenciam (two-way ANOVA $p < 0,01$; $p < 0,036$ respectivamente) o número total e o volume de corpo celular de astrócitos da camada polimórfica (A, C) e o stratum radiatum de CA3 (B, D).	46
Figura 12. Representação gráfica da média dos valores morfométricos das reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro denteado.	46
Figura 13. Fotomicrografia do giro denteado e grid de amostragem sistemática e aleatória para escolha dos astrócitos reconstruídos.	47
Figura 14. Quantidade de ração removida durante o burrowing como uma função da progressão da doença prion.	51
Figura 15. Reconhecimento da identidade e localização espacial de objetos na 18 spi.	52
Figura 16. Ambiente e doença influenciam o número total e o volume de corpo celular de astrócitos da camada polimórfica (A, C) e o stratum radiatum de CA3 (B, D) (two-way ANOVA $p < 0,01$; $p < 0,036$ respectivamente).	54
Figura 17. Representação gráfica do número total de astrócitos na camada polimórfica do giro denteado e do índice de discriminação de objetos no teste de localização espacial.	55
Figura 18. Representação gráfica da média dos valores morfométricos das reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro denteado.	57
Figura 19. Reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada polimórfica do giro denteado (acima) e respectivos dendrogramas (abaixo).	58
Figura 20. Representação gráfica da análise dos círculos de Sholl para ilustrar mudanças espaciais bidimensionais nos padrões de ramificação.	59
Figura 21. Análise de conglomerados (Ward) de todos os 171 astrócitos reconstruídos para testar a hipótese de que os astrócitos de camundongo com doença prion são morfologicamente distintos dos astrócitos de camundongos controles.	61

Figura 22. Representação gráfica da análise de conglomerados (Ward) de cada grupo experimental (NBHSE, NBHEE, ME7SE e ME7EE) para testar a hipótese da existência de famílias de astrócitos morfologicamente distintos dentro de cada grupo.	63
Figura 23. Representação gráfica para ilustrar a análise de conglomerados (Método de Ward) (A), Distribuição canônica da análise discriminante (B), Regressão linear entre volume do corpo celular e superfície dos segmentos e volume dos segmentos (C) e entre volume do corpo celular com perímetro e área do soma (D).	65
Figura 24. Representação gráfica da análise convex hull aplicada aos astrócitos reconstruídos da camada polimórfica.	66
Figura 25. Representação esquemática das conexões do sistema de memória de reconhecimento da localização espacial e da forma dos objetos envolvendo o lobo temporal medial.	71
Figura 26. Sumário dos conceitos relacionados à hipótese da separação de padrões.	73
Figura 27. Deformação de secções na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento	80

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	06
1.1 Envelhecimento e Doenças Neurodegenerativas Crônicas	06
1.2 Envelhecimento, Doenças Crônicas Neurodegenerativas e Enriquecimento Ambiental/Exercício Físico	09
1.3 Organização estrutural do hipocampo e do giro denteado	14
1.4 O Giro Denteado, CA1 e Memória Espacial	16
1.5 Mecanismos Moleculares das Doenças por Príons	20
1.6 O Modelo Experimental	24
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Grupos Experimentais	32
3.2 Condições ambientais de alojamento	33
3.3 Procedimentos para Inoculação do Agente ME7	33
3.4 Teste de Remoção e Estocagem de Comida (Burrowing)	34
3.5 Memória de Objeto	35
3.6 Perfusão e Procedimento Histológico	38
3.6.1 <i>Imunohistoquímica para GFAP</i>	38
3.6.2 <i>Contracoloração de Nissl</i>	41
3.7 Estereologia	42
3.8 Reconstrução tridimensional de astrócitos	46
3.9 Análise Estatística	49
4 RESULTADOS	50
4.1 Alterações comportamentais	50
4.1.1 <i>Remoção e estocagem de comida (Borrowing)</i>	50
4.1.2 <i>Memória de reconhecimento de objeto</i>	51
4.2 Alterações Astrogliais	52
5 DISCUSSÃO	67
5.1 Alterações Astrocíticas em Modelos Murinos Transgênicos da Doença de Alzheimer e em Modelo Murino de Doença Prion	68
5.2 Possíveis correlatos funcionais: gliotransmissão	69
5.3 Correlatos entre doença príon, astrocitose reativa no giro denteado, enriquecimento ambiental e função cognitiva	70
5.4 Os Limites das Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico e pela Reconstrução Tridimensional.	79
6 CONCLUSÃO	84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
Anexo 1 – Declaração de aprovação pelo comitê de ética	107
Anexo 2 - Resultados individuais dos parâmetros estereológico e coeficientes de erro	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento e Doenças Neurodegenerativas Crônicas

A maioria das pessoas com sessenta anos ou mais (em números absolutos) está vivendo em países em desenvolvimento. Estudos prospectivos feitos pela Organização Mundial de Saúde revelam que em 2020, o mundo contará com mais de 400 milhões de idosos e o Brasil ocupará a sexta posição dentre os países com o maior contingente de idosos na população. De fato, 20% da população do mundo industrializado já está acima dos sessenta anos de idade e a proporção daqueles acima de 85 anos está crescendo seis vezes mais rápido do que a população como um todo. As projeções estatísticas percentuais da Organização Mundial de Saúde acerca do percentual de idosos dentre a população total no Brasil (devido a transição demográfica em curso), revelam que o país se moverá dos cerca de 7,3% detectados em 1991, para cerca de 15% em 2025. No Brasil o novo século já começou com a parcela mais velha da população crescendo a uma taxa duas vezes maior do que a da população como um todo.

As doenças do envelhecimento tornaram-se parte importante dos sistemas nacionais de saúde do mundo moderno, devido ao crescimento médio da expectativa de vida. É fato reconhecido que os maiores gastos com saúde se dão no último ano de vida do idoso, com o acréscimo correspondente das necessidades de cuidados de enfermagem domiciliar, projetadas para crescer em cerca de quatro vezes nos próximos cinco a vinte anos (Wick *et al.*, 2000). O governo brasileiro está atento para o problema, preparando a infra-estrutura e treinando profissionais da área para facilitar a oferta de serviços para mais de 32 milhões de pessoas idosas em 2020 (ver documento intitulado “Programa de Saúde do Idoso no site www.saude.gov.br).

Dentre as doenças do envelhecimento, o declínio cognitivo ou demência afeta cerca de 50% das pessoas com 80 anos ou mais e os números brasileiros a ele relacionados são significativos. O documento intitulado “Saúde do Idoso” do Ministério da Saúde estima que,

em números absolutos, há hoje no Brasil cerca de 450 a 600 mil idosos dementes, cerca de 15 a 20 mil mortes como consequência da doença de Alzheimer e 115 mil hospitalizações registradas num único ano como consequência de demência (dados estatísticos do Sistema Nacional de Saúde de 1996).

No contexto das doenças neurodegenerativas crônicas, a doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência e, além da suscetibilidade genética definida pela presença do alelo APOE- ϵ 4, existem fatores comportamentais e ambientais, como o sedentarismo, que apresentam alto índice de correlação epidemiológica (Geda *et al.*, 2010).

Agrava-se esse risco durante o envelhecimento quando a imunosenescência indutora de alterações estruturais e funcionais no sistema imune torna os adultos velhos mais vulneráveis à inflamação (Ginaldi *et al.*, 2001). A imunosenescência é caracterizada por uma complexa e profunda remodelagem do sistema imune, que parece ser influenciada, principalmente, pelo histórico de exposição prévia à diversidade antigênica e o estresse oxidativo. O envelhecimento do sistema imune predispõe o organismo à condições inflamatórias crônicas, as quais implicam em ativação de mecanismos que podem contribuir para desencadear uma série de patologias relacionadas à idade, como doenças neurodegenerativas, demência, osteoporose, arteriosclerose, diabetes, doenças neoplásicas e cardiovasculares. Assim, o sistema imune torna os adultos velhos mais vulneráveis às doenças, visto que a ativação policlonal em resposta a novos antígenos também está diminuída (Ginaldi *et al.*, 2001).

Eventos inflamatórios no sistema nervoso central incluindo aumento de imunoreatividade para Proteína Fibrilar Ácida (GFAP) e Fator-Alpha de Necrose Tumoral (TNF α) observados após injeção de lipopolissacarídeo (que mimetiza uma infecção periférica) agravam os danos produzidos pela microglia previamente ativada pela doença neurodegenerativa crônica em modelo murino (Perry, 2004; Cunningham, C *et al.*, 2005; Perry *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2009)

O envelhecimento parece ter origem em múltiplos fatores que conduzem a uma ruptura do equilíbrio delicado entre o estresse oxidativo e a capacidade redutora que protege as células das ações deletérias dos radicais livres. O estresse mitocondrial crônico presente no envelhecimento mimetiza a resposta genética que sucede a infecção crônica levando a resposta inflamatória característica da idade avançada (Lane, 2003). Além disso, há evidências de que os neurônios danificados pelo estresse oxidativo na doença de Alzheimer apresentam um aumento significativo do DNA mitocondrial no citoplasma neuronal e nos vacúolos contendo lipofuscina, além de diminuição do número de mitocôndrias (Hirai *et al.*, 2001).

Nossos estudos anteriores fornecem evidências para compreensão quantitativa das alterações celulares gliais decorrentes do envelhecimento e suas repercussões sobre função cognitiva. Demonstramos que o envelhecimento produz aumento da população de astrócitos imunoreativos para proteína fibrilar acida (GFAP-IR) no giro denteado (Diniz *et al.*, 2010), em CA1 (Frota De Almeida *et al.*, 2012) e essas alterações astrocíticas estão associadas a perdas de desempenho em testes de aprendizado espacial. Demonstramos igualmente que em ratos envelhecidos os animais com declínio cognitivo, apresentam aumento do número de micróglia nas três camadas do giro denteado com alterações no padrão de distribuição laminar. A morfologia microglial também é significativamente alterada pelo envelhecimento que induz hipertrofia dos segmentos e do corpo celular estando esses últimos linearmente relacionados entre si (Viana *et al.*, 2013).

Há um conjunto de evidências que indicam que a atividade física declina naturalmente durante o envelhecimento e por conta disso o declínio cognitivo é agravado (Ingram, 2000; Sutoo and Akiyama, 2003). Em concordância estudos realizados em roedores apontam que o exercício físico e o ambiente enriquecido podem melhorar aspectos cognitivos e desempenho discriminativo em testes de aprendizado e de memória espacial, assim como reduz o declínio

da atividade física espontânea observada no envelhecimento (Spirduso and Farrar, 1981; Fordyce *et al.*, 1991; Fordyce and Wehner, 1993; Ingram *et al.*, 1994; Skalicky *et al.*, 1996).

A realização de medidas da função cerebral em função do exercício, em humanos, tem revelado correlações estreitas entre exercício físico e cognição. Os programas para alcançar a boa forma física com impacto positivo nas habilidades mentais mesmo em adultos idosos são bons indicadores dessa associação (Churchill *et al.*, 2002).

Assim é relevante buscar-se compreender melhor a biologia do envelhecimento e suas relações com as doenças neurodegenerativas crônicas e infecção para contribuir para o desenvolvimento da capacidade instalada para enfrentar os desafios impostos pela maior expectativa de vida alcançada neste século.

1.2 Envelhecimento, Doenças Crônicas Neurodegenerativas e Enriquecimento Ambiental/Exercício Físico

Na esfera do comportamento humano, numerosos estudos sugerem que a atividade física afeta o comportamento e que a realização de medidas da função cerebral em função do exercício tem revelado correlações estreitas entre exercício físico e cognição (Churchill *et al.*, 2002). Tem sido igualmente descrito que existe correlação entre exercício aeróbico, fluxo sanguíneo cerebral e melhora das funções metabólicas e neuroquímicas que suportam funções executivas (Churchill *et al.*, 2002). Por outro lado, os estudos de fisiopatologia das doenças neurodegenerativas crônicas tem encontrado correlação positiva entre nível de atividade física e preservação da função cognitiva durante o envelhecimento em pacientes com a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (Woo, 2000; Hayes *et al.*, 2013).

Além disso há extensa documentação na literatura internacional validando a prática de atividade física regular como parte do tratamento das demências (Lautenschlager *et al.*, 2008; Volkens and Scherder, 2011). Essa recomendação é extensível às alterações endócrinas,

cardiovasculares e metabólicas, que tem sido relacionadas como fatores de risco para o desenvolvimento ou para o agravamento da Doença de Alzheimer. Essas doenças consideradas fatores de risco apresentam em comum a inflamação crônica subclínica (Palleschi *et al.*, 1996; Lytle *et al.*, 2004; Vaynman and Gomez-Pinilla, 2005; Handschin and Spiegelman, 2008; Brinkley *et al.*, 2009; Nicklas and Brinkley, 2009).

Sem grande ênfase o Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento publicou (Vale *et al.*, 2011) as recomendações da Academia Brasileira de Neurologia para o “Tratamento da Doença de Alzheimer” onde recomenda a prática de atividade física ou o exercício terapêutico como ferramentas não-medicamentosas no tratamento da Doença de Alzheimer, classificando tais atividades com o Nível de evidência C¹. Os estudos em populações humanas têm apontado relação positiva entre a prática de atividade física e saúde cognitiva, observando diminuição da incidência da Doença de Alzheimer nas populações fisicamente ativas e destacando a atividade física como parte da estratégia terapêutica no tratamento de demências. Essa prática tem contribuído para a prevenção ou atenuação do declínio cognitivo nos indivíduos idosos (Hillman *et al.*, 2002; Sutoo and Akiyama, 2003; Lytle *et al.*, 2004; Larson *et al.*, 2006).

Em concordância trabalho recente demonstrou que um programa de 48 sessões de estimulação multissensorial e cognitiva melhoram o desempenho cognitivo de idosos sedentários hospedados em instituições de longa permanência em maior proporção do que idosos não institucionalizados, vivendo em comunidade com suas famílias (De Oliveira *et al.*, 2014).

Coerentemente têm sido observados menores índices de marcadores inflamatórios em idosos saudáveis que apresentam maior nível de atividade física, caracterizando o efeito “anti-

¹ “Possivelmente eficaz, ineficaz ou prejudicial (e possivelmente útil/preditiva ou não útil/preditiva) para uma dada condição na população especificada. (Classificação de nível C requer pelo menos um estudo Classe II, ou dois estudos Classe III consistentes)” (Vale *et al.*, 2011).

inflamatório” do exercício físico, o que pode sugerir sua contribuição protetora contra patologias associadas às inflamações sistêmicas crônicas de baixa intensidade (Colbert *et al.*, 2004; Petersen and Pedersen, 2005; Pedersen and Febbraio, 2008; Pedersen, 2009). Estes dados dão sustentação a hipótese de que a atividade física regular exerce efeito neuroprotetor e poderia desacelerar o curso temporal das demências.

Os mecanismos básicos que dão suporte a essas correlações são em grande extensão desconhecidos. Para (Ingram, 2000), o conjunto de evidências relacionado às bases biológicas do envelhecimento pode ser descrito a partir de três grandes linhas: (1) dados que ilustram de forma categórica que existe correlação entre declínio na atividade física e idade em todas as espécies testadas até agora; (2) Dados que sugerem que o declínio da atividade é um fator preditivo da duração da vida: Com níveis aumentados de atividade física associados a um aumento da longevidade; (3) O declínio da atividade parece estar relacionado a níveis alterados de neurotransmissores envolvendo o sistema dopaminérgico central com redução dos receptores ou da liberação de dopamina associados ao declínio da atividade física (Ingram, 2000; Sutoo and Akiyama, 2003).

Em roedores, tem sido apontado que o exercício pode melhorar aspectos cognitivos e o desempenho discriminativo em testes de aprendizado e memória espacial, tempo de resposta de fuga, assim como parece postergar o início do declínio da atividade física espontânea observada no envelhecimento (Spirduso and Farrar, 1981; Fordyce *et al.*, 1991; Fordyce and Wehner, 1993; Ingram *et al.*, 1994; Skalicky *et al.*, 1996). O declínio da atividade física reflete interações complexas envolvendo a capacidade mitocondrial de produzir energia, alterações em membranas celulares afetando o fluxo iônico e a transdução de sinais, comprometimento da circulação sanguínea afetando o aporte de nutrientes e a remoção de catabólitos e alterações estruturais da fibra muscular e sua inervação. O sistema nitrérgico é igualmente afetado com

reduções regionais apontadas até agora no córtex parietal, olfatório, entorrinal, estriado e hipocampo (Necchi *et al.*, 2002).

Uma outra face do problema não ainda completamente explorada é a investigação das alterações sensoriais e motoras primárias. Em 2002, Godde e colaboradores revisaram um conjunto de trabalhos elegantes utilizando registro eletrofisiológico e registro óptico no sistema somatossensorial de roedores que consolidam a hipótese de que fenômenos neurodegenerativos e regenerativos podem coexistir durante o envelhecimento e que o processo regenerativo depende fundamentalmente de um ambiente rico em estímulos relacionados ao déficit sensorial já instalado. Por extensão levantaram a hipótese de que os déficits cognitivos podem igualmente ser causados pelas alterações nas áreas sensoriais primárias e que o déficit sensorial não degenerativo pode ser corrigido, contribuindo para evitar o agravamento do déficit cognitivo a ele relacionado. Mais especificamente os autores se referem aos déficits regionais identificados nos mapas sensoriais, tais como propriedades de campo receptor, intensidade das respostas, reorganização de mapas topográficos que são afetados pela redução dos inputs sensoriais decorrentes do desuso na idade avançada. Consistente com isso é o fato de que as perdas somatomotoras no animal idoso se instalam de forma dramática na região de representação das patas posteriores, sendo preservada a região de representação das patas anteriores que desenvolvem um padrão de atividade motora mais intensa e diversificada ao longo da vida (Godde *et al.*, 2002).

Os estudos com marcador metabólico da atividade neural empregando a citocromo-oxidase revelaram que as modificações relacionadas ao exercício voluntário foram detectadas nas regiões de representação das patas no corpo estriado (região dorso-lateral), córtex motor e cerebelo, mas não no hipocampo. A correlação com os estudos de fluxo sanguíneo é positiva demonstrando-se um aumento da utilização regional de glicose e da captação de oxigênio (Black *et al.*, 1990; Mccloskey *et al.*, 2001; Garifoli *et al.*, 2003). Em concordância, há uma

série de modificações em nível molecular tais como o incremento de fatores neurotróficos e aumento da LTP e LTD, tanto quanto em nível estrutural com a formação de novos neurônios e aumento do número de sinapses (Van Praag *et al.*, 2005). Dentre as alterações observadas no envelhecimento, as que estão relacionadas à vascularização cerebral tem sido associadas à doenças crônicas como Alzheimer e agudas como o acidente vascular cerebral (AVE). A prática de exercícios físicos regulares tem se mostrado eficiente na prevenção de acidente vascular encefálico (Liang *et al.*, 2009), assim como na redução do declínio cognitivo associado ao envelhecimento e ao mal de Alzheimer (Woo, 2000).

Um dos mecanismos associados a esses efeitos benéficos é a angiogênese, já demonstrada em roedores que se exercitam regularmente. O aumento na angiogênese, em decorrência do exercício, observada no cerebelo e hipocampo (Van Praag *et al.*, 2005; Kleim *et al.*, 2007) é mediada pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que desempenha papel fundamental na neurogênese hipocampal e crescimento dendrítico cortical, atuando como fator neurotrófico (Greenberg and Jin, 2005). O óxido nítrico e o exercício físico parecem estar intrinsecamente relacionados na definição do curso temporal do declínio cognitivo associado a essas alterações neuropatológicas, reduzindo a velocidade do curso temporal da demência sendo a presença de riscos cardiológicos que podem impedir a recomendação de exercícios físicos adequados um dado importante que confirma essa associação (Eggermont *et al.*, 2006). O óxido nítrico também tem sido apontado como neuroprotetor ou neurotóxico dependendo dos níveis de síntese e do contexto neuropatológico: pode exercer ações neuroprotetoras impedindo a ativação da caspase 3 e por consequência apoptose e morte neuronal (Kim *et al.*, 1999). Em trabalho prévio demonstramos anteriormente que diferentes modalidades de exercício podem aumentar as enzimas de síntese do óxido nítrico no hipocampo e giro denteado melhorando a performance em testes de memória espacial

(Torres *et al.*, 2006) e possivelmente contribuindo para formação de memórias através ações de longo prazo (LTP ao LTD).

Uma vez que o hipocampo e o córtex entorrinal, são estruturas cerebrais chave nesses processos, e que contribuem de forma importante para o aprendizado e memória é útil rever sua organização morfofuncional.

1.3 Organização estrutural do hipocampo e do giro denteado.

O hipocampo é dividido em Corno de Amon (CA) 1, 2, 3 e 4 e região superior e inferior (Brown and Zador, 1990) ou região septal (dorsal) e região temporal (ventral) (Blackstad, 1956; Van Groen *et al.*, 2003). CA1 e CA3 formam o hipocampo propriamente dito, e como CA2 é pequeno e indistinto em algumas espécies ele é frequentemente incluído em CA1 nas análises. O giro denteado (GD), o subiculum, o córtex entorrinal (EC) e CA4 são incluídos no termo “formação hipocampal” e a área entre o GD e o *stratum granulosum* de CA3 é chamada de polimórfica ou região hilar ou simplesmente hilus (Brown and Zador, 1990).

O hipocampo apresenta fundamentalmente três camadas, a camada polimórfica (*stratum oriens*), camada piramidal (*stratum pyramidale*) e camada molecular (*stratum radiatum e stratum lacunosum-moleculare*). O GD consiste em camada polimórfica (hilus), camada granular (*stratum granulosum*) e a camada molecular (*stratum moleculare*) que é contínua com o hipocampo (Brown and Zador, 1990). Os principais neurônios do hipocampo são os neurônios piramidais de CA1, CA2 e CA3 e os do GD são as células granulares. As conexões sinápticas no hipocampo são geralmente axodendríticas e axosomáticas e os principais neurotransmissores são, GABA, norepinefrina e acetilcolina (Brown and Zador, 1990). As aferências mais densas do hipocampo provêm do córtex entorrinal e a propagação da informação entorrinal aferente no interior do hipocampo se dá através de uma sequência de sinapses excitatórias que de uma forma simplificada é referida como um circuito trissináptico (Figura 1). A primeira sinapse

desse circuito ocorre na camada molecular, entre as fibras do córtex entorrinal, que constituem a via perfurante, e as células granulares do giro denteado. A segunda ocorre nos *stratum lucidum* e *radiatum* entre os axônios das células granulares do giro denteado (fibras musgosas) e os neurônios piramidais de CA3, de onde partem os axônios (colaterais de Schaffer) para formar a terceira sinapse com as células piramidais de CA1. Nesse sentido, as operações funcionais intrínsecas que ocorrem tanto no giro denteado, quanto no córtex entorrinal, têm um papel importante no processamento subsequente da informação e consolidação da memória (Turner *et al.*, 1998).

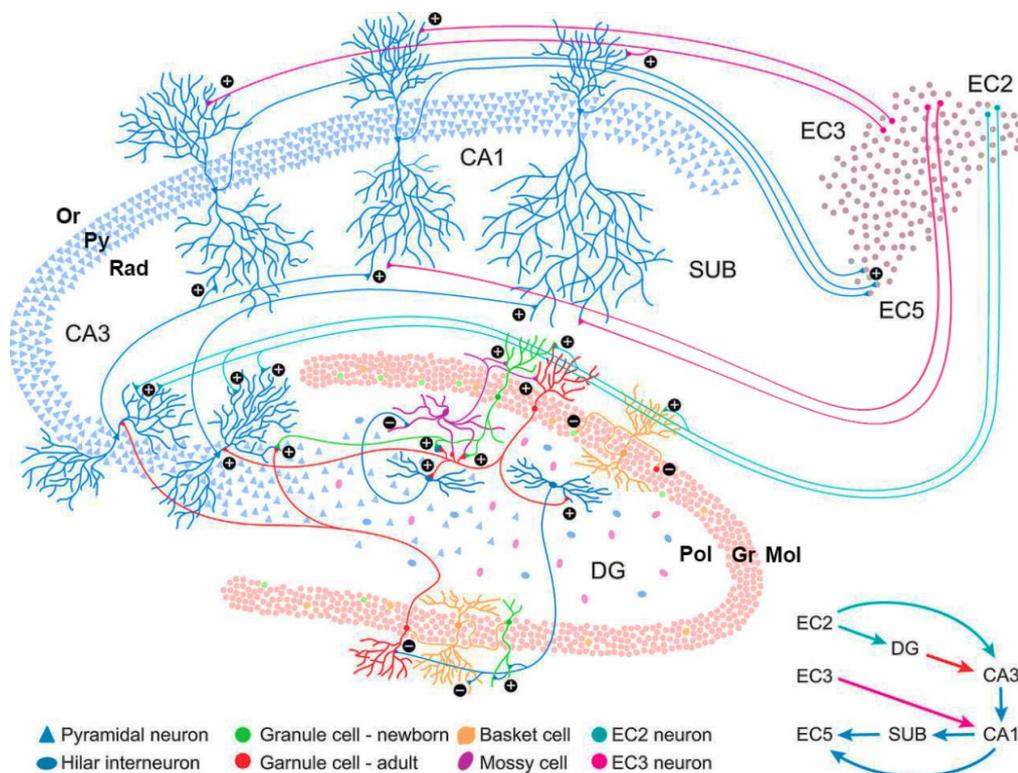


Figura 1. Hodologia, circuitos e organização regional e laminar da formação hipocampal. EC: Córtex entorrinal, DG: giro denteado, CA, Corno de Amon, SUB: subículo, Camadas; molecular (Mol), granular (Gr) e polimórfica (Pol) do giro denteado, stratum oriens (Or), stratum pyramidale (Py) e stratum radiatum (Rad) do hipocampo. Aferências da camada II do EC excitam neurônios granulares novos e “adultos” e células em cesto da camada granular. Neurônios piramidais de CA3 também recebem terminais axonais da camada II do EC. Células musgosas e interneurônios da camada polimórfica realizam alça de retroalimentação com neurônios granulares. As fibras musgosas dos neurônios granulares fazem a segunda sinapse do circuito básico com os dendritos apicais dos neurônios piramidais de CA3 que enviam seu axônios (colaterais de Schaffer) para CA1 onde fazem sinapse excitatória com os dendritos apicais dos neurônios piramidais. Os neurônios piramidais de CA1 também recebem sinapses excitatórias, nos dendritos apicais e basais, de neurônios da camada III do EC. Os neurônios piramidais de CA1 são a principal via eferente para o SUB e a camada V do EC. Adaptado de (Aimone *et al.*, 2014)

1.4 O Giro Denteado, CA1 e Memória 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) (Eichenbaum *et al.*, 2012). Essas memórias respondem basicamente a três perguntas acerca do objeto que se examina: O que é? Onde está? e Quando?, possibilitando a distinção inambígua entre objetos novos e familiares. Para dar conta dessa tarefa o cérebro precisa acentuar as diferenças entre as experiências antigas e novas antes que a codificação ocorra, de modo a poder distingui-las (Schmidt *et al.*, 2012).

Em recente trabalho de revisão Kesner (Kesner, 2013) sintetiza a contribuição funcional do giro denteado para a memória de reconhecimento contextual de objetos em cinco itens: 1) processamento integrativo convergente de aferências sensoriais múltiplas visando a representação espacial; 2) acentuação das diferenças entre estímulos espaciais ambíguos executando o padrão de separação espacial; 3) separação contextual; 4) informação contextual no reconhecimento de objetos e 5) integração temporal, memória remota e padrão de separação espacial dependente de neurogênese. Um sexto item é atribuído à região ventral do giro denteado que participa no processamento de informação de odores por mecanismo de separação de padrões (Kesner, 2013). Para executar a tarefa de integração e separação de padrões o giro denteado recebe aferências múltiplas que incluem as originárias dos córtices relacionados ao sistema vestibular, olfatório, visual, auditivo e somatossensorial, convergindo para o hipocampo através das áreas perirrinal e entorrinal lateral, assim como recebe projeções específicas para a representação espacial em células especializadas (Aggleton, 2012). Num caso e noutro é através das vias perfurantes lateral e medial que essas informações são carreadas, de modo que o componente medial é seletivo para o processamento de informação espacial e o componente lateral para os componentes não espaciais (Witter *et al.*, 1989; Hafting *et al.*, 2005; Hargreaves *et al.*, 2005).

A Figura 2 é um diagrama esquemático das conexões associadas ao sistema de memória do lobo temporal medial em mamíferos, proposto por Eichenbaum e colaboradores (Eichenbaum *et al.*, 2012) em revisão recente. As vias de projeção associadas à localização espacial (O quê?) são dirigidas ao córtex perirrinal e a área entorrinal lateral, enquanto que o reconhecimento da localização espacial do objeto (Onde?) é feito através das projeções dirigidas para a área parahipocampal e o córtex entorrinal medial. No hipocampo essas projeções são integradas permitindo que se possa dizer o que é e onde está o objeto de interesse.

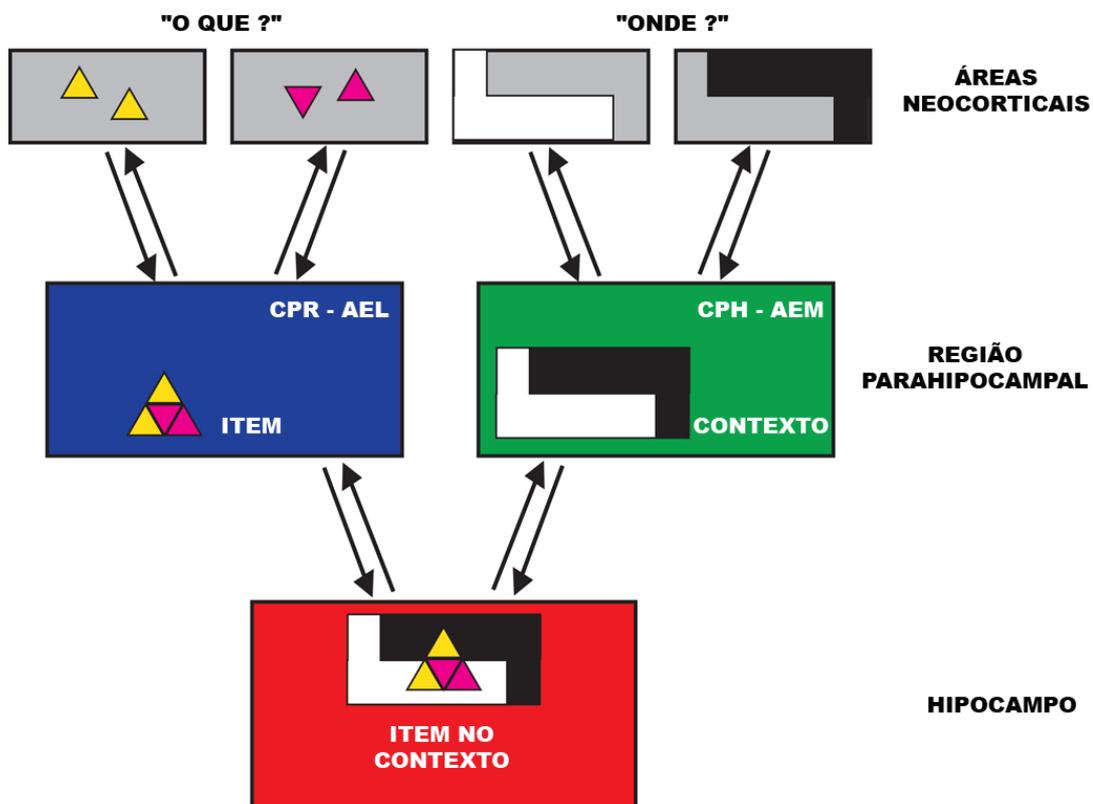


Figura 2. Diagrama esquemático das áreas envolvidas com o reconhecimento da identidade de objetos (O quê?) e de sua localização espacial (Onde?). As projeções associadas a respostas à primeira pergunta envolvem áreas neocorticais que se projetam para o córtex perirrinal (CPR) e o córtex entorrinal lateral (AEL) enquanto que aquelas associadas à pergunta acerca da localização espacial se projetam para o córtex parahipocampal (CPH) e para o córtex entorrinal medial (AEM). Enquanto que as projeções para as áreas CPR-AEL representam objetos individuais, as projeções para as áreas CPH-AEM representam informações contextuais (localização espacial). A partir dessas áreas novas projeções convergem para o hipocampo onde os objetos são agora representados de forma integrada (contextualizada) possibilitando responder de forma simultânea o que é? e onde está? Do hipocampo partem projeções de feedback que retornam às áreas parahipocampais de onde partem novas projeções para as áreas neocorticais de origem (Eichenbaum *et al.*, 2012).

Numerosas evidências apontam que a integridade do giro denteado é fundamental para a memória de reconhecimento de objeto e o seu comprometimento diminui a capacidade dos indivíduos lesionados de distinguir objetos (padrões) similares em contextos espaciais diferentes (Gilbert *et al.*, 2001). No mesmo trabalho esses autores demonstram que a separação de padrões temporais é função de CA1.

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. 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 é a previamente denominada separação de padrões (Leutgeb and Moser, 2007).

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).

A capacidade de detectar quando um estímulo é novo ajuda o animal a focar sua atenção aos eventos que potencialmente representam novas ameaças ou novas oportunidades e a questão que se impõe é a de 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 identificando quando se trata de um objeto novo ou familiar enquanto que o reconhecimento associativo permite identificar se um grupo de elementos familiares foi ou não espacialmente reconfigurado (Aggleton *et al.*, 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 (Barbosa *et al.*, 2013). 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 destacar a contribuição da neurogênese no giro denteado para o aprendizado espacial e a formação de novas memórias espacial e de reconhecimento de objeto (Gil-Mohapel *et al.*, 2013); 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 (Li *et al.*, 2010; Kobilko *et al.*, 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 forma e localização espacial de objetos (Li *et al.*, 2012).

Seis horas após o treinamento para aprendizado e memória espacial, já é evidente o remodelamento das sinapses da camada molecular do giro denteado do hipocampo dorsal de ratos adultos com aumento de sua densidade no terço médio, e isso parece ser a expressão morfológica neuronal da consolidação desse aprendizado (Scully *et al.*, 2012).

As doenças neurodegenerativas crônicas associadas ou não ao envelhecimento afetam predominantemente a formação hipocampal e memória, sendo seus mecanismos fisiopatológicos revistos a seguir. A doença príon em particular tem sido usada como modelo para investigação dos processos relacionados à neurodegeneração crônica em vários modelos animais, e esse esforço tem sido concentrado no modelo murino, de particular interesse para o presente trabalho.

1.5 Mecanismos Moleculares das Doenças por Príons

As doenças por príons são encefalopatias espongiformes transmissíveis de origem infecciosa, genética ou indeterminada, que atingem seres humanos e várias espécies animais

(Knight and Will, 2004). Sua patogênese está associada à alteração conformacional da proteína príon celular (PrP^c), uma proteína de superfície ligada à membrana plasmática expressada abundantemente no Sistema Nervoso Central, que quando é transformada em uma forma enovelada anormal (*scrapie*, ou PrP^{sc}) (Prusiner, 1991) inicia o processo de neurodegeneração.

A origem infecciosa é atribuída à entrada no SNC de partículas proteicas da forma anômala, que levam à acumulação de PrP^{sc} às custas da conversão da PrP^c endógena. A origem genética deve-se à mutações que alteram a expressão da proteína PrP^c (Gambetti and Parchi, 1999). Há, entretanto, casos esporádicos de doenças príon onde a infecção e as alterações genéticas não puderam ser detectadas e que são atribuídos à conversão espontânea da PrP^c.

Doença príon e doença de Alzheimer possuem muitas semelhanças e uma revisão recente da extensa literatura destaca muitas evidências que vem corroborando a hipótese da DA ser um tipo de doença príon (Nussbaum *et al.*, 2013). As características similares de propagação e toxicidade entre a DA e a doença príon podem ser observadas no diagrama da figura 3.

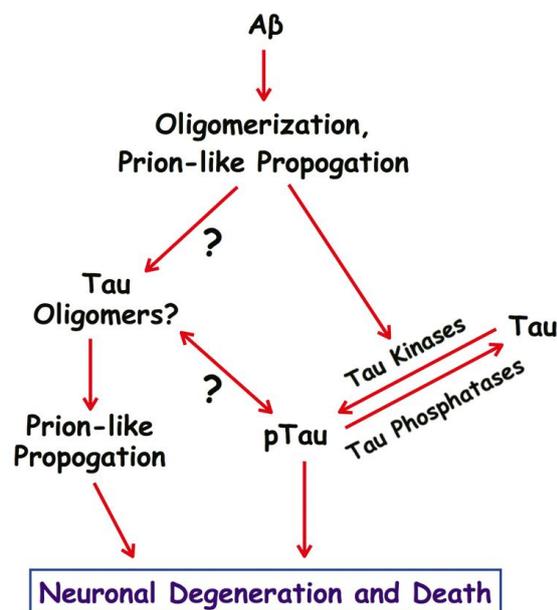


Figura 3. Mecanismos da doença de Alzheimer semelhantes aos da doença príon. A formação de oligômeros de A β e sua propagação são semelhantes aos descritos na doença príon ativando cinases que fosforilam a proteína Tau (pTau) levando a neurodegeneração. É possível também que os oligômeros de A β contribuam para formação de oligômeros de Tau que podem por sua vez ser fosforilados. Os oligômeros de Tau, assim como os de A β , também se propagam por mecanismos semelhantes aos da doença príon e aumentam a toxicidade levando a Neurodegeneração (Nussbaum *et al.*, 2013).

Além da extrema gravidade da doença humana, essas patologias atingem espécies animais de interesse econômico, como aconteceu na Inglaterra nos anos 80-90 com a epidemia da encefalopatia espongiforme bovina, ou “doença da vaca louca”, que atingiu a marca de 180.000 casos em cerca de 35.000 fazendas, levando ao sacrifício adicional de dezenas de milhares de reses suspeitas da doença e causando grandes prejuízos financeiros. A partir dessa epidemia há evidências de que a contaminação humana promoveu o aparecimento de uma nova variante da doença de Creutzfeld-Jakob humana, atribuída à ingestão de carne bovina contaminada com a forma patogênica PrP^{sc} (Cooper and Bird, 2003; Chen *et al.*, 2013).

As encefalopatias transmissíveis são tidas como doenças de ganho de função, presumivelmente causadas por toxicidade da PrP^{sc} acumulada. No entanto, manifestações clínicas são frequentemente encontradas antes, ou mesmo na ausência, de depósitos característicos da forma anômala e, portanto, permanece em aberto a possibilidade de componentes de perda de função relacionados à remoção da PrP^c endógena que foi convertida na forma anômala (Aguzzi and Weissmann, 1997; Samaia *et al.*, 1997; Aguzzi and Weissmann, 1998; Samaia and Brentani, 1998).

O exame crítico dessa hipótese depende da identificação das funções da PrP^c no SNC e é essencial para nortear o desenvolvimento de terapias para as doenças por príons. Por exemplo, o fato da propagação da PrP^{sc} no SNC depender da disponibilidade da PrP^c (Weissmann, 1999), sugeriu que tratamentos para as doenças por príons poderiam ser desenvolvidos com base na eliminação ou neutralização da PrP^c endógena. No entanto, esse conceito só teria validade se essa proteína não desempenhasse papel essencial em funções críticas do SNC.

Investigações funcionais da PrP^c por deleção gênica forneceram resultados controversos. O primeiro camundongo descrito com deleção de PrP^c não apresentou alterações óbvias de embriogênese ou comportamento (Bueler *et al.*, 1992), sugerindo que a PrP^c poderia ser dispensável para o SNC, ou que poderosos mecanismos embriológicos de regulação podem

recompor a homeostasia perdida pela deleção da PrP^c. No entanto, estudos mais recentes de camundongos nocautes para PrP^c mostraram alterações em ritmos circadianos, atividade locomotora, memória e sensibilidade a convulsões (Martins *et al.*, 2002; Coitinho *et al.*, 2003), e há controvérsias sobre alterações eletrofisiológicas indicando limites para mecanismos compensatórios após deleção da PrP^c. Já em outra cepa de camundongos com deleção da PrP^c identificou-se extensa degeneração cerebelar e ataxia progressiva (Sakaguchi *et al.*, 1996), atribuídas a um gene homólogo ao PrP^c, denominado *Doppel*, que parece ter efeito tóxico e apresenta padrões de expressão anormal interpretados como resultado do reposicionamento em relação ao promotor de PrP^c (Moore *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2001).

Outros papéis da PrP^c no SNC são sugeridos por sua atividade anti-oxidante, dependente de um domínio de ligação de cobre compreendendo os aminoácidos 60-91, que afeta tanto a resistência celular a estresse oxidativo quanto a transmissão sináptica e, por conseguinte, poderia estar associada tanto à neurodegeneração quanto à alterações funcionais do SNC nas doenças por príons (Wong, B. S. *et al.*, 2000; Wong, N. K. *et al.*, 2000; Brown, 2001). Já a presença de PrP^c com deleções em outro domínio, que compreende os aminoácidos 106-134, causa degeneração cerebelar e ataxia progressiva em camundongos, demonstrando que outros fatores, além do cobre, relacionados a resíduos contidos na sequência 106-134 estão associados à resistência à neurodegeneração (Shmerling *et al.*, 1998).

Algumas moléculas interagem funcionalmente com PrP^c em um complexo multiproteico de superfície que inclui laminina (Martins *et al.*, 2002). Dentre esses vários ligantes, a proteína STI1 (também conhecida como extendina ou hop, para *hsp organizing protein*) induz no tecido nervoso *in vitro* respostas neuroprotetoras dependentes de PrP^c, e mediadas por aumento da concentração intracelular de cAMP e ativação de proteína cinase A (Chiarini *et al.*, 2002; Zanata *et al.*, 2002). A interação STI1-PrP^c também provoca ativação da via de MAP-quinasas da família Erk (Chiarini *et al.*, 2002). A proteína hop/STI1 é uma co-

chaperona encontrada majoritariamente em compartimentos intracelulares e funciona como adaptadora na formação de heterocomplexos contendo as chaperonas hsp90 e hsp70, bem como outros componentes envolvidos na maturação funcional de receptores de esteroides e proteínas-quinases intracelulares (Pratt and Toft, 2003).

Esses dados sugerem que a PrP^c funciona como um receptor neurotrófico no tecido nervoso, envolvido em regulação de morte celular programada, proliferação e diferenciação celular e que STII é um ligante natural da PrP^c com função análoga a fatores neurotróficos clássicos. Não se sabe ainda de que forma a interação STII-PrP^c produz sinais neuroprotetores, já que a ativação convencional das vias de cAMP-PKA depende de proteínas G de membrana e não há ainda evidência de que a PrP^c seja capaz de levar diretamente à ativação desses intermediários, nem indícios de interação da PrP^c com receptores de membrana acoplados à proteínas G. Por outro lado, a função adaptadora da hop/STII nos compartimentos intracelulares sugere uma hipótese alternativa, de que a ligação STII- PrP^c tenha como efeito a modulação de receptores ou outras moléculas de superfície capazes de ativar convencionalmente as vias de cAMP-PKA e Erk, tais como receptores para neurotransmissores ou neuropeptídeos (Lopes *et al.*, 2005; Beraldo *et al.*, 2010).

Tomados em conjunto os dados revelam que muitas das questões relacionadas à fisiopatologia da neurodegeneração crônica induzida pelas doenças priônicas permanecem por serem investigadas.

1.6 O Modelo Experimental

Para investigação da doença crônica neurodegenerativa utilizamos modelo experimental murino previamente implantado em nosso laboratório (Borner, Roseane *et al.*, 2011), o camundongo suíço albino proveniente de cruzamentos não isogênicos, de 6 meses de idade, infectado com o agente príon ME7. A patologia do agente ME7 é bem caracterizada e esse

modelo tem sido usado para estudar a patogênese da doença e o impacto da inflamação sobre o sistema nervoso em doenças crônicas neurodegenerativas (Betmouni *et al.*, 1996). Do ponto de vista neuropatológico as doenças prion são crônicas e guardam muitas similaridades com a doença de Alzheimer, caracterizada por depósitos amilóides, perda neuronal, gliose e vacuolização da neurópila (Collinge, 2001).

A doença prion é associada à conversão da proteína solúvel PrP^c em uma forma insolúvel e resistente à ação de proteases PrP^{sc} que é depositada no parênquima do sistema nervoso central (Bolton *et al.*, 1982; Prusiner, 1982). O modelo murino de doença prion tem mostrado déficits comportamentais (Betmouni and Perry, 1999; Deacon *et al.*, 2001), eletroneuropatológicos e morfologia anormal de neurônios isolados (Johnston *et al.*, 1997).

O camundongo C57BL/6J de onde se obteve o inóculo para indução da doença prion na variedade albina, já está estabelecido como modelo para estudos da doença prion, apresentando evidência conclusiva de neurodegeneração com perda sináptica e de neurônios, espalhadas ao longo das vias anatômicas, assim como, padrão atípico de resposta inflamatória caracterizada por ativação de astrócitos e microglia (Betmouni *et al.*, 1996).

A ativação de astrócitos associada aos eventos neuropatológicos é usualmente denominada de astrocitose reativa e é caracterizada pelo aumento no volume celular e de número de astrócitos. Essas alterações estão associadas ao rápido aumento na síntese de GFAP. Em conjunto, as alterações fenotípicas da astrocitose podem estar relacionadas com redução das funções normais dos astrócitos assim como com ganho de funções anormais relacionadas ao processo degenerativo que, em alguns casos, pode assumir papel primário em mecanismos fisiopatológicos (Zhu and Dahlström, 2007; Sofroniew and Vinters, 2010).

Na doença prion os astrócitos apresentam significativa alteração morfológica em estágios iniciais da doença e, em alguns casos, são o sítio inicial de deposição e acúmulo de PrP^{sc} (Eklund *et al.*, 1967; Diedrich *et al.*, 1991). Em um estudo com camundongos knockout

para PrP de camundongo (Tg3/Prnp^{0/0}) que expressavam transgenes de PrP de Hamster, em um promotor específico para GFAP de astrócitos, foi demonstrado que astrócitos são suficientes para desenvolver e propagar a doença príon (Raeber *et al.*, 1997).

De fato, em um estudo minucioso sobre as alterações proteômicas induzidas pela variedade ME7 de doença príon em modelo murino, Asuni e colaboradores (2014) demonstraram que a GFAP é a principal proteína alterada (síntese aumentada) durante o curso temporal da doença.

Essa proteína é a principal proteína da rede filamentos intermediários (8-12 nm) do tipo III que constitui o citoesqueleto. Além de realizar funções relacionadas às propriedades estruturais da célula, os filamentos intermediários têm sido associados com transdução de sinais biomecânicos, estando diretamente relacionada à motilidade e migração, proliferação, endocitose e fagocitose, plasticidade sináptica, transporte e síntese de neurotransmissores, crescimento dendrítico, barreira hematoencefálica, mielinização e proteção a insultos no SNC (figura 4). Apesar do grande número de estudos investigando as diferentes funções dos astrócitos, a exata função da GFAP ainda não é completamente conhecido (Middeldorp and Hol, 2011).

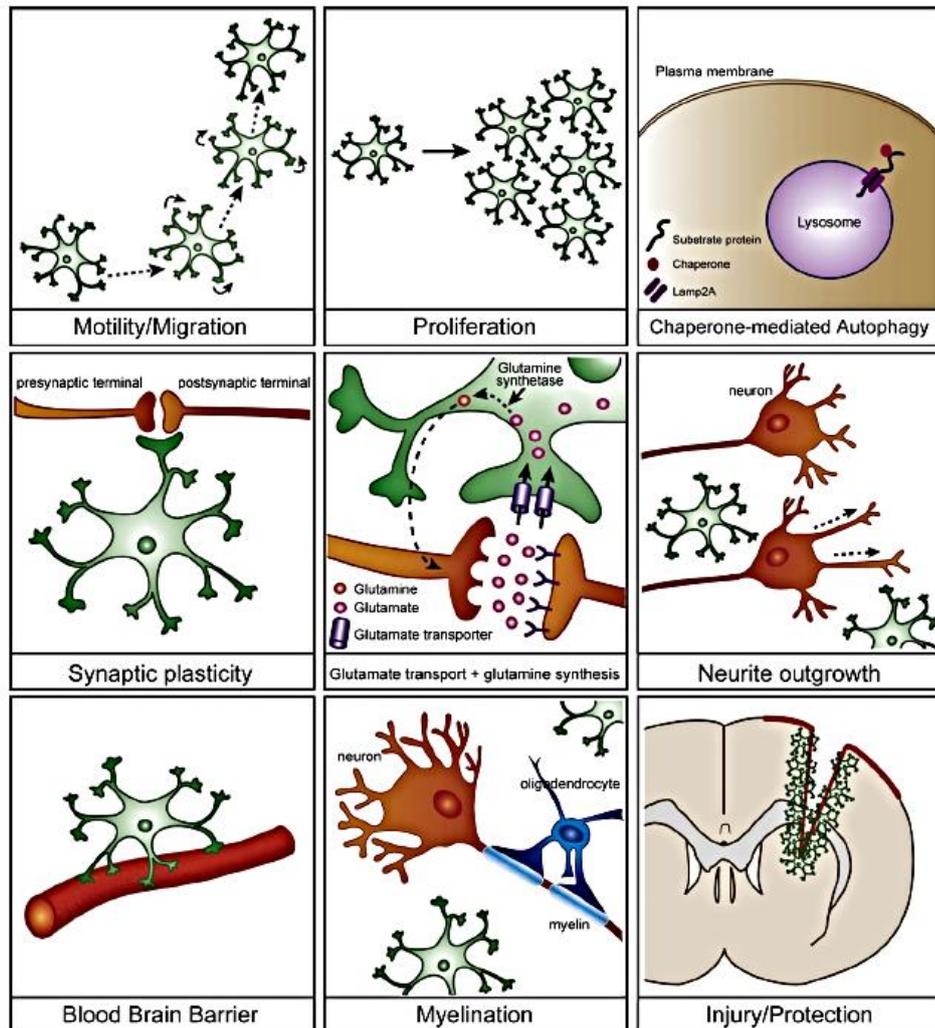


Figura 4. Principais funções astrocíticas relacionadas à GFAP. Estudos realizados em animais transgênicos e estudos que empregam métodos avançados de bioquímica destacam evidências da participação de GFAP nos processos celulares de motilidade e migração, proliferação, autofagia, plasticidade sináptica, transporte e síntese de neurotransmissores, crescimento dendrítico, formação e regulação da barreira hematoencefálica, mielinização e proteção à lesões e neurodegeneração (Middeldorp and Hol, 2011).

A partir da implantação da variedade albina suíça como modelo murino (*Mus musculus*) de doença príon detectamos estreita similaridade neuropatológica e comportamental com a variedade C57Bl6J (Borner, Roseane *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, através de método estereológico sem viés, que a população total de astrócitos imunomarcados para GFAP é significativamente aumentada quinze semanas após a injeção intracerebral de ME7 na camada polimórfica do giro denteado e no septo medial e na décima

oitava semana, quando os animais atingem o estágio clínico final da doença, o número total de astrócitos em CA1 é maior que nos controles (Figura 5).

Por outro lado, o enriquecimento ambiental/exercício físico estimula a neurogênese e a gliogênese (Van Praag *et al.*, 1999), aumenta a rede celular imunomarcada por GFAP (Williamson *et al.*, 2012) e reduz astrogliose reativa em modelo transgênico de doença de Alzheimer (Lazarov *et al.*, 2005; Herring *et al.*, 2009; Valero *et al.*, 2011; Beauquis *et al.*, 2013; Rodríguez, Noristani, *et al.*, 2013; Rodríguez, Terzieva, *et al.*, 2013).

Além disso, estudos utilizando análises bidimensionais da morfologia de astrócitos do hipocampo e do giro denteado propõem que roedores alojados em ambiente enriquecido possuem mais nodos de ramificação, maior comprimento e número de intersecções nos círculos de Sholl (Viola *et al.*, 2009; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014).

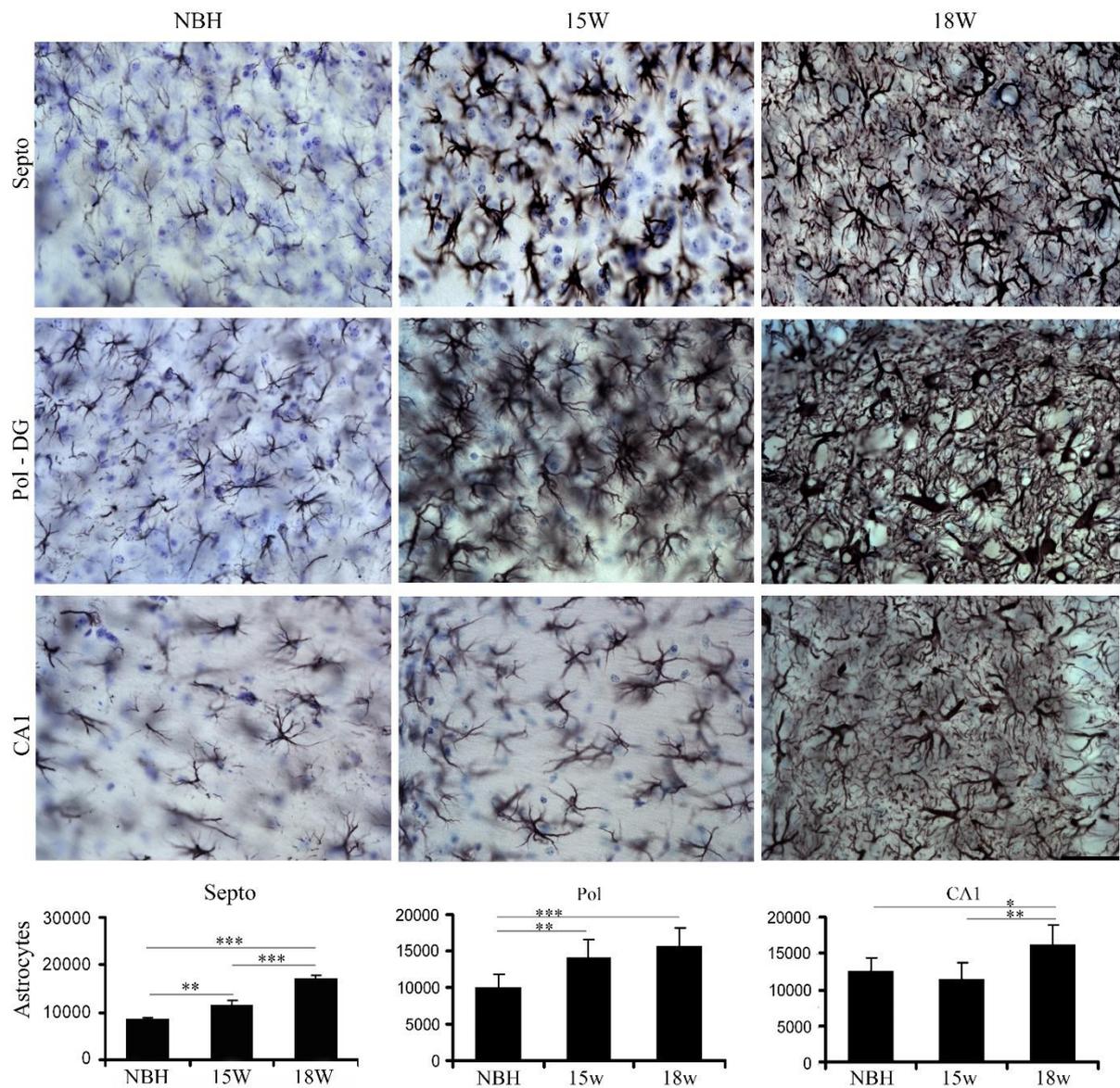


Figura 5. Fotomicrografias e representação gráfica com valores médios para a estimativa da população total de astrócitos no septo lateral, camada polimórfica do giro denteado e de CA1 no grupo controle (NBH) e com doença príon 15 e 18 semanas após a injeção (W) intrahipocampal de ME7. Note que em 15w já é significativa a alteração morfológica dos astrócitos particularmente no septo e na camada polimórfica. Em 18w a astrocitose reativa é pronunciada em todas as regiões estudadas com destaque para a hipertrofia dos corpos celulares na camada polimórfica. A estimativa estereológica demonstra que a camada polimórfica é a que apresenta maior grau de aumento no número de astrócitos em 15w seguida do septo que também apresenta significativo aumento de astrócitos. Adaptado de (Borner, R. *et al.*, 2011).

Em estudo anterior, nosso grupo também demonstrou por métodos estereológicos que o enriquecimento ambiental aumenta o número de astrócitos no giro denteado de camundongos jovens (Figura 6) e que essa alteração pode estar associada com melhora no desempenho cognitivo em testes de memória e aprendizado espacial (Diniz *et al.*, 2010).

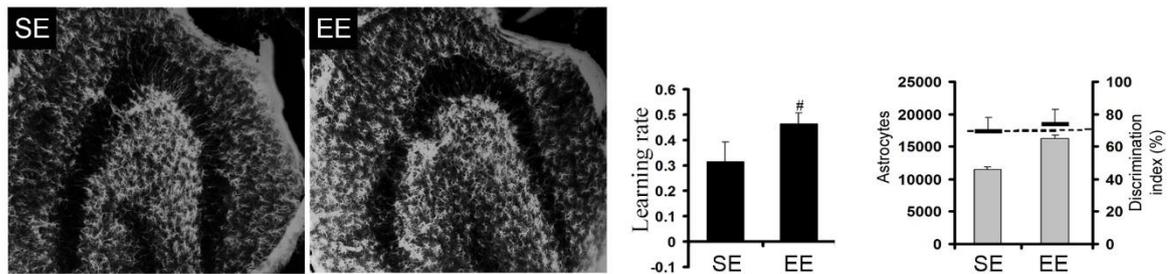


Figura 6. A figura apresenta fotomicrografias do giro denteado do camundongo médio dos grupos de ambiente padrão (SE) e de enriquecido (EE). Note que o enriquecimento ambiental parece aumentar a imunomarcagem para GFAP. Tal impressão pode ser confirmada pela estimativa estereológica na camada molecular do giro denteado (colunas em cor cinza no gráfico à direita) onde o grupo EE apresenta mais astrócitos em relação ao SE. O aumento no número total de astrócitos na camada molecular foi associado ao melhor índice de discriminação no teste de reconhecimento de objetos (representado pelas barras pretas horizontais referentes a ordenada direita do gráfico) e na taxa de aprendizado no labirinto aquático de Morris (gráfico à esquerda em colunas pretas). Adaptado de Diniz e colaboradores (2010).

Astrócitos podem alterar sua morfologia na presença de algumas neurotrofinas específicas. Ohira e colaboradores (2007) (Ohira *et al.*, 2007), demonstraram que na presença de BDNF, mas não de NGF, astrócitos corticais aumentam o comprimento dos seus ramos GFAP+ realizando mais contatos com sítios sinápticos e esse mecanismo parece ser dependente da presença de receptores TrkB T1. De fato, o enriquecimento ambiental parece aumentar os níveis de mRNA do BDNF em associação ao aumento de GFAP no giro denteado (Williamson *et al.*, 2012).

Nossa hipótese é que o ambiente enriquecido pode contribuir para desacelerar o curso temporal da neurodegeneração crônica associada à doença príon em modelo murino ao reduzir as alterações fenotípicas da astrocitose reativa assim como proteger funções cognitivas hipocampo dependentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar em modelo murino de doença prion as alterações comportamentais e as alterações astrogliais relacionadas, em animais alojados em diferentes condições ambientais.

2.2 Objetivos Específicos:

- 2.2.1 Comparar possíveis alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da doença prion em camundongos alojados em ambiente enriquecido com aqueles alojados no ambiente empobrecido das gaiolas padrão.

- 2.2.2 Quantificar por método estereológico, morfometria tridimensional e estatística multivariada as alterações astrogliais em CA3 e no giro denteado associadas à doença prion em camundongos alojados em ambiente enriquecido ou em ambiente empobrecido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos para realização deste trabalho foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Pará (Anexo 1). Os camundongos utilizados foram fornecidos pelo Instituto Evandro Chagas e manipulados de acordo com os princípios éticos para o uso de animais de laboratório do NIH (National Institute of Health).

3.1 Grupos Experimentais

Para compor os grupos experimentais foram utilizados 20 camundongos suíços albinos fêmeas de seis meses de idade. Em função do alto nível de agressividade entre machos adultos não foi possível a utilização desse gênero no presente desenho experimental. Os animais foram alojados em ambiente enriquecido (EE) ou em ambiente padrão (SE) durante 5 semanas. Em seguida foram realizadas as cirurgias para injeção intracerebral de homogenados ME7 ou NBH. Após a cirurgia os animais retornaram para suas respectivas condições de alojamento e realizaram semanalmente o teste de burrowing. Na décima oitava semana pós inoculação todos os camundongos foram submetidos aos testes de reconhecimento de objetos e em seguida perfundidos (figura 7).

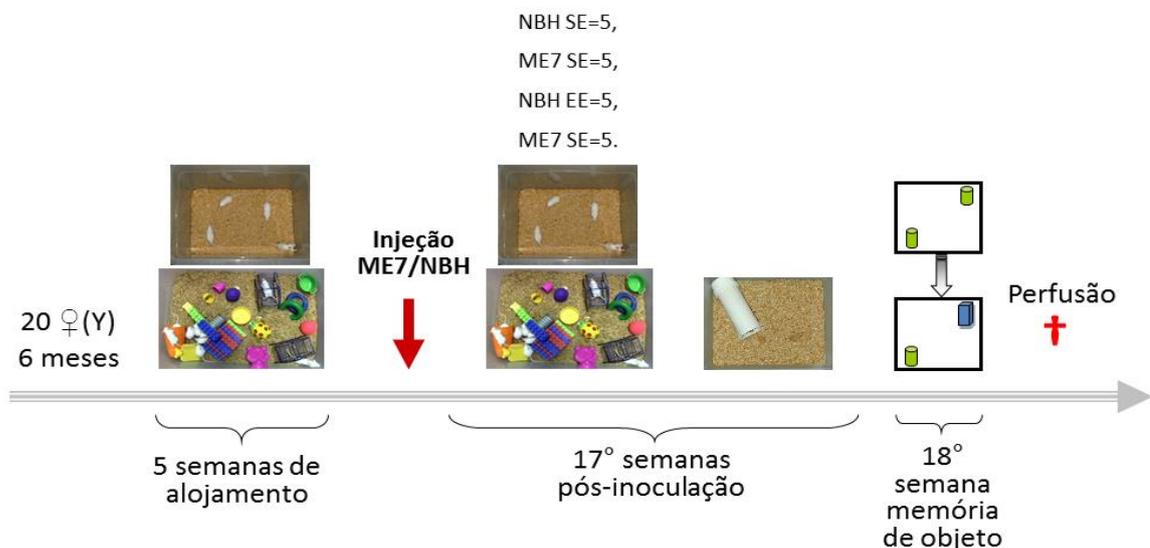


Figura 7. Sequência temporal do desenho experimental.

3.2 Condições ambientais de alojamento

Os animais do grupo EE (n=10) foram alojados em gaiola de plástico (32x39x16,5cm) equipada com rodas para corrida voluntária, túneis e objetos variados de plástico, metal ou papelão, que eram trocados e/ou colocados em diferentes posições uma vez por semana para estimular a atividade exploratória. Os animais do ambiente padrão constituíram o grupo controle (n=10) e foram mantidos em gaiola similar com o mínimo estímulo ambiental possível (Figura 8). Ambas as gaiolas eram forradas com palha de arroz autoclavada, que era trocada no mínimo uma vez por semana. Todos os animais tiveram acesso livre à água e comida e foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas.

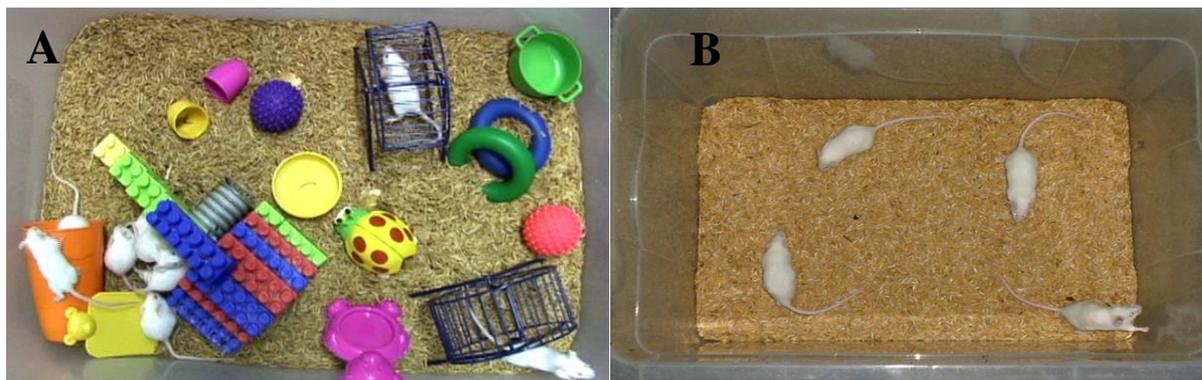


Figura 8. Foto do ambiente enriquecido (EE) equipado com rodinhas de correr e objetos de cores e formas diferentes (A), e do ambiente padrão (SE) com o mínimo de estímulos somatomotores e visuoespaciais (B).

3.3 Procedimentos para Inoculação do Agente ME7

Após o período de alojamento nos ambientes enriquecido ou padrão os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,1ml/5g de peso corporal) e submetidos à cirurgia em aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos) para inoculação intracerebral bilateral de 1 μ l de homogenado cerebral normal ou infectado com o agente ME7. Este último obtido de camundongo com sinais clínicos de doença príon terminal. As injeções foram feitas nas coordenadas, +1mm de bregma, \pm 1,5mm da linha média, e -3,0mm da superfície do crânio correspondentes ao estriado dorsal (Paxinos and Franklin, 2001). Após tricotomia e exposição

do crânio através de uma incisão no escalpo, foram feitas duas aberturas com o auxílio de uma broca, para permitir a infusão estriatal bilateral de 1 μ l do homogenado (10% p/v em salina tamponada com fosfato) de cérebro de camundongo normal (NBH, n=10) ou de camundongo com sinais clínicos de doença prion terminal (ME7, n=10). Após a infusão da suspensão, a agulha (Hamilton 10 μ l) era mantida no local por 3 minutos para evitar o refluxo da solução, após os quais era retirada lentamente. O couro cabeludo era então suturado e o camundongo posto em uma gaiola para recuperação. Após o procedimento os animais eram devolvidos as suas gaiolas e condições de alojamento originais formando os seguintes grupos experimentais: NBH SE=5, NBH EE=5, ME7 SE=5, ME7 EE=5. Após dezoito semanas todos os animais foram perfundidos para posterior análise do tecido encefálico.

3.4 Teste de Remoção e Estocagem de Comida (Burrowing)

O teste de remoção de comida foi iniciado na terceira semana após a inoculação intracerebral e foi realizado sistematicamente, com periodicidade semanal, até a décima oitava semana pós inoculação. Esse teste permite avaliar um comportamento natural em alguns roedores de remover e estocar comida a partir de uma toca, sem necessitar de privação alimentar, fornecendo dados quantitativos sobre a diminuição da atividade de burrowing, disfunção crônica provocada por doença príon já bem caracterizada em trabalhos anteriores adotando infecção por lipopolissacarídeo (Bayen *et al.*, 2000) ou lesões em estruturas cerebrais como o hipocampo. É um teste de fácil execução cujo aparato é barato e facilmente construído (Deacon, 2006; 2009). A razão para adotar um teste relacionado à função hipocampal em animais com injeção no estriado decorre do fato de que nossos resultados preliminares, assim como estudos anteriores, revelam extenso comprometimento hipocampal produzido pela doença príon após inoculação em diferentes alvos anatômicos (Jirkof, 2014).

Para a realização do teste, os animais eram alojados individualmente, durante quatro horas, em gaiolas de plástico (32cm x 39cm x 16,5cm) contendo um tubo PVC (20cm x 7,2cm), que foi preenchido com 250g de ração normal da dieta dos camundongos. O tubo era disposto de forma inclinada e a sua abertura estava à 3cm do solo (Figura 9). Após o teste, cada animal retornava à sua gaiola coletiva e a atividade de burrowing era avaliada pela diferença entre a quantidade de ração que havia no tubo antes e após o teste (Deacon, 2009).



Figura 9. Aparato utilizado para realização do teste de burrowing.

3.5 Memória de Objeto

Os testes de reconhecimento de objeto foram realizados em uma caixa aberta (30x30x40 cm), com paredes laterais revestidas de fórmica branca e assoalho escuro, impermeabilizado com papel auto-adesivo, dividido em 9 quadrados (3 superiores, 3 médios e 3 inferiores) onde se promoveu habituação seguida dos testes propriamente ditos. Após cada experimento, o instrumento era limpo completamente com uma solução de etanol a 75% para remover pistas olfatórias deixadas durante o procedimento.

Fase de habituação ao campo aberto: nesta fase os camundongos foram colocados individualmente na arena da caixa de teste, livre de objetos, por 5 minutos, por três dias consecutivos. Nos dois dias seguintes, os animais realizaram sessões diárias de 5 minutos de

duração, sendo expostos a duas cópias de um objeto, posicionadas nos cantos da arena com objetivo de adaptar os camundongos a presença de objetos na caixa. Os objetos utilizados nesta fase não foram reutilizados na fase de teste descrita a seguir.

A sequência de testes ocorreu em 2 dias consecutivos:

1º Dia – Reconhecimento de Objeto (identidade)

O teste de reconhecimento de objeto foi constituído de duas fases. Primeira fase – Exposição: os animais foram colocados no centro da caixa contendo um par de objetos idênticos dispostos em localizações fixas para todos os animais. Segunda fase – Teste: cinquenta minutos após a exposição aos objetos (familiares) cada animal foi recolocado na caixa contendo um dos objetos familiares e um objeto novo disposto no mesmo lugar onde estava a cópia do objeto familiar (referente à primeira fase) (Figura 10). Em cada fase os camundongos tiveram cinco minutos para explorar livremente a caixa e os objetos contidos nela.

2º Dia – Reconhecimento de localização espacial (lugar)

O teste de reconhecimento de lugar foi também constituído de duas fases. Para esse teste foi utilizado apenas um par de objetos idênticos dispostos em uma determinada posição na primeira fase (exposição). Os animais foram colocados no centro da caixa permanecendo livres por cinco minutos para exploração da caixa e dos objetos. Após cinquenta minutos de intervalo os sujeitos foram recolocados na caixa com um dos objetos deslocado para uma nova posição na caixa (teste) (Figura 10) permanecendo livres por mais cinco minutos para exploração da caixa e objetos.

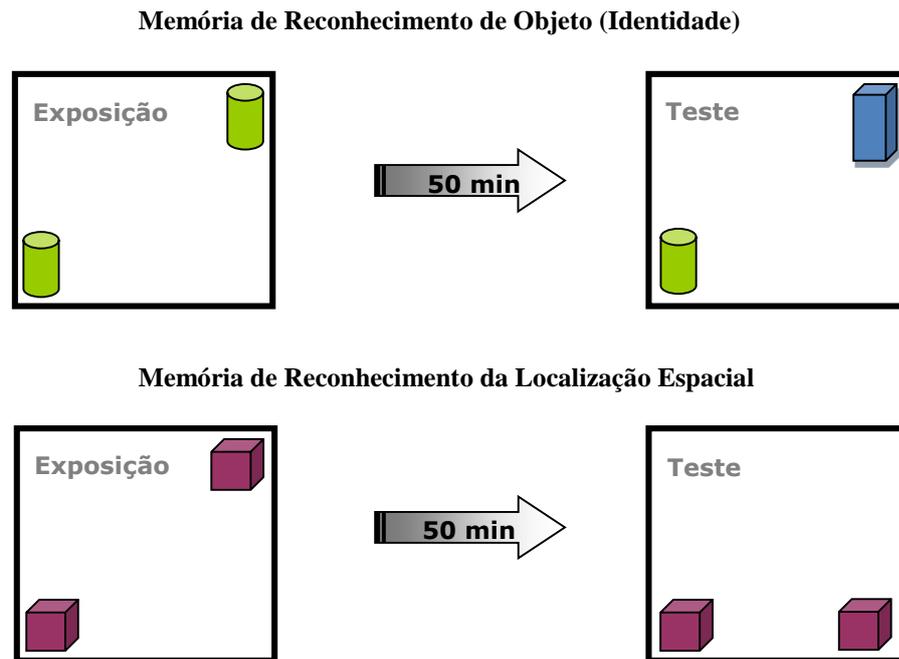


Figura 10. Representação esquemática dos testes de reconhecimento da identidade do objeto (acima) e da localização espacial (abaixo)

Como os testes utilizam o comportamento exploratório natural dos camundongos e o interesse pela novidade como elemento motivador, o teste de memória para reconhecimento de objeto pode ser classificado como etológico por representar uma atividade voluntária de reconhecimento e exploração independente de recompensas ou punições.

As imagens de todos os testes eram capturadas por uma câmera de vídeo instalada no teto, acima dos aparatos de teste e conectada a um computador, com o objetivo de armazenar os vídeos para posterior análise. Os testes foram analisados com o auxílio do programa Any Maze (Stoelting®).

O método de análise do comportamento exploratório nos testes de reconhecimento de identidade e localização espacial dos objetos pelo sistema semi-automático de rastreamento (Any Maze) permitiram o monitoramento de zonas referentes às localizações de cada objeto. Cada zona consiste de uma área de três centímetros de raio em torno de cada objeto. O sistema de rastreamento conta com um algoritmo que distingue as regiões anatômicas no animal referentes a cabeça, corpo e cauda de acordo com a preferência do experimentador. Com essas

ferramentas foi possível quantificar o tempo em que a cabeça do animal permanecia dentro da zona de interesse em torno de cada objeto e tomar essa medida como variável representativa da atividade exploratória do objeto.

Muitos fatores como idade, ansiedade e ambiente podem influenciar na atividade exploratória de camundongos tornando necessário que se utilize uma escala relativa para avaliação desse componente comportamental. A soma do tempo total de permanência da cabeça do camundongo nas zonas correspondentes aos dois objetos, representa 100% da atividade exploratória, e o tempo em cada zona é calculado e expresso como uma porcentagem do tempo total.

3.6 Perfusão e Procedimento Histológico

Na décima oitava semana após a inoculação intracerebral, quando os animais infectados demonstraram sinais comportamentais característicos do estágio avançado da doença, todos foram pesados e anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol por via intraperitoneal (0,08ml/5g). Em seguida, os animais foram perfundidos transcardiacamente com solução salina 0,9% heparinizada (5000UI/l) seguida de paraformaldeído a 4% feito em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2-7,4). Em seguida, os encéfalos foram removidos e seccionados em micrótomo de lâmina vibratória “vibrátomo” (Micron) no plano horizontal a 70µm de espessura, ordenadas em série anatômica (1:6) e submetidas as reações histoquímicas e imunohistoquímicas.

3.6.1 Imunohistoquímica para GFAP

A morfologia e a quantidade de astrócitos foi avaliada usando o anticorpo primário para proteína ácida fibrilar glial (GFAP #MAB360 Millipore©). As secções foram reagidas seguindo a descrição abaixo e a sequência indicada na Tabela 1.

Secções dos cérebros dos animais doentes e dos controles foram selecionadas de forma aleatória e sistemática, tomando-se uma a cada 6 fatias de 70µm. As secções foram lavadas em

tampão fosfato 0,1M e pré-tratadas por 60 minutos em solução de ácido bórico 0,2M pH 9,0 a 70°C. Após lavagem com salina tamponada em fosfato acrescido de Triton 5% (PBST 5%), seguiu-se lavagem de 5 minutos em solução de metanol com adição de peróxido de hidrogênio 0,3%. Após lavagem em PBS em pH 7,2-7,4, seguiu-se o protocolo “Mouse-On-Mouse Blocking Kit” (Vector Laboratories), que, de modo resumido, consiste dos seguintes passos: as secções são incubadas na solução “MOM IgG blocking” por 60 minutos, lavadas em PBS e incubadas por 5 minutos no diluente do kit MOM. A incubação no anticorpo primário para GFAP, em diluição 1:400, em PBS 0,1M, pH 7,2-7,4, foi feita por 72 horas, mantendo-se os cortes flutuando livremente na solução, seguida de lavagem com PBS e incubação no anticorpo secundário biotilado (1:200) por 12 horas (reagente MOM Biotinylated Anti-Mouse IgG).

Tabela 1. Passos da reação de imunohistoquímica para detecção da proteína fibrilar ácida GFAP

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (horas)
Ácido Bórico 0,2M (70 °C pH 9)	1		1
Salina Tamponada de Fosfato + Triton (PBS-T) a 5%	3	5	
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	10	
PBS	3	2	
MOM IgG Block (12 gotas de solução de trabalho + 15ml Mouse Ig Blocking PBS Reagent)			1
PBS	3	2	
Solução de trabalho (1200µl de proteína concentrada + 15ml de PBS)	1	5	
Anticorpo primário (4°C na diluição recomendada para GFAP (1:800) no concentrado de proteína (18,75 µl GFAP + 15ml concentrado de proteína)	1		72
PBS	3	5	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG (60µl de Biotinylated IgG em 15 ml da solução de trabalho)	1		12
PBS	3	2	
ABC (Complexo Biotina Avidina)	1		1
PBS	3	2	
GND (0,5mg/ml de DAB + 1,2mg/ml Níquel)	1	20	
PB 0,1M	3	5	

Por fim as secções foram lavadas com PBS e incubadas no ABC (Avidin-Biotin Complex, Vector Laboratories) por 30 minutos. A revelação da peroxidase presente nos sítios de ligação antígeno anticorpo foi feita empregando protocolo para intensificação da reação utilizando níquel/glicose oxidase/diamino benzidina (Shu *et al.*, 1988). A precipitação do cromógeno intensificado pelo níquel se dá após reação enzimática empregando glicose oxidase (enzima para quebra da glicose), β ou α-D-Glicose (substrato) e Cloreto de Amônio (co-fator). Para o preparo da solução de Glicose-Oxidase/Diaminobenzidina/Níquel os passos a seguir foram obedecidos: 1) Solução A: 50mg/ml de sulfato de níquel em tampão acetato 0,2M, pH 6,0. 2) Solução B: 0,5mg/ml de DAB em água destilada. 3) Adição de A em B e acréscimo de 4mg/ml de α-ou β-d-Glicose e 0,8mg/ml de cloreto de amônia à mistura (solução A+B). Após 3 minutos acrescentou-se glicose-oxidase (aproximadamente 1mg/50 ml da mistura) em

intervalos de 10 minutos. Ao completar 30 minutos a reação foi interrompida com 3 lavagens em tampão fosfato 0,1M em pH 7,2-7,4. As secções reagidas para GFAP foram montadas em lâminas gelatinizadas, deixadas secar à temperatura ambiente e posteriormente desidratadas em álcool (70, 80, 90 e 100%), para então serem diafanizados em xileno e cobertos com Entellan (Merck) e lamínula para posterior análise qualitativa e quantitativa estereológica.

3.6.2 *Contracoloração de Nissl*

As secções processadas por imunohistoquímica e histoquímica foram montadas para avaliação microscópica e posteriormente contracoradas para Nissl. A coloração de Nissl utiliza o cresil violeta tingindo núcleos e nucléolos com a coloração violeta. Neurônios e glia são corados indistintamente pela técnica de Nissl. Para preparar a solução de coloração é preciso aquecer o cresil violeta em banho maria a 40°C, agitando-a por 5 minutos, filtrar a solução final em papel filtro e acrescentar o ácido acético até que o pH da solução esteja entre 3 e 3,5. As fatias devem ser mergulhadas nas soluções em sequência indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Passos da coloração de NISSL.

Soluções	Tempo (minutos)
Álcool 100%	05
Álcool 100% + clorofórmio (1/1)	10
Álcool 95%	03
Álcool 75%	03
Água destilada para lavar	0,15
Cresil violeta	01-04
Água destilada para lavar	0,15
Álcool 80 %	03
Álcool 90%	10
Álcool 100% + clorofórmio (1/1)	03
Álcool 95% + ácido acético (15 gtas/100ml)	03
Álcool 95%	06
Álcool 100% + Álcool butírico (1/1)	03
Xileno I	05
Xileno II	05

3.7 Estereologia

Secções histológicas e microscopia óptica são usadas de rotina para distinguir um estado normal de um estado anormal de determinada estrutura cerebral. No entanto, a análise qualitativa utiliza descrições com termos como “grande”, “pequeno”, “muito”, “pouco”, “ausente” ou “presente”, sendo útil para estabelecer diferenças entre um estado patológico e um estado normal. Porém, esta análise não é suficiente para estabelecer mudanças estatísticas, principalmente quando as diferenças são discretas. Dessa forma, a estereologia é um termo designado para descrever métodos que fazem uma interpretação tridimensional a partir de observações de secções bidimensionais para analisar características teciduais como volume de

área, número, conectividade, distribuição espacial e comprimento de estruturas biológicas (Schmitz and Hof, 2005).

Os métodos estereológicos recentes têm muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais, uma vez que os esquemas de amostragem são definidos *a priori*, de tal forma que não são necessárias informações sobre tamanho, forma, orientação e distribuição dos objetos a serem contados. Essa estereologia, baseada em *design*, elimina a necessidade de informação sobre a geometria dos objetos de interesse e fornece dados mais satisfatórios por eliminar potenciais fontes de erros sistemáticos (West, 2002).

A análise quantitativa do número de objetos de interesses nas regiões de interesse de camundongos infectados ou controles que viveram sob diferentes condições ambientais foi realizada através do método do fracionador óptico. O fracionador óptico é a combinação do *dissector óptico* com o *fracionador de amostras*. Nessa técnica as áreas de interesse são seccionadas e os objetos de interesse contidos em dissector óptico dentro de uma amostra sistemática e aleatória de uma fração conhecida da região são contados. As principais vantagens do método estão relacionadas ao fato deste não ser afetado pela retração do tecido e não requerer definições rigorosas de fronteiras estruturais que podem ser feitas em objetivas de baixo aumento (West *et al.*, 1991).

As regiões de interesse, estrato radiato de CA3 e camada polimórfica do giro denteado da formação hipocampal dorsal, foram delimitadas utilizando a objetiva 4x de um microscópio óptico (Nikon eclipse 80i, Japan) equipado com platina motorizada e controladora para os eixos X, Y e Z (MAC6000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). Este sistema é acoplado a um computador contendo o programa Stereoinvestigator (MBF bioscience, Williston, VT, USA), que registra as coordenadas tridimensionais e armazena os dados estereológicos. Para detectar os astrócitos foi utilizada a objetiva de 100x.

Toda análise estereológica inicia com a delimitação da região de interesse seguida da criação de uma matriz de contagem previamente determinada por ensaios piloto e sobreposta a área estudada. Caixas de contagem são inseridos de forma igualmente espaçada nas interseções desta matriz (Figura 11).

Cada caixa de contagem possui duas linhas de inclusão (verdes), duas linhas de exclusão (vermelhas) e uma determinada altura h (Figura 11). A espessura da secção é cuidadosamente medida em cada bloco de contagem através do movimento do microfoco do microscópio em direção ao topo e à base da secção. Assim, todos os objetos que estiverem inseridos dentro da caixa de contagem e não estiverem em contato com as linhas de exclusão são identificados (contados) pelo usuário.

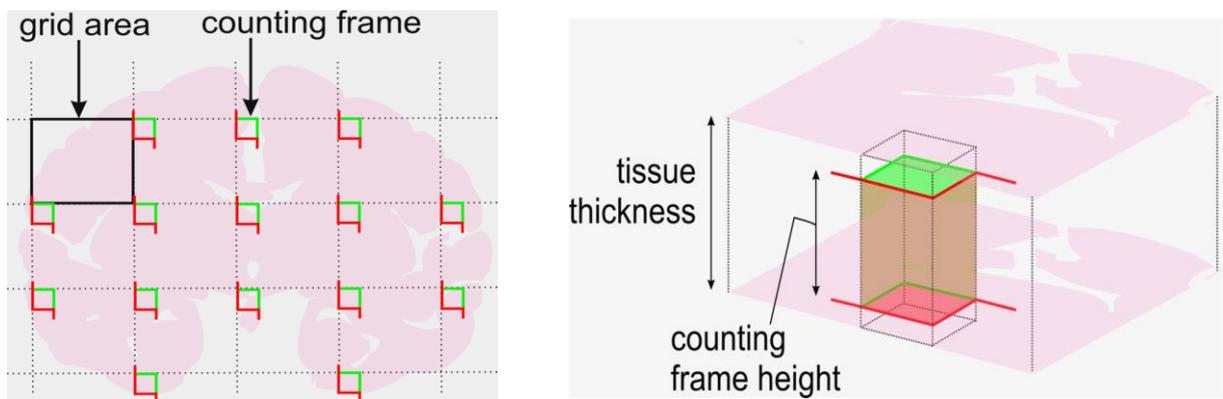


Figura 11. Representação esquemática da distribuição das caixas de contagem com as linhas de inclusão (verdes) e linhas de exclusão (vermelhas) nas interseções da matriz de contagem. À direita representação tridimensional da caixa de contagem mostrando a altura da caixa em relação a espessura do tecido.

Fonte: www.uhnresearch.ca/wcif.

A determinação do número de células pelo fracionador óptico é baseada na distribuição aleatória e sistemática de secções seriadas, todas com a mesma probabilidade de contribuir para a amostra. Dessa forma, a estimativa total é obtida pela seguinte fórmula:

$$N = \Sigma Q * 1/ssf * 1/asf * 1/tsf$$

Onde:

N – número total de células

ΣQ – número de células contadas

ssf – “section sampling fraction” = secções contadas/total de secções

asf – “area sampling fraction” = área bloco/área matriz (x,y)

tsf – “tissue sampling fraction” = altura bloco/espessura da secção

Os tamanhos dos blocos e das matrizes de contagem variam de acordo com o marcador analisado, a partir de experimento piloto prévio, de forma a se obter um coeficiente de erro (CE) aceitável. O cálculo do coeficiente de erro é baseado em estudos prévios com validação do CE de Scheaffer. Além disso, o coeficiente de variação biológica é calculado para garantir a precisão da metodologia adotada (Slomianka, L. and West, M. J., 2005). Os diferentes parâmetros do protocolo de contagem podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3. Dimensões dos parâmetros de contagem.

	Altura do disector (Z) (μm)	Zona de Guarda (μm)	Dimensões da caixa de contagem (X - Y) (μm)	Dimensões do grid amostral (X - Y) (μm)
Estrato Radiato de CA3	12	1	80 – 60	130 - 100
Camada Polimórfica do Giro Denteado	12	1	80 – 60	100 - 80

O volume do corpo celular dos astrócitos foi obtido durante a contagem pelo fracionador óptico. A sonda satélite “Nucleator” quando executado em paralelo com o fracionador óptico permite que cada célula tenha a mesma probabilidade de ser selecionada independente de sua forma, orientação ou tamanho (Gundersen *et al.*, 1988). A análise consiste na superposição de seis linhas radiais (a quantidade de linhas pode ser configurada de acordo com interesse) que cruzam o corpo celular no centro do ponto marcado pela contagem no fracionador óptico. O usuário identifica o ponto em que cada linha radial intersecta a borda do corpo celular e o

programa fornece a planilha com os resultados de volume, área e respectivos coeficientes de erro (Figura 12).

Volume Estimado:

$$v_N = \frac{4\pi}{3} l_n^3$$

Coefficiente de erro Estimado:

$$est CV(R) = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (R_i - \bar{R})^2}}{\bar{R}}$$

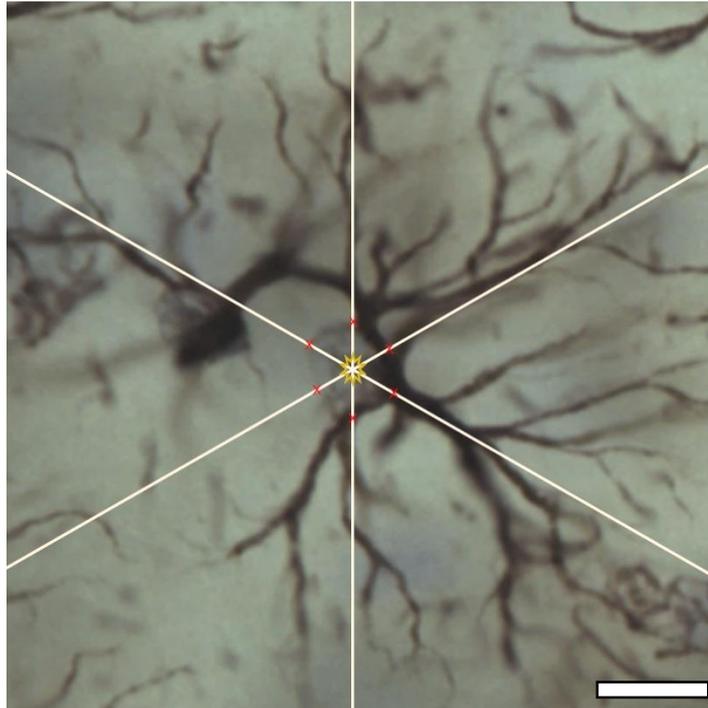


Figura 12. Fotomicrografia de astrócito com as linhas radiais cruzando o centro do marcador de contagem do fracionador óptico. Note os pontos de intersecção (x vermelho) entre as linhas radiais e as bordas do corpo celular. Escala = 10 μ m.

3.8 Reconstrução tridimensional de astrócitos

Para a reconstrução tridimensional dos astrócitos também utilizamos o microscópio óptico (Eclipse 80i, NIKON) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC6000 System, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para registro digitalizado da informação relativa às coordenadas espaciais (X, Y, Z) de cada ponto da reconstrução. 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, a objetiva de 4,0x era substituída por outra PLANFLUOR, 100X (NA 1.3; DF = 0.2 μm ; Nikon, Japan) utilizada para as reconstruções tridimensionais realizadas. Foram reconstruídos 171 astrócitos no total, sendo 12 a 14 por camundongo de cada grupo experimental todas da camada polimórfica do giro denteado.

Adotamos a análise aleatória e sistemática a partir das mesmas secções analisadas pelo fracionador óptico. Para minimizar uma possível tendência viciada na amostra, foi utilizado uma matriz de amostragem sistemática e aleatória com caixas de 70/70 μm separadas uma das outras por intervalo de 200 μm (figura 13). Somente astrócitos localizados dentro dos limites da caixa foram selecionados para análise. Em raras exceções, quando dentro da caixa não haviam células que atendiam ao padrão de imunomarcacão e integridade dos ramos, foram escolhidos os astrócitos localizados mais próximos a borda da caixa. 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 75% de retração tal como previamente sugerido (Carlo and Stevens, 2011).

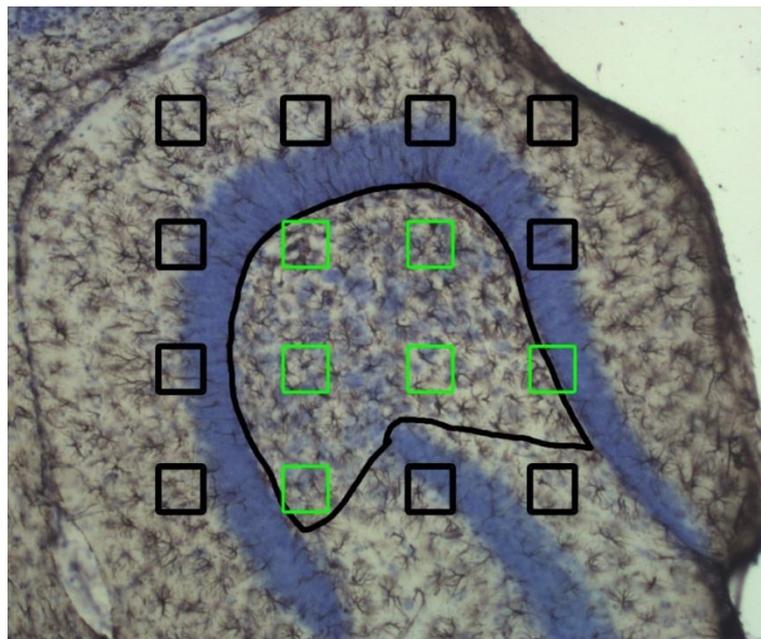


Figura 13. Fotomicrografia do giro denteado e grid de amostragem sistemática e aleatória para escolha dos astrócitos reconstruídos. Em verde estão representadas as caixas ativas para seleção de astrócitos da camada polimórfica (região contornada pela linha preta).

Medimos e comparamos 15 parâmetros morfológicos dos astrócitos: 1. Comprimento dos segmentos (μm); 2. Número total Finalizações; 3. Área de superfície dos segmentos (μm^2); 4. Volume dos segmentos (μm^3); 5. Segmentos/mm; 6. Área de superfície por segmento (μm^2); 7. Dimensão fractal (k-dim); 8. Número total de nodos de ramificação; 9. Número total de segmentos; 10. complexidade; 11. Número de árvores; 12. Área do soma (μm^2); 13. Perímetro do soma; 14 Convex hull; 15. Círculos de sholl. Assim, cada astrócito reconstruído foi objeto de múltiplas medidas. Esses parâmetros morfológicos estão conceituados na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros morfométricos analisados

Perímetro do soma	Medida do comprimento do contorno do soma
Área do soma	Área definida pelo contorno do soma
Comprimento dos ramos	Distância entre pontos de ramificação ou entre um ponto de ramificação e uma terminação.
Segmentos	Qualquer parte da estrutura ramificada astrogial com terminações que são nós ou sem nós intermediários
Número de pontos de ramificações	Soma total de todos os pontos de ramificação originando dois ou mais segmentos
Quantidade de segmentos	Número total de ramos (que não sejam protrusões)
Área de superfície dos segmentos	Superfície calculada através de modelagem de cada peça de cada segmento como um tronco (cone truncado)
Volume dos segmentos	Calculado através de modelagem de cada peça de cada segmento como um tronco (cone truncado) $V = 1/3 * \text{Pi} * L * ((R1 * R1) + (R2 * R2) + (R1 * R2))$, onde: L = comprimento do segmento; R1= raio no início do segmento R2 = raio no fim do segmento
Segmentos/mm	Número de segmentos / comprimento total dos segmentos expressa em milímetros
Finalizações	Termo dos ramos mais distais de cada arvore
K-dim (dimensao fractal)	O "k-dim" da análise fractal, descreve como a estrutura de interesse ocupa o espaço. Diferenças estatísticas significativas no K-dim sugerem diferenças morfológicas
Convex Hull	Estima o campo de cobertura tridimensional de um sólido construído a partir da modelagem de uma superfície conectando as terminações mais distais da célula reconstruída.
Sholl Analysis	Obtém a quantidade e comprimento de objetos intersectado dentro de cada círculo excêntrico.

3.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos pelo programa StereoInvestigator e Any-Maze foram analisados estatisticamente através do programa BioEstat 5.3, GraphPad Prism 5 e Statistica 7.0, aplicando-se testes paramétricos e análises multivariadas para estabelecer diferenças ou igualdades entre os grupos, aceitando-se como significantes aquelas em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os resultados são apresentados em valores de média aritmética e respectivos erros padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Alterações comportamentais

A doença prion produziu importantes alterações comportamentais que são características da doença e usualmente denominadas de comportamento doentio (sickness behaviour). Por outro lado, o enriquecimento ambiental pareceu ser um candidato potencial para redução dos impactos comportamentais relacionados à doença prion.

4.1.1 Remoção e estocagem de comida (*Borrowing*)

A comparação entre a atividade espontânea de remoção e estocagem de alimento (burrowing), dentro de cada semana pós-inoculação (WPI), entre os grupos experimentais e controles, revelou que decorridas treze semanas após a inoculação do agente ME7 os animais alojados em gaiolas padrão reduziram sua atividade de burrowing (ME7: $t=4,17$; $p<0,001$) enquanto que aqueles alojados em ambiente enriquecido somente apresentaram redução significativa na décima quinta semana pós inoculação (ME7 EE: $t=6,08$; $p<0,001$). A análise de variância de dois critérios demonstrou que a doença ($F=104,8$; $p<0,0001$) e o tempo após a inoculação ($F=8,82$; $p<0,0001$) interagem ($F=4,71$; $p<0,0001$) acentuando a redução das médias semanais dos animais dos grupos ME7 SE e ME7 EE em comparação a atividade de burrowing dos controles respectivos (NBH SE e NBH EE) (Figura 14).

Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que animais com doença prion iniciam progressiva redução na atividade de burrowing na 13^o semana pós-inoculação e que o enriquecimento ambiental posterga por duas semanas o aparecimento desse sinal do comportamento doentio.

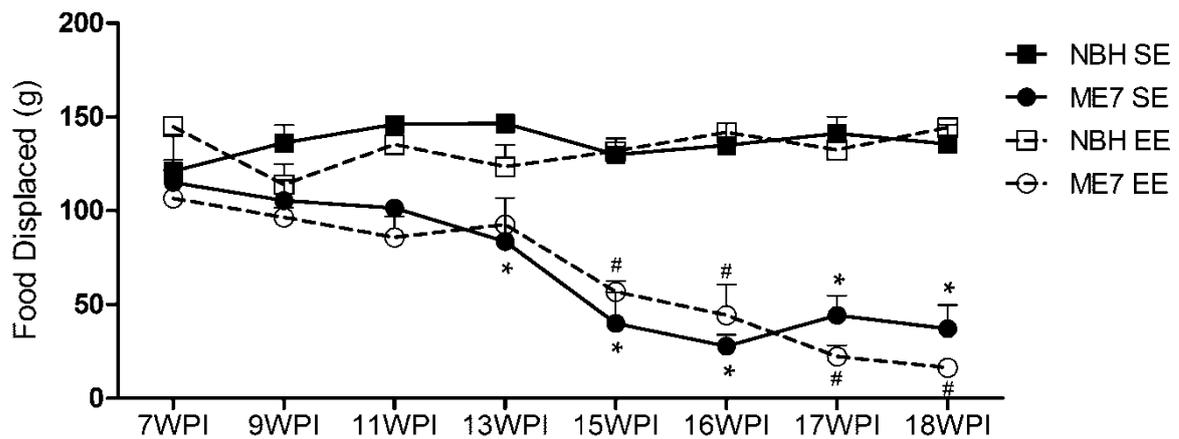


Figura 14. Quantidade de ração removida durante o burrowing como uma função da progressão da doença prion. Note que o grupo ME7SE reduz a atividade de burrowing na 13 wpi enquanto que o grupo ME7 EE somente apresenta redução na 15 wpi. O teste ANOVA dois critérios confirma o impacto significativo da doença ($F = 104,8$; $p < 0,001$) e seu agravamento em função do tempo ($F = 8,82$; $p < 0,001$) refletido na redução da atividade de burrowing com significativa interação entre essas variáveis ($F = 4,71$; $p < 0,0001$). (*) indica diferença significativa entre NBHSE e ME7SE ($p < 0,01$). (#) indica diferença significativa entre NBH EE e ME7 EE ($p < 0,01$).

4.1.2 Memória de reconhecimento de objeto

Os resultados do teste de reconhecimento da identidade ou localização espacial de objetos podem ser analisados na Figura 15. A linha superior de gráficos ilustra o percentual de tempo de exploração do objeto estacionário ou deslocado. Note que o grupo ME7 SE é o único que não apresenta taxas de exploração diferentes entre os dois objetos ($t = 0,88$; $p = 0,39$) sugerindo que não foram capazes de reconhecer o objeto posicionado em nova localização espacial (displaced). Por outro lado, o grupo ME7 EE foi capaz de reconhecer o objeto deslocado e isso é evidente pelo tempo de exploração dedicado a ele significativamente maior ($t = 2,15$; $p < 0,042$). Todos os grupos experimentais obtiveram êxito na tarefa de discriminar o objeto novo em relação ao familiar no teste de reconhecimento da identidade do objeto (ver linha inferior de gráficos na Figura 15).

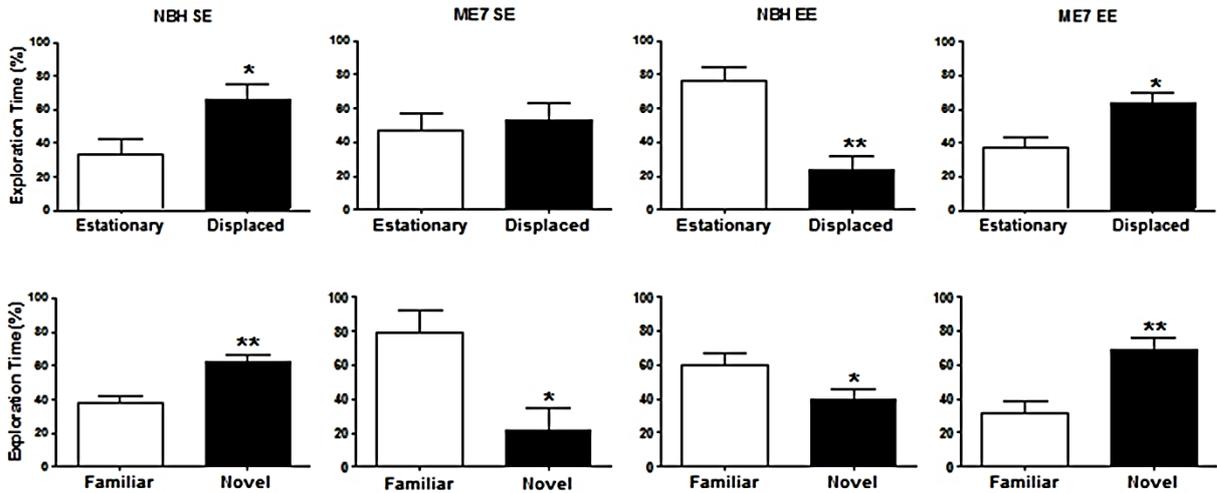


Figura 15. Reconhecimento da identidade e localização espacial de objetos na 18 spi. Note que o grupo ME7 SE foi o único incapaz de discriminar entre o objeto estacionário e o objeto deslocado no teste de memória espacial. Os demais grupos foram bem sucedidos nessa tarefa. Todos os grupos experimentais foram capazes de discriminar entre o objeto familiar e o objeto novo no teste de reconhecimento da identidade de objetos. Teste t bicaudal (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

4.2 Alterações Astrogliais

A estimativa estereológica da população astrocitária, assim como as alterações morfológicas tridimensionais do soma e ramos astrocíticos, foram utilizados como parâmetros para avaliação da astrocitose reativa e da hipertrofia dos ramos e do soma associados à doença, assim como da influência do enriquecimento ambiental sobre a célula astrocitária normal ou alterada.

O valor médio do número total de astrócitos GFAP+ no estrato radiado de CA3 e na camada polimórfica do GD para cada grupo experimental, pode ser observado na Figura 16. A doença príon produziu importante astrocitose reativa na camada polimórfica do GD ($F=6,01$; $p=0,037$) sendo o grupo ME7 SE ($5342 \pm 227,5$) significativamente diferente ($t=3,002$; $p < 0,05$) do grupo NBH SE ($3912 \pm 376,3$). O enriquecimento ambiental aumentou o número de astrócitos ($F=10,02$; $p=0,011$) sendo o grupo NBH EE ($5591 \pm 289,04$) significativamente diferente do NBH SE ($t=3,297$; $p < 0,05$) (Figura 16A). No estrato radiado de CA3, a comparação entre os grupos experimentais não apresentou diferença estatística significativa (Figura 16B). Tabela

com os resultados individuais de cada parâmetro estereológico e respectivos coeficientes de erro pode ser encontrada no anexo 2.

Foi observada importante hipertrofia no soma dos astrócitos da camada polimórfica do giro denteado dos animais com doença príon ($F=74,69$; $p<0,0001$). Tendo como referência o grupo controle de cada qual o grupo ME7 alojado em ambiente padrão apresentou aumento médio de volume (μm^3) de 198% (NBH SE- $200\pm 28,9$ vs ME7 SE- $576\pm 46,6$; $t=6,77$; $p<0,001$) e o alojado em ambiente enriquecido de 115% (NBH EE- $228\pm 10,98$ vs ME7 EE- $531\pm 41,78$; $t=5,45$; $p<0,001$) (Figura 16C).

Note que assim como na camada polimórfica do giro denteado, no stratum radiatum de CA3 os grupos com doença príon apresentaram significativa hipertrofia somática (μm^3) (NBH SE- $255\pm 23,4$ vs ME7 SE- $761\pm 40,1$ – $t=11,69$, $p<0,001$; NBH EE- $257\pm 25,6$ vs ME7 EE- $553\pm 21,4$ – $t=6,84$, $p<0,001$). Por outro lado, somente em CA3 o enriquecimento do ambiente reduziu de forma significativa a hipertrofia do corpo celular dos astrócitos dos animais doentes ($t=5,19$; $p<0,001$). As mudanças observadas no volume do corpo celular (μm^3) associado à doença príon ($F=171,8$; $p<0,0001$) ou ao enriquecimento ambiental ($F=11,35$; $p=0,007$) interagem ($F=11,77$; $p=0,0064$) contribuindo para os efeitos ilustrados na figura 16D.

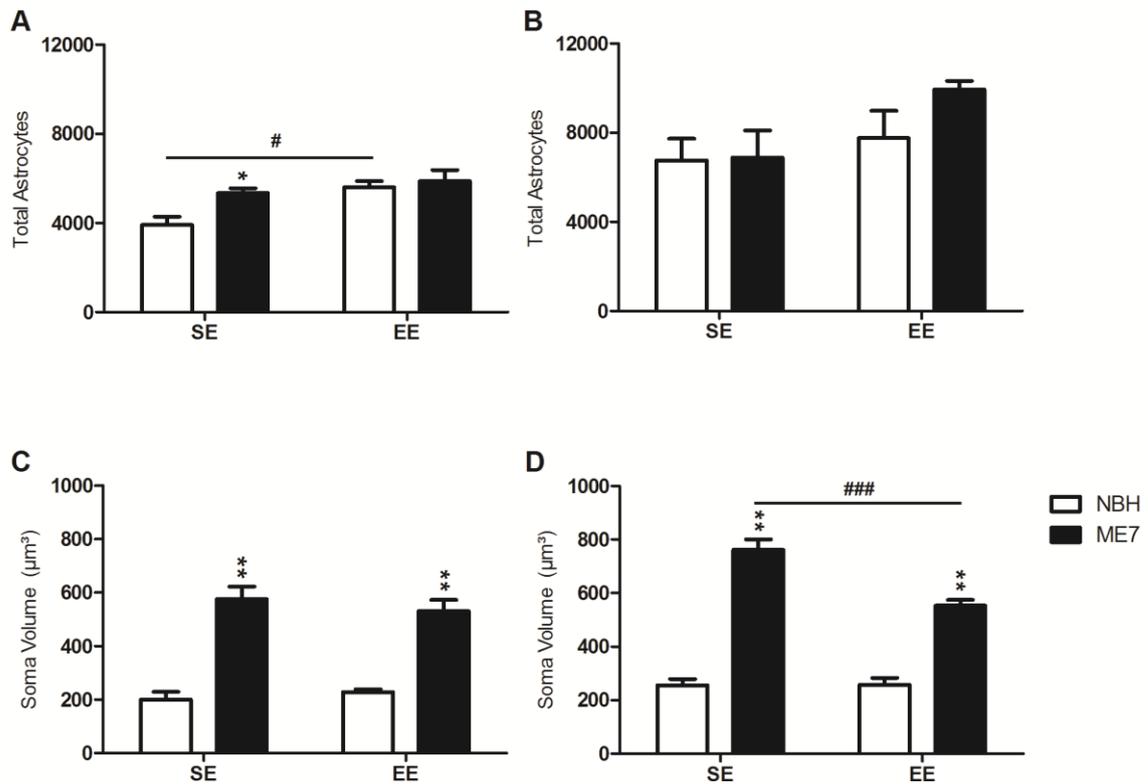


Figura 16. Ambiente e doença influenciam o número total e o volume de corpo celular de astrócitos da camada polimórfica (A, C) e o stratum radiatum de CA3 (B, D) (two-way ANOVA $p < 0,01$; $p < 0,036$ respectivamente). O grupo ME7 SE apresentou maior número de astrócitos que o grupo NBH SE entretanto não foram encontradas diferenças significativas entre ME7 EE e NBH EE na camada polimórfica do giro dentado. O enriquecimento ambiental per se aumenta o número de astrócitos (A). Em contrapartida nenhuma diferença foi encontrada em CA3. A doença príon, independente da condição ambiental, aumenta o volume do corpo celular dos astrócitos na camada polimórfica ($p < 0,0001$) e no stratum radiatum de CA3 ($p < 0,001$). O enriquecimento ambiental reduz o efeito hipertrófico induzido pela doença príon nos astrócitos de CA3 ($p = 0,007$) com significativa interação entre as variáveis ambiente e doença ($p = 0,006$) (D). As diferenças significantes nos pós-testes de Bonferroni são indicadas por (*) para comparações entre grupos de mesmo ambiente (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$) e por (#) para comparações entre ambientes (### $p < 0,001$; # $p < 0,05$).

A astrocitose do grupo ME7 SE na camada polimórfica do giro dentado coincide com o pior índice de discriminação no teste de reconhecimento espacial de objetos, enquanto que o aumento do número total de astrócitos GFAP-IR do grupo NBH EE na camada polimórfica está associado com o melhor índice de discriminação da localização espacial de objeto. O aumento da população de astrócitos GFAP-IR no grupo ME7 EE não alterou a habilidade de discriminar entre o objeto estacionário e móvel quando comparado ao grupo controle NBH SE (figura 17).

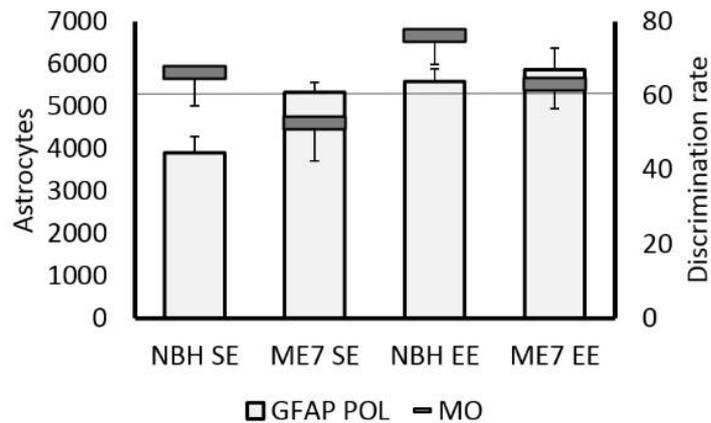


Figura 17. Representação gráfica do número total de astrócitos na camada polimórfica do giro denteado e do índice de discriminação de objetos no teste de localização espacial. Note que a astrocitose reativa associada à doença príon no grupo ME7 SE está relacionada com índice de discriminação de 53% ($\pm 10,3$) enquanto que o aumento de astrócitos GFAP-IR no grupo NBH SE coincide com a melhor taxa de discriminação (76% $\pm 7,9$). O grupo ME7 EE apresenta discriminação superior a 60% (63% $\pm 6,5$) se mantendo no mesmo nível do grupo controle NBH SE (66% $\pm 9,1$).

A documentação das alterações da microanatomia da célula astrogial no presente trabalho foi limitada à camada polimórfica do giro denteado e empregou reconstruções tridimensionais. A figura 18 apresenta os resultados médios da análise completa para as variáveis volume total (μm^3), superfície total (μm^2) e comprimento total (μm) dos segmentos (em A, C e E) assim como a análise parcelada de cada ordem de ramificação da árvore astrocítica (em B, D e F). Note que o volume total dos astrócitos dos animais doentes é maior em relação aos respectivos grupos controles (ME7 SE- $63,67 \pm 5,26$ vs NBH SE- $12,94 \pm 1,44$ – $t=9,07$, $p<0,001$; ME7 EE- $48,93 \pm 4,16$ vs NBH EE- $16,6 \pm 2,69$ – $t=5,78$, $p<0,001$) (figura 18 A). Esse aumento no volume total dos ramos foi significativamente menor em animais doentes alojados em ambiente enriquecido ($t=2,63$, $p<0,05$). As comparações entre animais doentes e controles, nas análises segregadas por ordem de segmentos, também revelaram que os grupos ME7 apresentam segmentos maiores da primeira à quinta ordem, a partir dos segmentos da sexta ordem os animais do grupo ME7 EE não se distinguem dos NBH EE (figura 18 B). O grupo ME7 SE ($174,45 \pm 10,48$) e ME7 EE ($145,83 \pm 14,38$) também apresentaram astrócitos com

superfície total dos ramos maiores do que aquelas dos grupos NBH SE ($76,63 \pm 4,43$; $t=5,47$, $p<0,001$) e NBH EE ($98,02 \pm 15,24$; $t=2,67$, $P<0,05$) respectivamente (figura 18 C).

Não houve diferença entre os grupos experimentais após análise do comprimento total dos ramos. Por outro lado, a análise específica dos ramos de primeira e segunda ordens revela que o grupo ME7 EE possui ramos proximais mais longos em relação ao NBH EE (1° ordem: $6,03 \pm 0,29$ vs $4,62 \pm 0,26$ – $t=2,96$, $p<0,05$; 2° ordem: $7,96 \pm 0,26$ vs $7 \pm 0,21$ – $t=3,18$, $p<0,05$) (Figura 18F).

Os segmentos das árvores astrocíticas mais proximais sofrem maior grau de alteração em relação aos segmentos mais distais. Os segmentos de primeira ordem do grupo ME7 SE são 5,7 vezes maiores do que os de ordem correspondente do grupo NBH SE, enquanto que os do grupo ME7 EE é 4 vezes maior do que os da ordem correspondente do grupo NBH EE. Essa diferença é reduzida progressivamente e de forma linear até os ramos de sexta ordem onde a diferença é reduzida para 2,7 vezes quando da comparação entre os grupos ME7 SE e NBH SE e 1,9 vezes quando da comparação entre ME7 EE e NBH EE. A doença príon aumenta significativamente o perímetro ($F= 132,2$, $p<0,0001$) e a área do corpo celular ($F= 455,3$, $p<0,0001$) sendo este último também influenciado pelo enriquecimento ambiental ($F= 16,76$, $p<0,002$). Esses efeitos são modificados de forma significativa pela interação entre as variáveis ($F= 8,41$, $p<0,015$). Não foram observadas diferenças significativas nas análises das variáveis Complexidade, Dimensão fractal, Quantidade e densidade de ramos, arvores, nodos e finalizações.

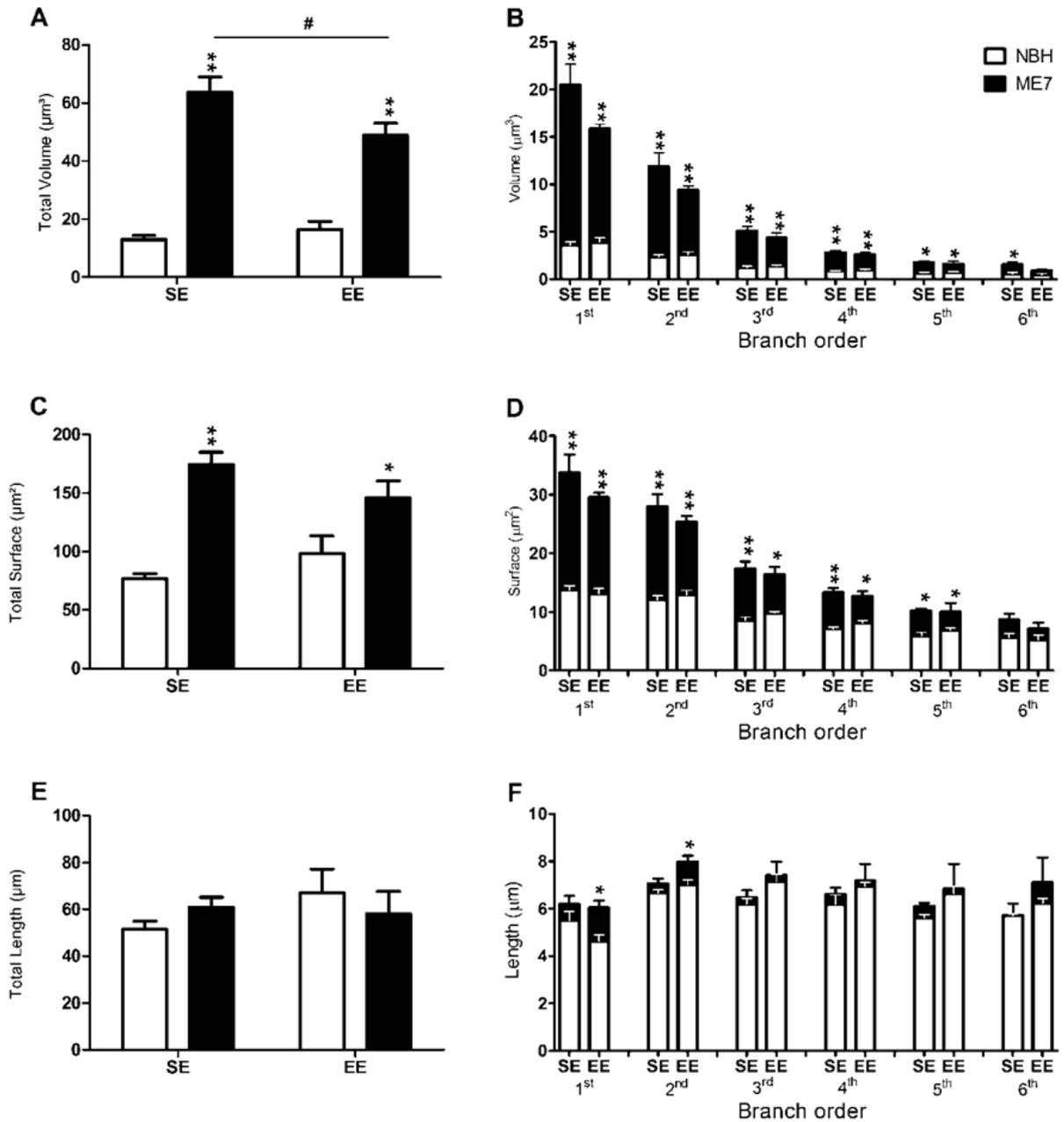


Figura 18. Representação gráfica da média dos valores morfométricos das reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado. A doença príon aumentou significativamente o volume ($p < 0,001$) e a área de superfície dos astrócitos ($p < 0,002$) independentemente do ambiente (A, C) mas esse efeito é reduzido pelo ambiente enriquecido (A). As diferenças encontradas no volume e área de superfície podem ser igualmente observadas separadamente nos ramos de primeira, segunda, terceira, quarta e quinta ordem (B, C). Diferente dos animais do ambiente enriquecido onde os efeitos se estendem até a 5^a ordem, o grupo ME7 SE permanece apresentando maior valor médio de volume nos ramos de 6^a ordem (B). Apesar de nenhuma diferença ter sido observada no comprimento total dos ramos (E), os ramos de primeira e segunda ordem dos astrócitos do grupo ME7 EE são mais longos que os do grupo NBH EE (ANOVA dois critérios seguido do pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Os resultados da análise morfométrica podem ser apreciados de forma conjunta na Figura 19 onde os astrócitos do grupo ME7 SE em relação aos grupos controle e ME7 EE possui notável aumento do corpo celular e maior espessamento de ramos de ordens mais proximais. O enriquecimento ambiental por sua vez parece aumentar a quantidade de segmentos e reduzir a hipertrofia observada na doença príon.

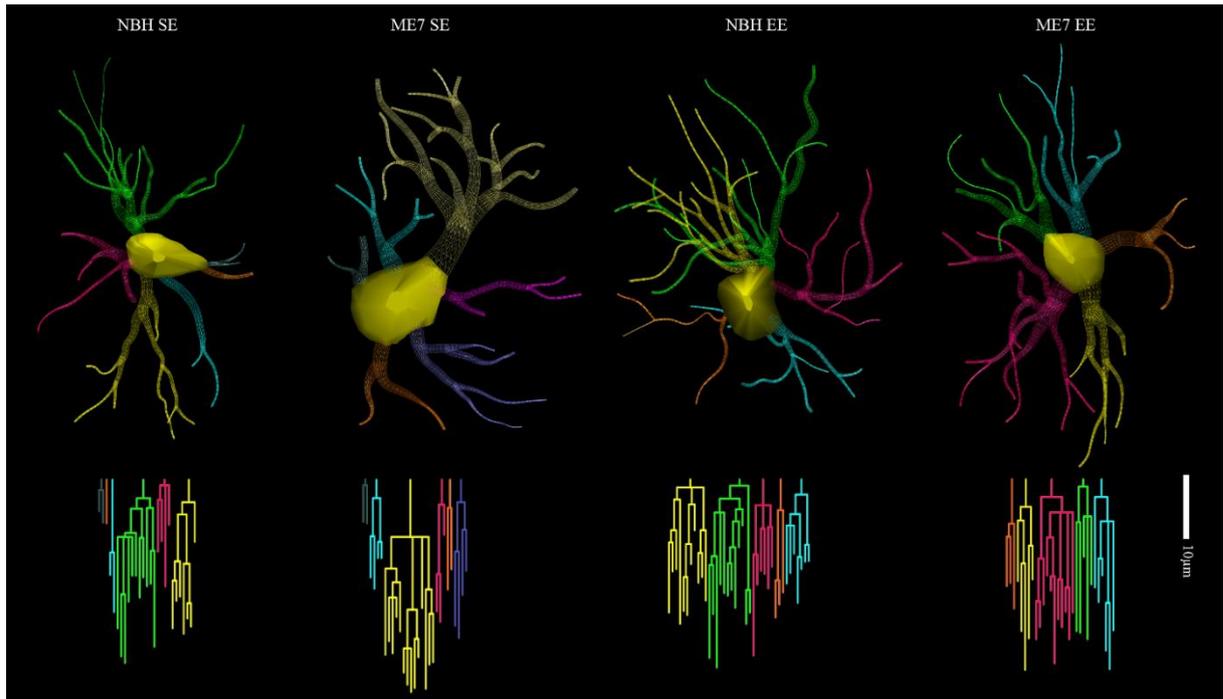


Figura 19. Reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada polimórfica do giro denteado (acima) e respectivos dendrogramas (abaixo). Notar as mudanças morfológicas induzidas pela doença príon e pelo enriquecimento ambiental. Selecionamos células com valores morfométricos próximos ao valor médio de cada grupo experimental. Escala= 10 μ m

A análise dos círculos de Sholl (Figura 20 A e B) revelou que os astrócitos do grupo NBH EE apresentam mais intersecções em relação ao grupo NBH SE no intervalo entre 15 e 21 micrometros de distância a partir do centro do corpo celular (15 μ m- $t=43,14$, $p=0,012$; 17 μ m- $t=31,73$, $p=0,033$; 19 μ m- $t=28,58$, $p=0,046$; 21 μ m- $t=35,31$, $p=0,024$). O grupo ME7 EE se distingue do grupo ME7 SE por apresentar maior número de intersecções entre 7 e 9 μ m ($t=45,71$, $p=0,01$ e $t=27,87$, $p=0,05$) e menor número de intersecções na região definida pelos círculos situados entre 31 e 33 micrometros do centro do corpo celular ($t=30,18$, $p=0,04$ e

$t=35,22$, $p=0,024$). Em função da grande hipertrofia do corpo celular dos astrócitos nos grupos ME7 a coincidência espacial entre círculos de mesma distância é perdida tornando a pronta comparação entre os ramos de mesma ordem dos grupos NBH e ME7 mais difícil. Nesse sentido, as análises comparativas dos resultados dos círculos de Sholl foram limitadas aos grupos controle SE e EE ou ME7 SE e ME7 EE afim de evitar comparações inadequadas entre estruturas não homólogas.

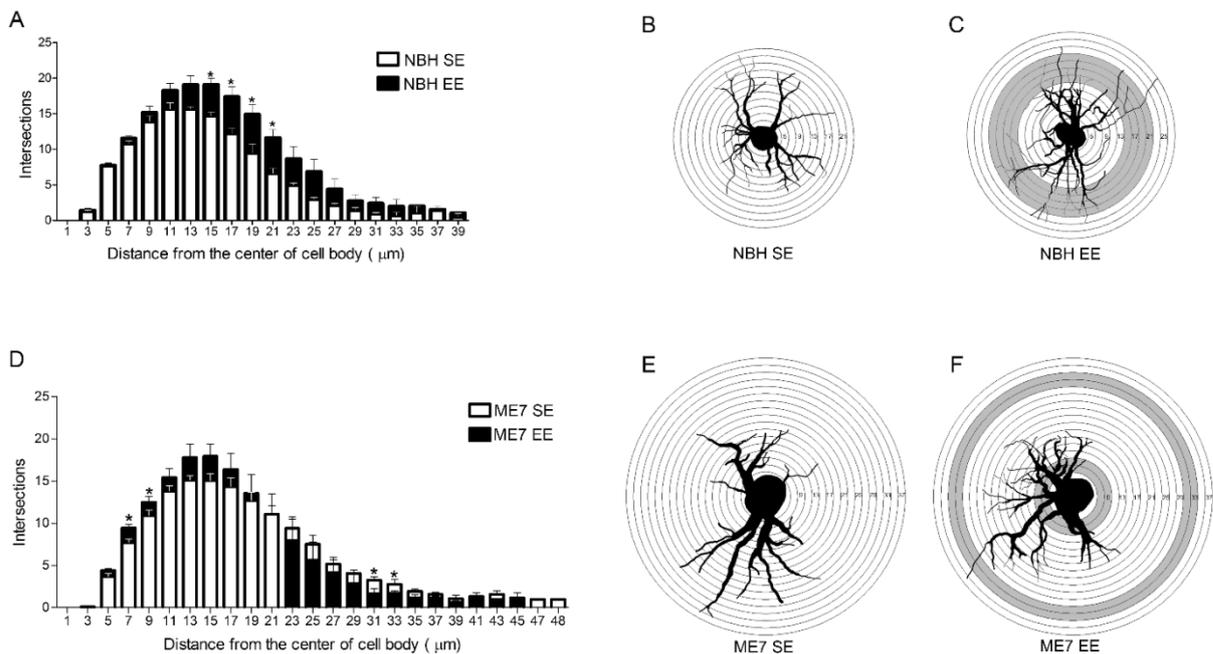


Figura 20. Representação gráfica da análise dos círculos de Sholl para ilustrar mudanças espaciais bidimensionais nos padrões de ramificação. A-C ilustram os grupos controles; D-F ilustram os grupos doentes. O número de interseções, como uma função da distância a partir do corpo celular, é maior entre 15 e 21 μm no grupo NBH EE em relação ao grupo NBH SE. Entretanto, nos grupos ME7 o enriquecimento ambiental aumenta e reduz o número de interseções entre 7 e 9 μm e entre 31 e 33 μm respectivamente. As áreas sombreadas em cinza indicam as zonas onde ocorrem as diferenças entre os grupos experimentais.

A estatística multivariada é uma importante ferramenta de análise quando não se tem uma hipótese a priori acerca de possíveis agrupamentos nas amostras selecionadas para análise. Com a finalidade de buscar esses agrupamentos, múltiplas variáveis são estudadas para comparação entre grupos experimentais que podem apresentar diferentes níveis de significância estatísticas. O estudo da variância de cada parâmetro analisado de todos os objetos de interesse de cada indivíduo permite selecionar as variáveis que mais contribuem para a formação dos

aglomerados que possam existir. O teste para formação de conglomerados, a partir das variáveis; perímetro do soma, área do soma, comprimento total dos segmentos, superfície total dos segmentos, volume total dos segmentos, número total de segmentos, nodos de ramificação e terminações de todos os 171 astrócitos reconstruídos, revelou a formação de quatro conglomerados à distância de ligação de 5000 (Figura 21). A descrição detalhada dos grupos inclui da esquerda para a direita um primeiro agrupamento que é formado somente por astrócitos dos animais doentes, dos quais vinte pertencem ao grupo ME7 SE e quatro ao grupo ME7 EE. O segundo agrupamento é formado por dezesseis astrócitos do grupo ME7 SE, quinze do grupo ME7 EE, sete do grupo NBH EE e somente 1 do grupo NBH SE. O quarto agrupamento possui quatorze astrócitos do grupo ME7 SE, doze do grupo ME7 EE, doze do grupo NBH EE e cinco do NBH SE. O último e maior agrupamento (n=65) na extremidade esquerda do dendrograma é eminentemente formado por astrócitos de animais NBH uma vez que somente três são do grupo ME7 SE e outros três do ME7 EE (figura 21A).

Os resultados da análise discriminante indicou as variáveis área do corpo celular ($F=4,66$, $p=0,0037$), comprimento total dos ramos ($F=9,17$, $p=0,00001$) e nodos de ramificação ($F=9,17$, $p=0,001$) como as mais importantes para a formação dos agrupamentos (Wilks lambda $\cong 0,13028$).

A representação gráfica da distribuição canônica é feita a partir das elipses e ilustra bem a distinção entre os grupos ME7 e NBH (figura 21B). A distância quadrada de Mahalanobis também é um bom método para analisar similaridades e diferenças entre amostras multivariadas e diferente da distância euclidiana não depende das unidades de escala. As respectivas distâncias de Mahalanobis para os agrupamentos do gráfico da figura 21B são: NBH SE vs ME7 SE = 19,68 ($F=58,12$, $p<0,001$), NBH SE vs NBH EE = 0,581 ($F=1,64$, $p>0,05$), ME7 SE vs ME7 EE = 2,487 ($F=7,09$, $p<0,001$) e NBH EE vs ME7 EE = 16,51 ($F=45,27$, $p<0,001$). Em conjunto esses resultados sugerem que os grupos NBH e ME7 possuem distâncias entre

centróides significativamente diferentes e que o grupo ME7 SE também se distingue do grupo ME7 EE.

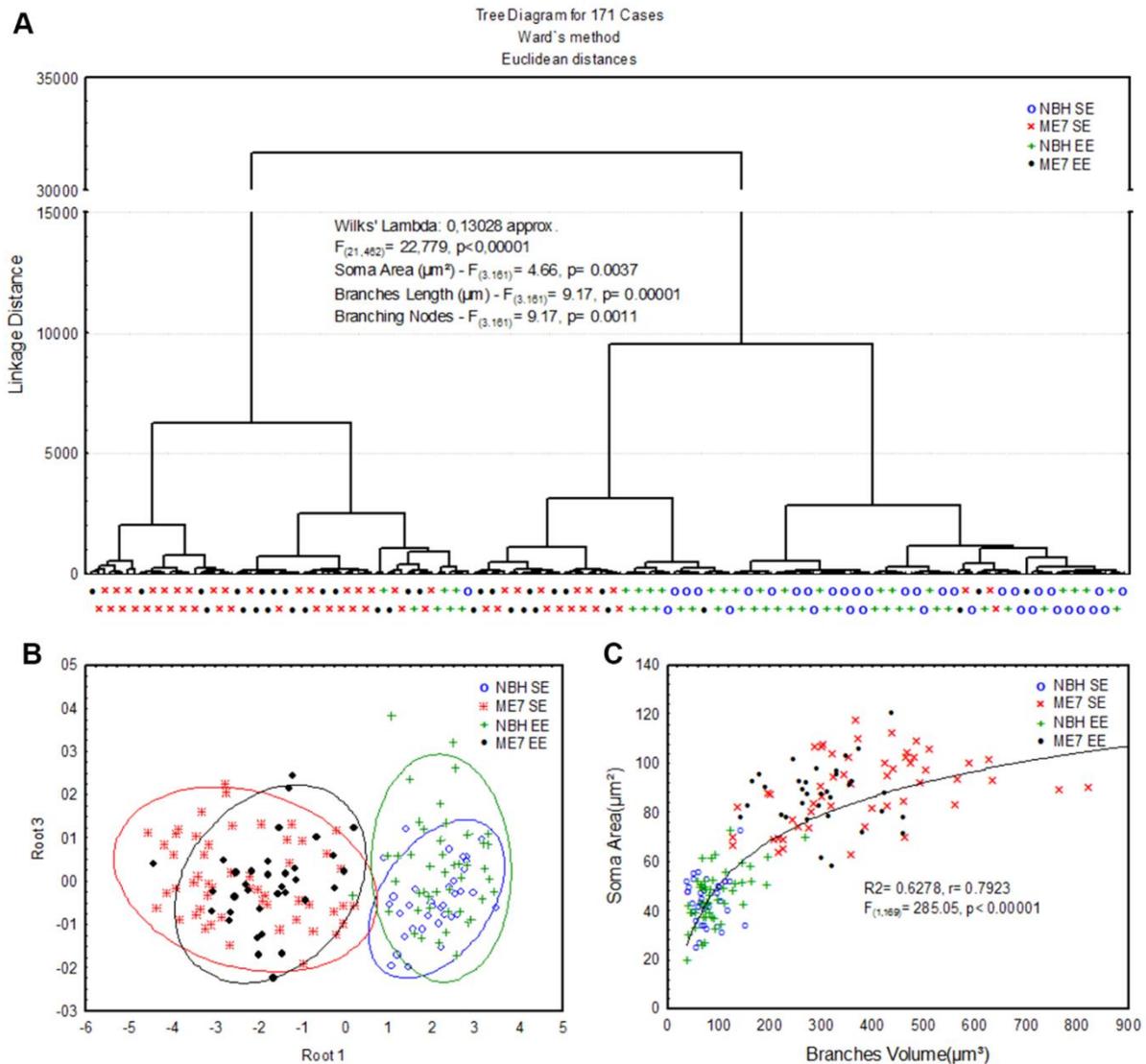


Figura 21. Análise de conglomerados (Ward) de todos os 171 astrócitos reconstruídos para testar a hipótese de que os astrócitos de camundongo com doença príon são morfologicamente distintos dos astrócitos de camundongos controles. Comprimento de segmentos, nodos e área do soma foram as medidas morfológicas que mais contribuíram para a formação de grupos (A). Representação gráfica da distribuição canônica da análise discriminante revela significativa superposição entre astrócitos do grupo ME7 SE e ME7 EE e do grupo NBH SE e NBH EE, exceto por um astrócito do grupo NBH EE incluído nas elipses dos grupos ME7 (B). Significativa correlação logarítmica ($R^2 = 0,63$) foi detectada entre área do corpo celular e volume dos segmentos sugerindo interdependência entre essas características morfométricas.

O gráfico da Figura 21C revela que as alterações ocorridas na área do corpo da célula astroglial estão correlacionadas com mudanças no volume total dos segmentos astrocíticos ($R^2 = 0,628, F = 285,05, p < 0,00001$). A curva logarítmica apresenta as células dos grupos NBH SE e

NBH EE polarizadas à esquerda enquanto que as dos grupos ME7 SE e ME7 EE se distribuem ao longo da curva com um aparente distanciamento maior de astrócitos dos animais ME7 SE com maiores valores totais de volume dos segmentos.

Para testar a hipótese da existência de diferentes famílias morfológicas de astrócitos dentro de cada grupo experimental foi realizada a análise de conglomerados com células reconstruídas dos animais pertencentes a um mesmo grupo experimental. O resultado da análise discriminante, ilustrada de forma gráfica na Figura 22, revelou que a área de segmentos foi a variável comum a todos os grupos que mais contribuiu para a distinção entre as famílias de astrócitos. No caso dos grupos ME7, além daquela, a área do corpo celular também contribuiu significativamente para a distinção entre as famílias astrocíticas (ver dendrogramas na linha superior da figura 22).

Com a distância de ligação de 2000 distinguiu-se os aglomerados a partir do dendrograma e coloriu-se os astrócitos que pertencem a um mesmo aglomerado com a mesma cor do fragmento do dendrograma a que pertencem (ver desenho dos astrócitos na figura 22). O grupo controle NBH SE apresentou duas famílias de astrócitos com morfologia distinta e o grupo NBH EE apresentou três famílias distintas sendo a terceira formada por astrócitos com grandes áreas de superfície. Por outro lado, as astrócitos do grupo ME7 SE formaram quatro grupos distintos e com média de superfície maior que as observadas nos grupos NBH. O grupo ME7 EE apresentou somente três famílias de astrócitos. Nos gráficos em colunas da última linha da figura 22, ilustram-se os valores médios e respectivos erros padrão dos parâmetros morfométricos mais importantes para formação das famílias encontradas dentro de cada grupo experimental (área de superfície dos segmentos e área do corpo celular).

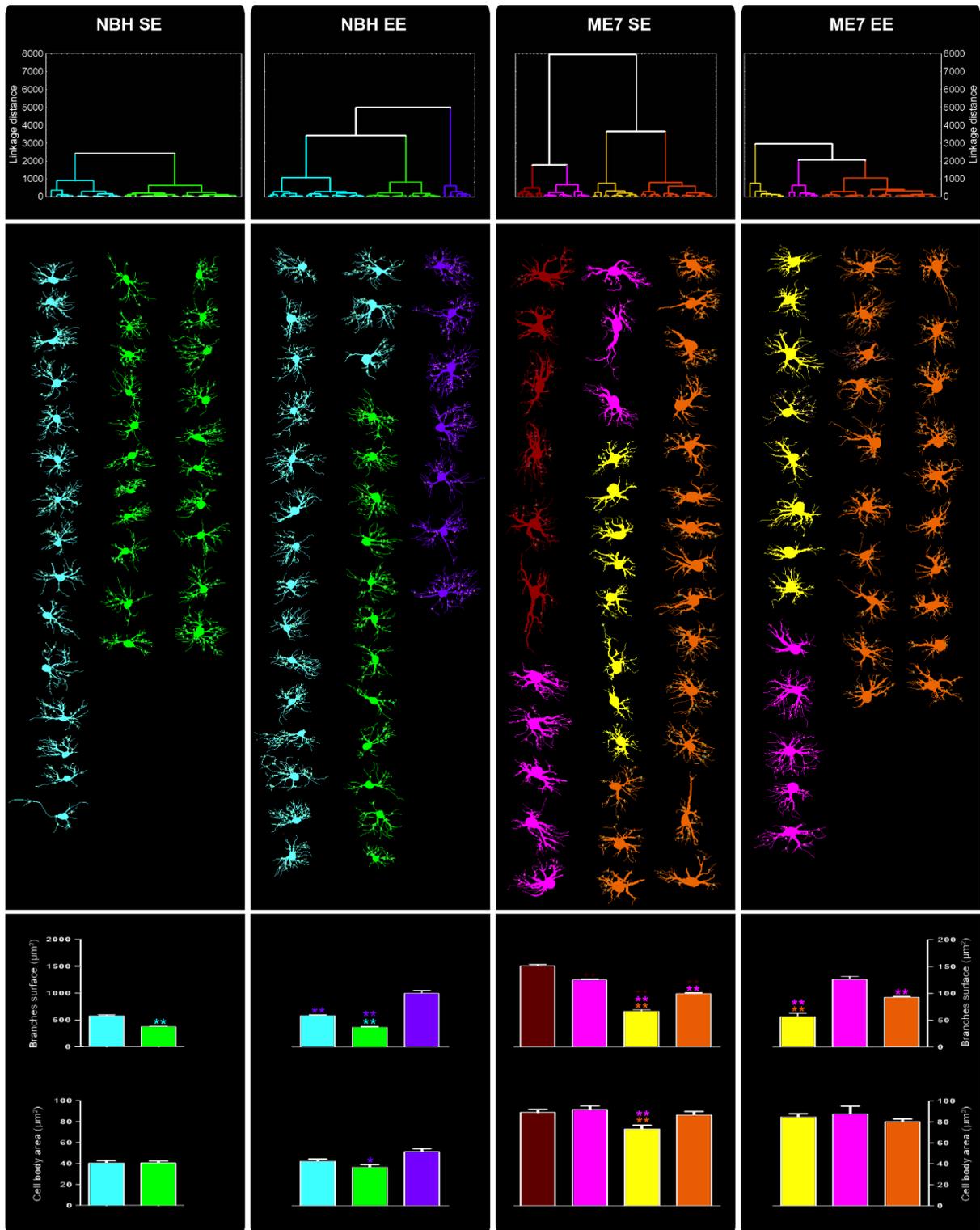


Figura 22. Representação gráfica da análise de conglomerados (Ward) de cada grupo experimental (NBHSE, NBHEE, ME7SE e ME7EE) para testar a hipótese da existência de famílias de astrócitos morfologicamente distintos dentro de cada grupo. Análise discriminante e teste t bicaudal foram utilizados para distinguir as famílias de astrócitos. Astrócitos da mesma cor, dentro de cada grupo experimental, pertencem a mesma família. A linha superior ilustra em gráficos a formação de grupos pela análise de conglomerados. Abaixo estão os astrócitos reconstruídos de três animais de cada grupo experimental escolhidos ao acaso. Note que os astrócitos dos grupos ME7 apresentam corpos celulares maiores e segmentos mais espessos. O grupo NBH SE apresenta somente duas famílias. Por outro lado o grupo NBH EE possui três famílias sendo a nova família (lilás) caracterizada por astrócitos com maior

superfície de segmentos. O grupo ME7 possui quatro famílias de astrócitos com área de segmentos e de soma maiores que os observados nos grupos NBH. Note que o grupo NBH EE apresenta três famílias e nenhuma delas se assemelha à família de cor vermelha do grupo ME7 SE. ANOVA um critério, Bonferroni pós-teste (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$). Comparações pareadas são indicadas pela cor e posição relativa do símbolo (*).

Análise multivariada também foi aplicada aos valores médios de cada animal pertencente aos diferentes grupos experimentais. O dendrograma, com distância euclidiana e ligação Wards, ilustrado na figura 23A é resultante das variáveis volume do corpo celular (probe nucleator), perímetro e área do soma e comprimento, superfície e volume dos ramos (NeuroLucida). Observe a clara formação de dois conglomerados compostos por animais dos grupos NBH e outro pelos sujeitos ME7 (Distância entre grupos: NBH SE vs ME7 SE- $F=36,97$, $p=0,00008$; NBH EE vs ME7 EE- $F=23,71$, $p=0,00036$). A variável discriminante para formação dos conglomerados é o volume dos ramos astrocíticos (Lambda parcial = 0,305; F-removido= 5.304; $p = 0,032$). A distribuição canônica também apresenta clara distinção entre os grupos ME7 e os grupos NBH (figura 23B). A correlação linear entre o volume do corpo celular com as variáveis superfície e volume dos ramos (gráfico C) ou área e comprimento do corpo celular (gráfico D) é altamente significativa e demonstra que quanto maior o volume do corpo celular maior é a superfície ($R^2=0,81$, $p < 0,0001$) e o volume dos ramos ($R^2=0,85$, $p < 0,0001$) ou a área ($R^2=0,94$, $p < 0,0001$) e o perímetro do soma ($R^2=0,94$, $p < 0,0001$).

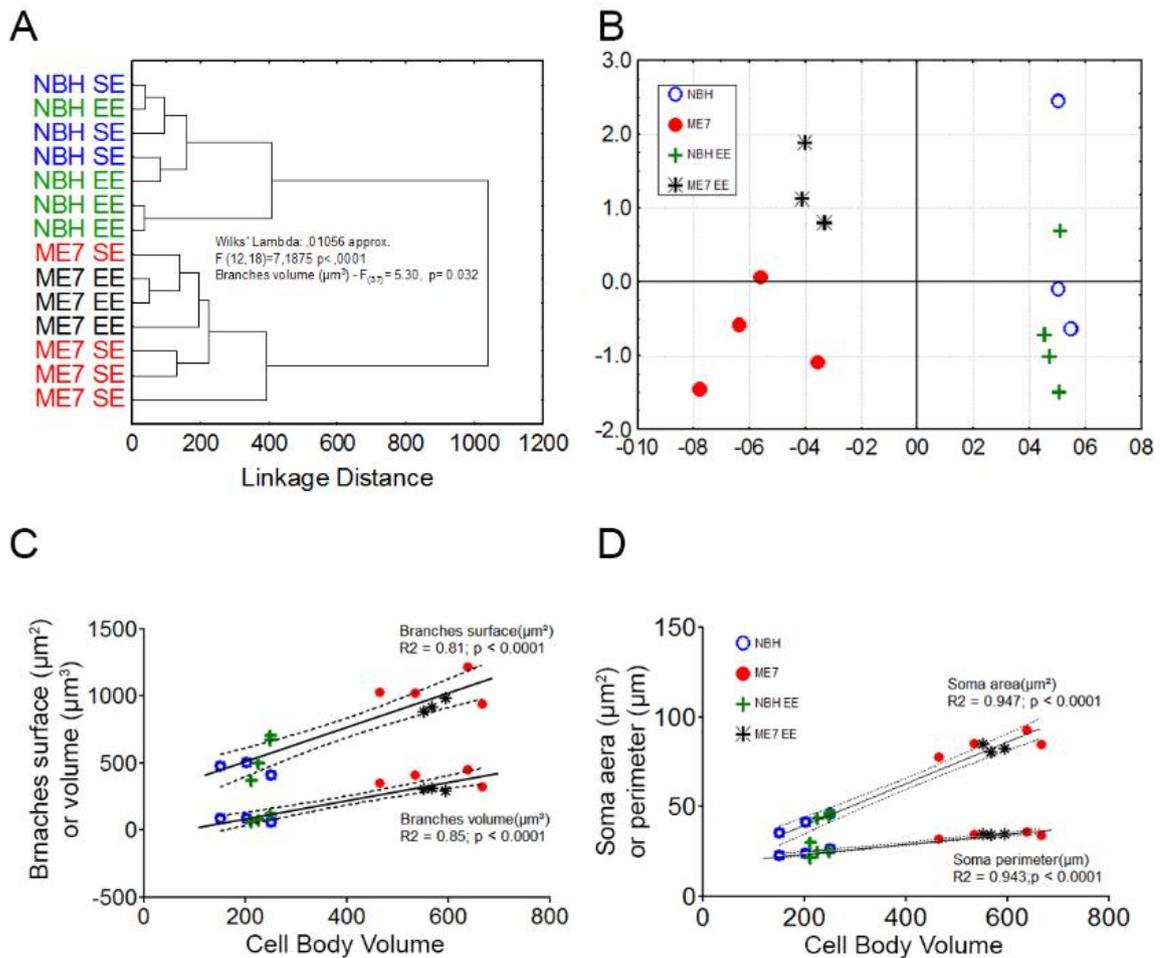


Figura 23. Representação gráfica para ilustrar a análise de conglomerados (Método de Ward) (A), Distribuição canônica da análise discriminante (B), Regressão linear entre volume do corpo celular e superfície dos segmentos e volume dos segmentos (C) e entre volume do corpo celular com perímetro e área do soma (D). Note a clara distinção entre NBH e ME7 tanto na análise de conglomerados como na distribuição canônica discriminante. O volume dos segmentos é a variável que mais contribui para separação dos grupos.

A quantificação do volume de cobertura dos campos de células ramificadas só pode ser realizada a partir de reconstruções tridimensionais. O modelo computacional de envelopamento convexo (convex hull analysis) pode ser útil para a interpretação funcional dos ramos GFAP+ uma vez que a maior parte das ramificações astrocíticas não são marcadas pela imunohistoquímica para GFAP e que o padrão morfológico desses ramos segue a formação de uma densa rede de finos ramos que não se distingue desde as regiões proximais ao soma até os pés terminais (Shigetome et al 2013). Os resultados da análise de convex hull revelaram que o enriquecimento ambiental aumentou significativamente o volume de cobertura ($F=6,14$,

p=0,035) sendo os astrócitos dos animais do grupo NBH EE 91% maiores em volume de cobertura que os do grupo NBH SE ($4778,95 \pm 110,85$ vs $2500,77 \pm 306,17$; $t=2,74$, $p<0,05$) (Figura 24).

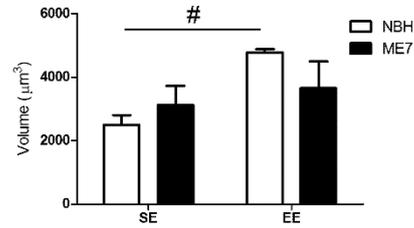


Figura 24. Representação gráfica da análise convex hull aplicada aos astrócitos reconstruídos da camada polimórfica. Note que o enriquecimento ambiental aumenta significativamente o volume do campo de cobertura dos astrócitos em relação ao grupo NBH SE. #ANOVA dois critérios $p<0,035$.

5 DISCUSSÃO

A neuropatologia da doença príon vem sendo amplamente investigada em modelos experimentais, contribuindo para compreensão de novos mecanismos celulares e moleculares da neurodegeneração crônica. No presente estudo nós utilizamos métodos de reconstrução tridimensional e estereologia sem viés para quantificar alterações morfológicas de astrócitos em animais adultos jovens no estágio tardio (18 semanas pós-injeção) da doença príon investigando a hipótese de que o ambiente enriquecido retarda a progressão da doença.

Nossas investigações no giro dentado e CA3 demonstram que os astrócitos dessas regiões do hipocampo de animais infectados pelo agente ME7 apresentam diferenças numéricas e morfológicas em relação aos astrócitos dos animais controles. A camada polimórfica do giro dentado é alvo de astrocitose reativa nos animais dos grupos ME7 ao apresentar aumento no volume do corpo celular e número de astrócitos, enquanto em CA3 as mudanças se limitam a hipertrofia do soma astrocítico dos animais doentes. As análises morfométricas tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica revelam importante hipertrofia dos segmentos proximais e distais, assim como significativa mudança no padrão de ramificação dos astrócitos dos indivíduos inoculados com ME7. O enriquecimento ambiental impacta os astrócitos da camada polimórfica alterando a morfologia astrocítica aumentando o número de ramificações e o volume de cobertura da neurópila em animais controles, além de aumentar a população GFAP-IR. Além disso, o ambiente enriquecido reduz o aumento do corpo astrocítico em CA3 decorrente da infecção pelo agente ME7, mimetizando os efeitos da doença sobre o volume e a distribuição espacial dos segmentos na camada polimórfica. Métodos de estatística multivariada revelaram a existência de subtipos de astrócitos morfológicamente distintos em cada grupo experimental permanecendo por serem investigados as implicações funcionais e os mecanismos moleculares de tais alterações.

5.1 Alterações Astrocíticas em Modelos Murinos Transgênicos da Doença de Alzheimer e em Modelo Murino de Doença Prion

Os astrócitos apresentam típica alteração morfológica quando estão reativos e a principal característica dessas mudanças é o aumento da expressão de GFAP. Em modelo murino transgênico de doença de Alzheimer (PDAPP-J20) que apresenta redução no número de astrócitos em CA1, as mudanças morfológicas dos astrócitos parecem estar relacionadas com a distância entre essas células e as placas beta amiloides. De fato astrócitos imunomarcados para GFAP mais próximos das placas apresentam hipertrofia de segmentos, enquanto aqueles mais distantes apresentam redução de seus volumes (Beauquis *et al.*, 2013).

Estudo recente em camundongos transgênicos (APPswePS1dE9) revelou que astrócitos e micróglia próximos à placas beta amiloides apresentam aumento da atividade de proteossomos (maior sistema de degradação de proteínas), sendo os astrócitos também caracterizados pelo aumento da expressão de GFAP, independente de sua proximidade em relação às placas (Orre *et al.*, 2013). A degradação da proteína beta amiloide também foi recentemente descrita em modelo murino e está associado ao aumento na biogênese de lisossomos em astrócitos (Xiao *et al.*, 2014). Esses mecanismos tomados em conjunto, ajudam a compreender como os astrócitos podem ser eficientes na remoção e degradação de placas beta amiloides em modelos transgênicos de DA (Wyss-Coray *et al.*, 2003; Koistinaho *et al.*, 2004) e como a atenuação da ativação astrocítica pode ter efeito contrário, acelerando o crescimento de placas amiloides (Kraft *et al.*, 2013).

Apesar da extensa literatura investigando a relação entre astrocitose reativa e modelos transgênicos de DA, até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a descrever as alterações morfológicas na microestrutura astrocítica em modelo experimental de doença príon, corroborando achados anteriores em modelos transgênicos de DA quando demonstra o aumento

do volume e da área de superfície dos ramos proximais e distais, assim como do soma astrocítico.

A quantificação do número total de astrócitos em modelos experimentais da DA através de métodos estereológicos somente foi realizada anteriormente por nosso grupo (Borner, R. *et al.*, 2011), sendo a maioria dos trabalhos limitados a análise qualitativa e quantificações bidimensionais. Assim as bases quantitativas dessas alterações não tinham ainda sido firmemente estabelecidas. Os achados do presente e de trabalho anterior (Borner, R. *et al.*, 2011) revelam importante aumento de astrócitos imunomarcados para GFAP na camada polimórfica do giro denteado na 18ª semana após injeção intrahipocampal de ME7. Diferentemente de nossos resultados Asuni e colaboradores (Asuni *et al.*, 2014) encontraram aumento da taxa de síntese da GFAP ao longo do curso temporal da doença príon, mas não encontraram aumento significativo na astrogliogênese, ao estudar células com dupla marcação para Ki67 e GFAP na 21ª semana após injeção intrahipocampal de ME7. Permanece por ser investigado se essas diferenças entre os estudos mencionados são explicadas por diferenças entre os modelos transgênicos e os de doença prion em modelo murino ou se a expressão de GFAP em função do curso temporal da doença pode revelar astrócitos que originalmente não foram imunomarcados pelas reações.

5.2 Possíveis correlatos funcionais: gliotransmissão

A maioria dos estudos investigaram alterações na morfologia astrogliial somente na fase avançada ou final da doença, existindo, entretanto, evidências de mudanças na morfologia dos astrócitos antes da formação de placas beta amilóides (Beauquis *et al.*, 2014). Em estágios iniciais da doença a astróglia pode apresentar alterações nas ondas de cálcio (Kuchibhotla *et al.*, 2009) que podem repercutir sobre a produção e liberação de gliotransmissores como glutamato (Pirttimaki *et al.*, 2013) e GABA (Jo *et al.*, 2014). De fato, o aumento de GABA no

líquido cefalorraquidiano de pacientes portadores da Doença de Alzheimer pode estar associado aos déficits cognitivos (Samakashvili *et al.*, 2011) e o uso de antagonistas do receptor GABA_A em camundongos APP/PS1 produziu melhoras cognitivas duradouras e facilitou a LTP no giro denteado (Yoshiike *et al.*, 2008). Em elegante estudo recente (Jo *et al.*, 2014) demonstrou-se que astrócitos não produzem ou liberam GABA em condições normais e que os canais bestrofina1 estão localizados em microdomínios sinápticos para liberação de glutamato para provável ligação aos receptores neuronais de NMDA. Seus resultados apontam que astrócitos reativos próximos as placas beta amilóides sintetizam GABA através de uma via celular dependente de monoamina oxidase B e em seguida liberam o neurotransmissor inibitório pelos canais bestrofina1 que são redistribuídos, para além dos domínios sinápticos, disponíveis para ligação com receptores extrassinápticos de GABA_A e GABA_B. A ativação desses receptores inibe a geração de potenciais excitatórios pós-sinápticos, diminuindo a intensidade da excitação na via perfurante sobre o giro denteado, e, em consequência, compromete a plasticidade sináptica e a função cognitiva associada.

5.3 Correlatos entre doença príon, astrocitose reativa no giro denteado, enriquecimento ambiental e função cognitiva

Em condições homeostáticas os circuitos que dão sustentação à formação de memórias do tempo presente apontam o giro denteado como desenvolvendo um papel estratégico para essa função. Cabe a ele melhorar a resolução da memória espacial e para compreender essa função é útil rever a neuroanatomia das projeções da formação hipocampal e suas relações com as projeções uni e polimodais do neocórtex. A Figura 25 sintetiza esses circuitos. Como indicado no diagrama o córtex entorrinal é a principal fonte de informação que a formação hipocampal usa para executar suas funções. Tendo em vista que o giro denteado é o alvo principal dos terminais dessa projeção é razoável considerar o giro denteado como o primeiro

passo no processamento que culmina com a formação de memória episódica (Amaral *et al.*, 2007).

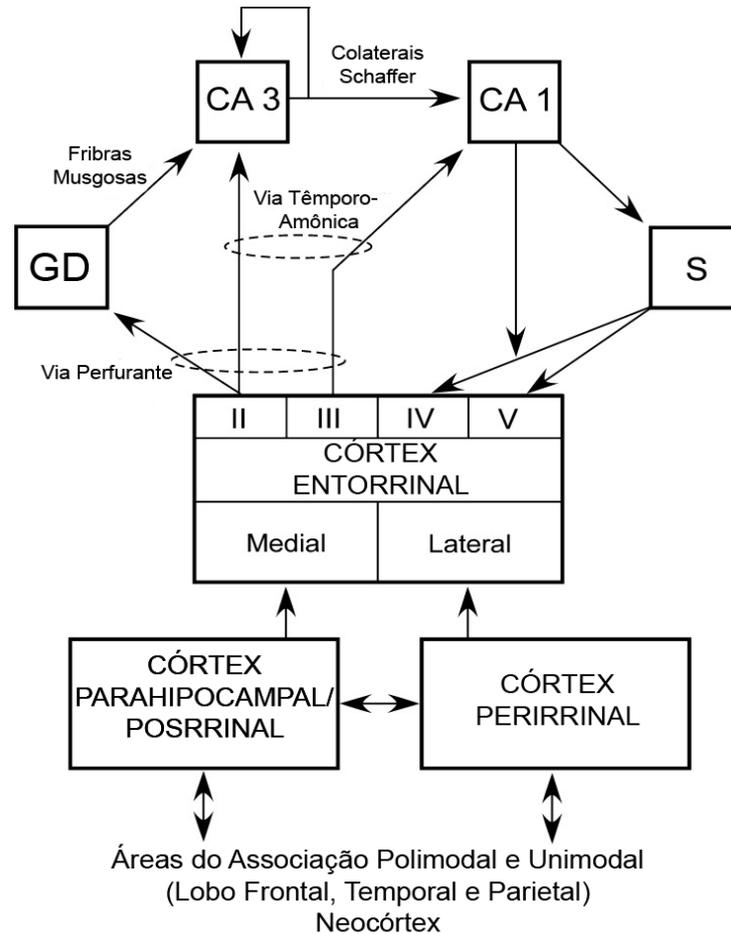


Figura 25. Representação esquemática das conexões do sistema de memória de reconhecimento da localização espacial e da forma dos objetos envolvendo o lobo temporal medial. O hipocampo aqui incluindo o giro denteado (GD), CA3, CA1 e o subiculum (S) está em situação anatômica eleita para receber de modo organizado informação previamente processada de diferentes áreas neocorticais que convergem para três áreas corticais temporais denominadas entorrinal, perirrinal e parahipocampal (no rato pósrrinal). De uma forma simplificada o diagrama ilustra a entrada no hipocampo a partir das camadas II e III do córtex entorrinal. Uma vez no hipocampo a informação flui de maneira unidirecional através do circuito trissináptico: giro denteado, CA3 e CA1 (via perfurante) ou diretamente para CA1 a partir da camada III do córtex entorrinal (via têmporo-amônica). De CA1 diretamente, ou através do subiculum o circuito se fecha de volta ao córtex entorrinal fazendo sinapses com as camadas profundas. Figura adaptada de Clark e Squire, 2013 (Clark and Squire, 2013).

De particular interesse para o presente trabalho é o fato recentemente descoberto de que os novos neurônios gerados na camada subgranular do giro denteado recebem através das células alvos da via perfurante localizadas na camada molecular do giro denteado (“MOPP cells”) contatos sinápticos inibitórios e que a estimulação da via perfurante resulta na ativação

daquelas, que por sua vez imprimem forte inibição sobre os neurônios granulares (Li *et al.*, 2013). Além disso, tanto por conta das propriedades intrínsecas das células granulares quanto por circuitos GABA-érgicos locais reforçados por sinapses químicas e junções em fenda de células neuroglialformes GABA-érgicas da camada molecular (Armstrong *et al.*, 2011), as aferências fortemente excitatórias provenientes do córtex entorrinal disparam apenas umas poucas células granulares que enviam seus impulsos em direção a CA3. Esse disparo esparsos das células granulares tal como se verá adiante é importante para a separação de padrões (Leutgeb and Moser, 2007) e codificação de informação espacial (Moser *et al.*, 2008).

Para entender o racional subjacente ao papel do giro denteado na separação de padrões ambíguos e melhoria da resolução da memória espacial, é útil rever brevemente esse conceito ilustrado na figura 26. Para compreender esse papel e sua contribuição para o reconhecimento da localização espacial de objetos de forma contextual dois aspectos dos circuitos relacionados precisam ser considerados: 1) o número muito maior de neurônios no giro denteado em comparação com CA3 e com o córtex entorrinal, onde cada célula granular faz sinapse com não mais do que uma dúzia de neurônios piramidais em CA3; 2) sinapses musgosas maiores localizadas na vizinhança dos somas das células piramidais de CA3 e com poder de disparo de seus alvos. Além disso é necessário lembrar do ponto de vista funcional que a população de células granulares permanece sob forte inibição tônica induzida por receptores GABA-érgicos ativados continuamente pelo GABA extrasináptico (Arima-Yoshida *et al.*, 2011), o que permite apenas excitação global esparsa e que essa inibição é essencial para codificação de informação necessária à separação de padrões espaciais ambíguos.

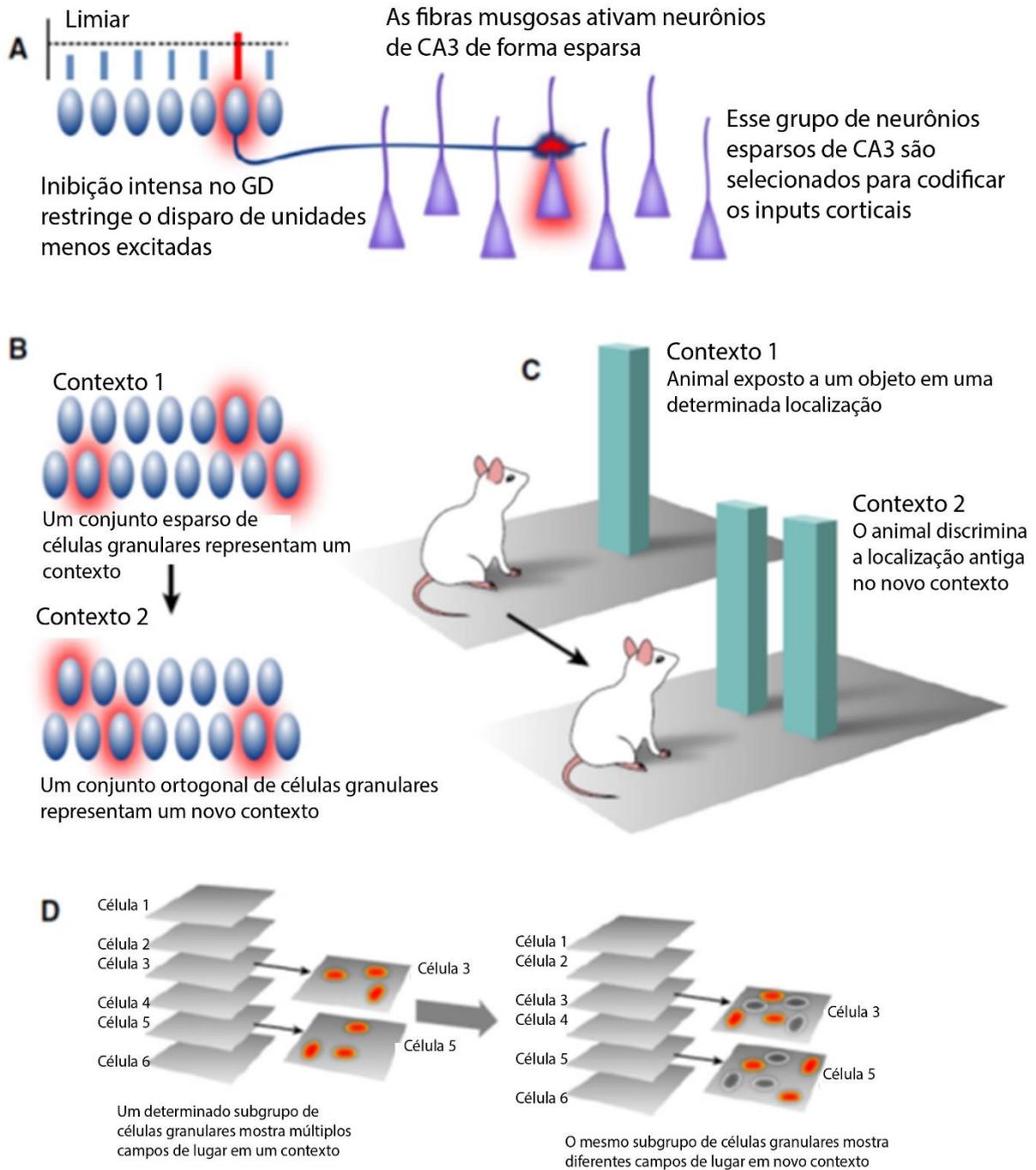


Figura 26. Sumário dos conceitos relacionados à hipótese da separação de padrões. A – Contribuição do giro denteado para a separação de padrões (codificação esparsa, inibição intensa e sinapse esparsa das fibras musgosas). B – Conceito computacional da separação de padrões. C – Exemplo comportamental da separação de padrões. D – Exemplo eletrofisiológico da separação de padrões. Figura adaptada a partir de Aimone e colaboradores (Aimone *et al.*, 2011).

Por outro lado, demonstrou-se que a integridade do giro denteado mas não a de CA1 é essencial para a discriminação de objetos semelhantes em contextos diferentes (Aimone *et al.*, 2011). Para essa função os novos neurônios granulares oriundos de atividade neurogênica da camada subgranular do giro denteado do adulto também contribuem (Sahay *et al.*, 2011). De acordo com essa proposta a neurogênese contínua do adulto permite uma combinação de sinais que partem do giro denteado em direção a CA3 a partir de uma população de neurônios granulares jovens que recebem numerosos inputs corticais e que codificam a maioria dos padrões do ambiente com menor acuidade espacial e outra população de neurônios granulares maduros que codificam parâmetros decisivos de eventos experimentados previamente com maior resolução. Essas duas populações trabalhando em conjunto são capazes de maximizar a informação codificada. Em síntese a hipótese prediz que os neurônios imaturos do giro denteado proporcionam uma representação densa de baixa especificidade da maioria dos inputs corticais enquanto que os neurônios granulares maduros proporcionam representação esparsa mas de alta especificidade, agindo uma e outra, de forma complementar (Aimone *et al.*, 2011).

Tendo em conta essa arquitetura funcional é fácil prever que as alterações astrocíticas associadas ao giro denteado nos animais doentes podem contribuir diretamente para romper o equilíbrio homeostático do microambiente neuronal, alterar a função sináptica e comprometer a neurogênese da camada subgranular contribuindo diretamente para o prejuízo das funções hipocampo-dependentes aumentando seu declínio a medida que as alterações neuropatológicas subjacentes se agravam. De fato a partir dos dados reunidos no presente trabalho torna-se aparente que as alterações comportamentais se agravam ao longo do curso temporal da doença e que isso está evidente a partir do desempenho em tarefas hipocampo-dependentes. No presente trabalho os primeiros sinais do comportamento doentio dependentes de um hipocampo avariado são observados nos testes de atividade de burrowing, construção de ninho e consumo de glicose que se instalam por volta da décima segunda semana pós injeção, enquanto alterações

motoras como exploração de campo aberto e força muscular apresentam sinais de alteração em torno da décima oitava semana após a injeção intracerebral (Cunningham, C. *et al.*, 2005). Nossos resultados apontam que a injeção de ME7 no estriado dorsal não alterou o curso temporal da doença, apresentando clara degeneração hipocampal e correspondente alteração na atividade de burrowing na 13ª semana pós inoculação para o grupo de ambiente padrão e na 15ª semana pós-injeção para o grupo alojado em ambiente enriquecido. Estudos anteriores demonstraram que, independente da via de inoculação do agente príon, o hipocampo é uma das principais estruturas alvo da neurodegeneração crônica associada à doença (Kimberlin *et al.*, 1987; Russelakis-Carneiro *et al.*, 1999) sendo o teste de burrowing sensível e específico ao dano hipocampal (Deacon *et al.*, 2001; Jirkof, 2014).

O declínio cognitivo incluindo os déficits de memória espacial e memória episódica em pacientes com doença de Alzheimer vem sendo bem documentados e estão associados a progressiva atrofia hipocampal (Thomann *et al.*, 2012) e à astrogliose reativa em tecido cerebral (Kato *et al.*, 1998; Schipper *et al.*, 2006).

O exercício físico e a estimulação multissensorial tem sido aplicados como intervenções não farmacológicas eficientes para diminuir a velocidade de progressão da DA. Em modelos experimentais o enriquecimento ambiental vem recebendo atenção da comunidade científica, sendo amplamente utilizado em diversos modelos de doenças neurodegenerativas, resultando no crescente número de publicações investigando os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos neuroprotetores conferidos por ele, reduzindo alterações clínicas e comportamentais (Alwis and Rajan, 2014; Hannan, 2014). Uma vez que não foram realizados estudos prévios investigando o impacto do enriquecimento ambiental na doença príon que possam ser comparados ao realizado no presente trabalho, resta-nos a comparação com outros modelos experimentais de doença de Alzheimer com foco nas alterações das células gliais da formação hipocampal.

Até onde sabemos, nossos resultados são os primeiros a demonstrar declínio da memória espacial de reconhecimento de objeto em modelo murino de doença príon, assim como de demonstrar efeito significativo de neuroproteção manifestado como uma redução da velocidade de progressão da doença nos camundongos com doença príon que viveram em ambiente enriquecido. Nossos achados corroboram achados experimentais em modelos transgênicos de DA (Blázquez *et al.*, 2014; Polito *et al.*, 2014) permitindo comparações com os resultados de estudos transversais em pacientes com DA com estilo de vida ativo que apresentaram melhor desempenho cognitivo e menor atrofia do lobo temporal quando possuem melhor aptidão cardiorrespiratória (Honea *et al.*, 2009). Além disso, um estudo com ensaio controle e aleatório demonstrou que idosos que possuem maior risco de desenvolverem DA, ao serem submetidos a um programa de exercícios físicos durante seis meses melhoram seu desempenho cognitivo em relação a um grupo controle sedentário (Lautenschlager *et al.*, 2008).

O efeito neuroprotetor do enriquecimento ambiental sobre as astrogliose reativa e o declínio cognitivo em animais com doença príon pode ser comparado aos achados de Beauquis e colaboradores (Beauquis *et al.*, 2013) que também demonstraram que o enriquecimento ambiental diminui a redução de volume nos astrócitos imunomarcados para GFAP em animais transgênicos de DA (PDAPP-J20). Esse resultado foi posteriormente corroborado em outro modelo transgênico da DA (3xTg-AD) que apresentou redução de superfície e volume do corpo celular e das ramificações dos astrócitos em camundongos alojados em ambiente padrão, enquanto os alojados em ambiente enriquecido ou que realizaram somente exercício voluntário em rodinhas de corrida, não se distinguiram de seus controles transgênicos (Rodríguez, Terzieva, *et al.*, 2013). Se essas mudanças morfológicas na astróglia estão ou não associadas aos efeitos benéficos do enriquecimento ambiental e se isso está ou não associado diretamente a redução na formação de aglomerados neurofibrilares e proteína precursora de amilóide (Dong *et al.*, 2012) são questões que permanecem em aberto.

Nosso estudo também contribui para compreensão da plasticidade astrogliar em animais saudáveis expostos ao ambiente enriquecido por destacar o aumento no número, e o aumento de ramificações e do volume da neurópila coberto individualmente pelos astrócitos na camada polimórfica do giro denteado. Esses achados podem ser comparados aos encontrados por Viola e colaboradores (2009), nos quais a reconstrução bidimensional de astrócitos do estrato radiato de CA1 revelou aumento de ramificações, no modelo de círculos de sholl, após oito semanas de enriquecimento ambiental. Resultado semelhante foi descrito utilizando microscopia confocal para analisar astrócitos do giro denteado de camundongos que apresentaram significativo aumento de superfície dos ramos e dos volumes do soma e ramos astrocíticos após exposição ao exercício voluntário ou ao enriquecimento ambiental (Rodríguez, Terzieva, *et al.*, 2013). Por outro lado, Beauquis e colaboradores (2013) utilizando também microscopia confocal e imunomarcção para GFAP de astrócitos de CA1 não encontraram alteração de volume, mas sim do padrão de ramificação quando da análise de Sholl após três meses de enriquecimento ambiental. Embora todos os estudos tenham utilizado imunomarcção para GFAP, as diferenças nas áreas de interesse e métodos de quantificação podem ajudar a explicar as diferenças encontradas entre os resultados.

Em estudos anteriores demonstramos que envelhecimento e enriquecimento ambiental aumentam o número total de astrócitos no giro denteado de camundongos e que esses achados podem estar relacionados com alterações cognitivas que dependem de cada condição experimental: o envelhecimento aumenta a população de astrócitos na camada polimórfica e compromete memória episódica e aprendizado espacial; enriquecimento ambiental aumenta o número de astrócitos na camada molecular e melhora memória episódica e aprendizado espacial (Diniz *et al.*, 2010). Mais recentemente nossos achados foram corroborados por Sampedro-Piquero e colaboradores (2014) ao demonstrar que a melhora na performance cognitiva de ratos velhos expostos ao enriquecimento ambiental pode estar relacionada ao aumento da densidade

de astrócitos GFAP-IR no giro denteado e CA3, assim como pelo aumento do comprimento, número de intersecções e de nodos de ramificação dos astrócitos do giro denteado, CA3 e CA1. No presente trabalho, a hiperplasia e a hipertrofia astrocítica patológica foi associada ao comprometimento cognitivo no teste de localização espacial de objetos e, por outro lado, em animais saudáveis, o aumento de astrócitos na camada polimórfica e suas respectivas mudanças morfológicas foram associados ao melhor índice de discriminação no teste de memória espacial (ver figura 17).

Em condições patológicas os astrócitos de animais alojados em ambiente enriquecido passam a produzir fatores neurotróficos como GDNF e BDNF (Young *et al.*, 1999; Williamson *et al.*, 2012) e podem alterar a resposta imunológica promovendo neuroproteção através da modulação de citocinas (Williamson *et al.*, 2012). Recentemente um estudo se dedicou a investigar os efeitos do enriquecimento ambiental (modelo 3xTgAD de DA) e suas interrelações sobre os níveis de microRNA (miRNA) no hipocampo de camundongo. Foram encontradas alterações percentuais de miRNA relacionados a modulação de fatores de morte celular programada, resposta imunológica e reguladores dos mecanismos moleculares e celulares da transmissão sináptica. Um destaque pode ser dado as alterações de miR-325, um miRNA envolvido na redução de síntese de tomosina, proteína que atua na inibição da transmissão sináptica interferindo na liberação de neurotransmissores. Os camundongos alojados em ambiente enriquecido apresentaram aumento de miR-325 enquanto os 3xTgAD de ambiente padrão diminuíram. Essa regulação foi confirmada pelo aumento de imunomarcção para tomosina no giro denteado dos animais modelos de DA e redução naqueles dos grupos de ambiente enriquecido (Barak *et al.*, 2013).

Tomados em conjunto nossos resultados demonstram pela primeira vez em modelo murino de doença príon que o enriquecimento ambiental produz neuroproteção e que esse efeito benéfico parece associado à diminuição da astrocitose reativa prevenindo os prejuízos

cognitivos associados à degeneração hipocampal. Esses resultados reforçam o uso do modelo murino de doença príon para o estudo de doenças crônicas neurodegenerativas por mimetizar achados clínicos e neuropatológicos previamente descritos em pacientes com doença de Alzheimer.

5.4 Os Limites das Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico e pela Reconstrução Tridimensional.

É comum optar por secções obtidas com auxílio de vibrátomo para estudos imunohistoquímicos e isso parece estar relacionado ao fato de que os anticorpos parecem penetrar mais facilmente e.g. (Dorph-Petersen *et al.*, 2001). No presente trabalho elegemos esse procedimento adotando zona de guarda para evitar o problema do dano tecidual na superfície de corte com perda provável de objetos de interesse se a contagem fosse realizada sem o estabelecimento da zona de guarda (Andersen and Gundersen, 1999). Estudos recentes, entretanto não encontram perda de objetos de interesse nas superfícies das secções sugerindo o contrário, um acréscimo do número de objetos nessas regiões possivelmente decorrentes da compressão maior nas faces expostas à navalha durante o corte (Gardella *et al.*, 2003). Assim é possível que esse efeito se traduza em estimativas diferentes quando as caixas de contagens estão dispostas na superfície ou no centro das secções: enquanto a primeira abordagem tenderia a superestimar, a última tenderia a subestimar os valores.

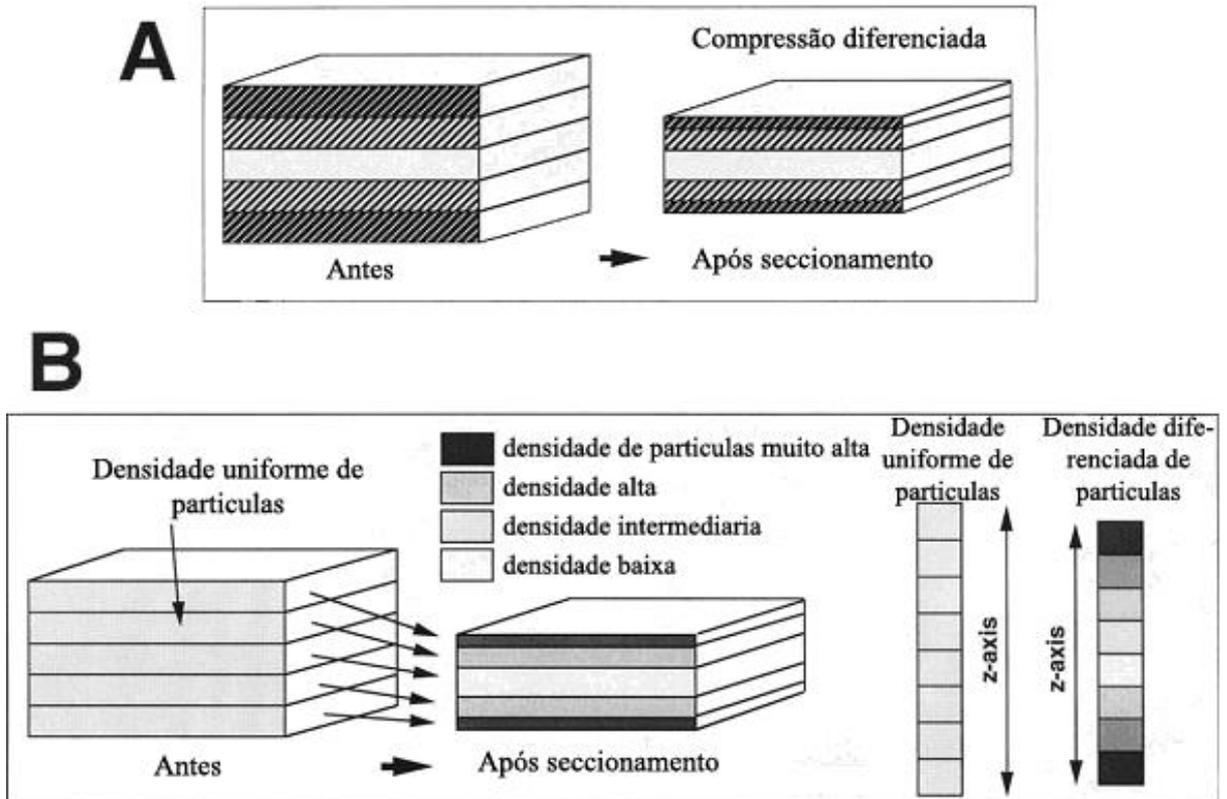


Figura 27. Deformação de secções na direção do eixo z devido à compressão durante o seccionamento. (A) O bloco de tecido à esquerda mostra cinco zonas iguais em espessura ao longo do eixo z antes do corte. Após o corte a compressão torna as zonas externas mais compactas do que a região central. (B) Distribuição uniforme de objetos de interesse é esperada antes do corte enquanto que após o corte é esperado que se encontre distribuição diferenciada não homogênea. Fonte: (Gardella *et al.*, 2003).

Este tipo de problema afeta todas as estimativas que empregam o dissecor óptico dado que a densidade de objetos de interesse e o volume de referência são diretamente atingidos pelo efeito de compressão. No presente trabalho, entretanto empregou-se o fracionador óptico, metodologia que não utiliza nem a densidade nem o volume de referência como parâmetros para estimativa do número de neurônios o que a torna imune aos efeitos da retração diferencial e compressão não lineares induzidas pelo processo de fixação, corte e desidratação.

Um dos alvos do presente trabalho foi estimar o número de células alteradas dentro de um determinado volume de tecido em regiões afetadas pela doença: CA3 e giro denteado, usando investigação estereológica sem viés. Como em todos os casos onde se utiliza a microscopia para realizar tais estimativas, não é possível contar todas as células dentro da região

de interesse. Para contornar esse dilema e se obter estimativas confiáveis (que se aproximam do real) a partir de uma diminuta fração amostral, é necessário a utilização de coleta sistemática e aleatória de dados, incluindo a terceira dimensão. Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total de células dentro da área de interesse a partir do número de células detectadas em cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (Schmitz and Hof, 2005). Entretanto, com esse procedimento, o máximo que se pode pretender é realizar estimativas que se aproximem ao máximo do que seria esperado (Cruz-Orive, 1994; Schmitz, 1998).

Para alcançar esse objetivo existem dois métodos estereológicos: o fracionador óptico já descrito e o método que estima o número total de células multiplicando a densidade média de células pelo volume da região de interesse (Schmitz and Hof, 2000). Em estudo recente entretanto ficou evidente que as estimativas do número total de objetos de interesse obtidas a partir do fracionador óptico, são do ponto de vista estatístico e do ponto de vista do esforço empreendido, mais eficientes do que as estimativas a partir da densidade e volume (Schmitz and Hof, 2000). Além disso avaliou-se igualmente várias maneiras de se estimar o erro em amostras simuladas por computador de modo a encontrar um modo de calcular o coeficiente de erro que mais se aproximasse do erro verdadeiro. Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (Glaser and Wilson, 1998).

Por conta do fato de que o coeficiente de erro de Scheaffer representa a variação devida à incerteza metodológica intrínseca, é esperado e desejável que ele sempre contribua menos para a variação total ($CE^2/CV^2 < 0.5$, onde CE é o coeficiente de erro devido à incerteza metodológica intrínseca e $CV = (\text{Desvio Padrão}/\text{Média})$). No presente trabalho a relação CE^2/CV^2 foi pequena na maioria dos casos minimizando a probabilidade de erros procedimentais durante as contagens. Quando exceções a essa regra geral foram detectadas a regra $CE^2/CV^2 < 0.5$ foi

insuficiente para avaliar erros metodológicos intrínsecos ao sistema de amostragem em função do fato de que o coeficiente de variação biológica e o coeficiente de erro eram pequenos perdendo o sentido aplicar a regra geral (Slomianka, L. and West, M., 2005).

A outra maneira que se empregou para se avaliar os erros relacionados à escolha da matriz amostral foi o cálculo da variação biológica definida como: $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (onde CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica) expresso em valor percentual do coeficiente de variação. Considera-se que o coeficiente de erro é adequado sempre que ele contribui menos do que a variação biológica para o coeficiente global de variação. Em geral a relação previamente descrita $CE^2/CV^2 < 0.05$ acompanha esse parâmetro havendo igualmente exceções que confirmam a regra.

Entretanto mesmo com todos esses cuidados a incerteza nas estimativas ainda permanece e é decorrente de outras fontes de erro possíveis como aqueles introduzidos pelos pressupostos do observador acerca dos grupos experimentais, pelas alterações induzidas nas secções pelo processamento do tecido, pela ambiguidade no reconhecimento de áreas ou dos objetos de interesse e pela definição dos planos de foco superior e inferior da secção. Para minimizar esse tipo de incerteza é necessário executar uma série de procedimentos controle como ensaios duplos cegos, escolhas adequadas no tipo de processamento tecidual incluindo fixação, plano de corte, imunohistoquímicas seletivas, garantindo a cada passo que todas as regiões da estrutura tenham a mesma probabilidade de contribuir para a amostra, reduzindo a ambiguidade no reconhecimento dos limites da região, assim como dos objetos da contagem. No presente trabalho a utilização de marcador seletivo para a astróglia e o emprego dos mesmos procedimentos imunohistoquímicos, mesmo protocolo de contagem nos diferentes grupos e utilização de escolhas aleatórias e sistemáticas para reconstrução dos astrócitos minimizaram as possibilidades de erros metodológicos.

No presente trabalho através da análise estatística multivariada dos parâmetros morfométricos dos astrócitos, revelamos numerosos grupos morfológicamente distintos na camada polimórfica do giro denteado em camundongos jovens infectados e não infectados com o agente ME7. É importante reconhecer entretanto que reconstruções microscópicas 3D também podem ser afetadas por fatores mecânicos associados ao seccionamento no vibrátomo e pelo procedimento de desidratação, que podem induzir retração não uniforme nas secções no eixo z. Assim, as estimativas das modificações nas dimensões no eixo x/z durante o processamento do tecido podem não ser extrapoladas linearmente para dimensão z. Essas limitações metodológicas impostas devem ser levadas em consideração na interpretação dos dados, no presente estudo. No entanto, deve-se enfatizar que um indicador confiável da retração severa no eixo z é a ondulação de ramos, o que significa que os processos individuais não encolhem na mesma velocidade que a fatia nas quais estão localizados. Esses efeitos podem ter amplitude mais elevada na superfície, diminuindo a maiores profundidades no eixo z. Esse padrão, no entanto, não foi observado nos astrócitos eleitos para serem reconstruídos e a amostra foi tomada onde o impacto dessas mudanças não foram perceptíveis. Mais recentemente, tem sido demonstrado que, no eixo dos z (perpendicular à superfície de corte), as secções retraem aproximadamente 25% da espessura do corte após desidratação (Carlo and Stevens, 2011). Com base nesses achados todas as reconstruções dos astrócitos, do presente trabalho, foram corrigidas para a retração do eixo z em 75%. Nenhuma correção foi aplicada para os eixos x/y, os quais não parecem mudar após a desidratação histológica e imunomarcção.

6 CONCLUSÃO

O ambiente empobrecido das gaiolas padrão de laboratório e o ambiente rico em estímulos visuo-espaciais e somatomotores do ambiente enriquecido tem sido usados para mimetizar os estilos de vida humano sedentário e ativo respectivamente. Como a doença prion tem sido amplamente usada como modelo experimental da neurodegeneração crônica nós testamos a hipótese de que o ambiente enriquecido poderia reduzir a velocidade de progressão da doença e que isso poderia estar relacionado à redução das alterações astrocitárias no sistema límbico. Nossos resultados permitiram concluir que de fato o ambiente enriquecido promove redução da velocidade de propagação dos sintomas e que isso parece associado a uma redução das alterações astrocíticas numéricas e/ou morfológicas no giro denteado e em CA3, duas das regiões da formação hipocampal frequentemente lesadas durante o curso temporal da Doença de Alzheimer. Encontramos igualmente, a partir da análise estatística multivariada, a presença de famílias astrocíticas morfológicamente distintas cujos significados funcionais nos animais doentes e controles permanecem por serem investigados. Foi encontrada entretanto estreita associação entre a perda da capacidade de memória espacial e redução da atividade de burrowing e a presença das alterações astrocíticas que caracterizaram as famílias morfológicas nos animais doentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALWIS, D. S.; RAJAN, R. Environmental enrichment and the sensory brain: the role of enrichment in remediating brain injury. **Front Syst Neurosci**, v. 8, p. 156, 2014. ISSN 1662-5137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228861> >.
- ANDERSEN, B. B.; GUNDERSEN, H. J. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. **J Microsc**, v. 196, n. Pt 1, p. 69-73, Oct 1999. ISSN 0022-2720 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10540259 >.
- ASUNI, A. A. et al. Analysis of the hippocampal proteome in ME7 prion disease reveals a predominant astrocytic signature and highlights the brain-restricted production of clusterin in chronic neurodegeneration. **J Biol Chem**, v. 289, n. 7, p. 4532-45, Feb 2014. ISSN 1083-351X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366862> >.
- BARAK, B. et al. Opposing actions of environmental enrichment and Alzheimer's disease on the expression of hippocampal microRNAs in mouse models. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e304, 2013. ISSN 2158-3188. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022509> >.
- BEAUQUIS, J. et al. Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. **Exp Neurol**, v. 239, p. 28-37, Jan 2013. ISSN 1090-2430. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022919> >.
- _____. Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease. **Hippocampus**, v. 24, n. 3, p. 257-69, Mar 2014. ISSN 1098-1063. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132937> >.
- BLÁZQUEZ, G. et al. Cognitive and emotional profiles of aged Alzheimer's disease (3×TgAD) mice: effects of environmental enrichment and sexual dimorphism. **Behav Brain Res**, v. 268, p. 185-201, Jul 2014. ISSN 1872-7549. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24746486> >.
- BORNER, R. et al. Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease: stereological analysis in the albino Swiss mice model. **Prion**, v. 5, n. 3, p. 215-27, 2011 Jul-Sep 2011. ISSN 1933-690X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862877> >.
- CARLO, C. N.; STEVENS, C. F. Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. **J Comp Neurol**, v. 519, n. 14, p. 2803-10, Oct 2011. ISSN 1096-9861. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21491430> >.
- CRUZ-ORIVE, L. M. Toward a more objective biology. **Neurobiol Aging**, v. 15, n. 3, p. 377-8; discussion 379-80, May-Jun 1994. Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7936068 >.

CUNNINGHAM, C. et al. Neuropathologically distinct prion strains give rise to similar temporal profiles of behavioral deficits. **Neurobiol Dis**, v. 18, n. 2, p. 258-69, Mar 2005. ISSN 0969-9961. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15686954> >.

DEACON, R. M. et al. Burrowing into prion disease. **Neuroreport**, v. 12, n. 9, p. 2053-7, Jul 2001. ISSN 0959-4965. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435945> >.

DINIZ, D. G. et al. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **Eur J Neurosci**, v. 32, n. 3, p. 509-19, Aug 2010. ISSN 1460-9568. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20704596> >.

DONG, J. et al. Memantine combined with environmental enrichment improves spatial memory and alleviates Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated prone-8 (SAMP8) mice. **J Biomed Res**, v. 26, n. 6, p. 439-47, Nov 2012. ISSN 1674-8301. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554783> >.

DORPH-PETERSEN, K. A.; NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. J. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. **J Microsc**, v. 204, n. Pt 3, p. 232-46, Dec 2001. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11903800 >.

GARDELLA, D. et al. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. **J Neurosci Methods**, v. 124, n. 1, p. 45-59, Mar 30 2003. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12648764 >.

GLASER, E. M.; WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **Journal of Microscopy**, v. 192, p. 163-171, 1998.

HANNAN, A. J. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 40, n. 1, p. 13-25, Feb 2014. ISSN 1365-2990. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24354721> >.

HONEA, R. A. et al. Cardiorespiratory fitness and preserved medial temporal lobe volume in Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 23, n. 3, p. 188-97, 2009 Jul-Sep 2009. ISSN 1546-4156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812458> >.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **J Neurosci Methods**, v. 234, p. 139-46, Aug 2014. ISSN 1872-678X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24525328> >.

JO, S. et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. **Nat Med**, v. 20, n. 8, p. 886-96, Aug 2014. ISSN 1546-170X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973918> >.

KATO, S. et al. Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque morphology and relationship between senile plaques and astrocytes. **Pathol Int**, v. 48, n. 5, p. 332-40, May 1998. ISSN 1320-5463. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704339> >.

KIMBERLIN, R. H.; COLE, S.; WALKER, C. A. Pathogenesis of scrapie is faster when infection is intraspinal instead of intracerebral. **Microb Pathog**, v. 2, n. 6, p. 405-15, Jun 1987. ISSN 0882-4010. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3148813> >.

KOISTINAHO, M. et al. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. **Nat Med**, v. 10, n. 7, p. 719-26, Jul 2004. ISSN 1078-8956. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195085> >.

KRAFT, A. W. et al. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. **FASEB J**, v. 27, n. 1, p. 187-98, Jan 2013. ISSN 1530-6860. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23038755> >.

KUCHIBHOTLA, K. V. et al. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. **Science**, v. 323, n. 5918, p. 1211-5, Feb 2009. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251629> >.

LAUTENSCHLAGER, N. T. et al. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. **JAMA**, v. 300, n. 9, p. 1027-37, Sep 2008. ISSN 1538-3598. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768414> >.

MOFFAT, S. D.; ELKINS, W.; RESNICK, S. M. Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. **Neurobiol Aging**, v. 27, n. 7, p. 965-72, Jul 2006. ISSN 0197-4580. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15982787> >.

ORRE, M. et al. Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 136, n. Pt 5, p. 1415-31, May 2013. ISSN 1460-2156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23604491> >.

PIRTTIMAKI, T. M. et al. $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81828, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312364> >.

POLITO, L. et al. Environmental enrichment lessens cognitive decline in APP23 mice without affecting brain sirtuin expression. **J Alzheimers Dis**, v. 42, n. 3, p. 851-64, 2014. ISSN 1875-8908. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961946> >.

RODRÍGUEZ, J. J. et al. Enriched environment and physical activity reverse astroglioneurodegeneration in the hippocampus of AD transgenic mice. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e678, 2013. ISSN 2041-4889. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23788035> >.

RUSSELAKIS-CARNEIRO, M.; BETMOUNI, S.; PERRY, V. H. Inflammatory response and retinal ganglion cell degeneration following intraocular injection of ME7. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 25, n. 3, p. 196-206, Jun 1999. ISSN 0305-1846. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417661> >.

SAMAKASHVILI, S. et al. Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease. **Electrophoresis**, v. 32, n. 19, p. 2757-64, Oct 2011. ISSN 1522-2683. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983823> >.

SAMPEDRO-PIQUERO, P. et al. Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 114, p. 16-25, Oct 2014. ISSN 1095-9564. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727294> >.

SCHIPPER, H. M. et al. Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Neurobiol Aging**, v. 27, n. 2, p. 252-61, Feb 2006. ISSN 0197-4580. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16399210> >.

SCHMITZ, C. Variation of fractionator estimates and its prediction. **Anat Embryol (Berl)**, v. 198, n. 5, p. 371-97, Nov 1998. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9801058 >.

SCHMITZ, C.; HOF, P. R. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. **J Chem Neuroanat**, v. 20, n. 1, p. 93-114, Oct 2000. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11074347 >.

_____. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, v. 130, n. 4, p. 813-31, 2005. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15652981 >.

SLOMIANKA, L.; WEST, M. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience** v. 136, p. 757-767, 2005.

THOMANN, P. A. et al. Hippocampal morphology and autobiographic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 9, n. 4, p. 507-15, May 2012. ISSN 1875-5828. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372439> >.

VIOLA, G. G. et al. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. **Brain Res**, v. 1274, p. 47-54, Jun 2009. ISSN 1872-6240. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374889> >.

WILLIAMSON, L. L.; CHAO, A.; BILBO, S. D. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. **Brain Behav**

Immun, v. 26, n. 3, p. 500-10, Mar 2012. ISSN 1090-2139. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281279> >.

WYSS-CORAY, T. et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. **Nat Med**, v. 9, n. 4, p. 453-7, Apr 2003. ISSN 1078-8956. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612547> >.

XIAO, Q. et al. Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates A β clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. **J Neurosci**, v. 34, n. 29, p. 9607-20, Jul 2014. ISSN 1529-2401. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031402> >.

YOSHIIKE, Y. et al. GABA(A) receptor-mediated acceleration of aging-associated memory decline in APP/PS1 mice and its pharmacological treatment by picrotoxin. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3029, 2008. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18716656> >.

YOUNG, D. et al. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nat Med**, v. 5, n. 4, p. 448-53, Apr 1999. ISSN 1078-8956. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10202938> >.

AGGLETON, J. P. Multiple anatomical systems embedded within the primate medial temporal lobe: implications for hippocampal function. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 7, p. 1579-96, Aug 2012. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964564> >.

AGGLETON, J. P.; BROWN, M. W.; ALBASSER, M. M. Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate-early gene functional imaging. **Neuropsychologia**, May 2012. ISSN 1873-3514. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634248> >.

AGUZZI, A.; WEISSMANN, C. Prion research: the next frontiers. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 795-8, Oct 23 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9349807 >.

_____. Prion diseases. **Haemophilia**, v. 4, n. 4, p. 619-27, Jul 1998. ISSN 1351-8216 (Print) 1351-8216 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9873804 >.

AIMONE, J. B.; DENG, W.; GAGE, F. H. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 589-96, May 2011. ISSN 1097-4199. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609818> >.

AIMONE, J. B. et al. Regulation and Function of Adult Neurogenesis: From Genes to Cognition. **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p. 991-1026, Oct 2014. ISSN 1522-1210. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287858> >.

ALWIS, D. S.; RAJAN, R. Environmental enrichment and the sensory brain: the role of enrichment in remediating brain injury. **Front Syst Neurosci**, v. 8, p. 156, 2014. ISSN 1662-5137. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228861> >.

AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Prog Brain Res**, v. 163, p. 3-22, 2007. ISSN 0079-6123 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17765709 >.

ANDERSEN, B. B.; GUNDERSEN, H. J. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. **J Microsc**, v. 196, n. Pt 1, p. 69-73, Oct 1999. ISSN 0022-2720 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10540259 >.

ARIMA-YOSHIDA, F.; WATABE, A. M.; MANABE, T. The mechanisms of the strong inhibitory modulation of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 9, p. 1637-46, May 2011. ISSN 1460-9568. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535245> >.

ARMSTRONG, C. et al. Neurogliaform cells in the molecular layer of the dentate gyrus as feed-forward γ -aminobutyric acidergic modulators of entorhinal-hippocampal interplay. **J Comp Neurol**, v. 519, n. 8, p. 1476-91, Jun 2011. ISSN 1096-9861. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21452204> >.

ASUNI, A. A. et al. Analysis of the hippocampal proteome in ME7 prion disease reveals a predominant astrocytic signature and highlights the brain-restricted production of clusterin in chronic neurodegeneration. **J Biol Chem**, v. 289, n. 7, p. 4532-45, Feb 2014. ISSN 1083-351X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366862> >.

BARAK, B. et al. Opposing actions of environmental enrichment and Alzheimer's disease on the expression of hippocampal microRNAs in mouse models. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e304, 2013. ISSN 2158-3188. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022509> >.

BARBOSA, F. F. et al. Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. **Front Behav Neurosci**, v. 7, p. 112, 2013. ISSN 1662-5153. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23986669> >.

BAYEN, U. J.; PHELPS, M. P.; SPANIOL, J. Age-related differences in the use of contextual information in recognition memory: a global matching approach. **J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci**, v. 55, n. 3, p. P131-41, May 2000. ISSN 1079-5014 (Print) 1079-5014 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11833975> >.

BEAUQUIS, J. et al. Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease. **Exp Neurol**, v. 239, p. 28-37, Jan 2013. ISSN 1090-2430. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022919> >.

_____. Neuronal and glial alterations, increased anxiety, and cognitive impairment before hippocampal amyloid deposition in PDAPP mice, model of Alzheimer's disease. **Hippocampus**, v. 24, n. 3, p. 257-69, Mar 2014. ISSN 1098-1063. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132937> >.

BERALDO, F. H. et al. Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. **J Biol Chem**, v. 285, n. 47, p. 36542-50, Nov 2010. ISSN 1083-351X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837487> >.

BETMOUNI, S.; PERRY, V. H. The acute inflammatory response in CNS following injection of prion brain homogenate or normal brain homogenate. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 25, n. 1, p. 20-8, Feb 1999. ISSN 0305-1846. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10194772> >.

BETMOUNI, S.; PERRY, V. H.; GORDON, J. L. Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. **Neuroscience**, v. 74, n. 1, p. 1-5, Sep 1996. ISSN 0306-4522. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843071> >.

BLACK, J. E. et al. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 14, p. 5568-72, Jul 1990. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1695380 >.

BLACKSTAD, T. W. Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. **J Comp Neurol**, v. 105, n. 3, p. 417-537, Oct 1956. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13385382 >.

BLÁZQUEZ, G. et al. Cognitive and emotional profiles of aged Alzheimer's disease (3×TgAD) mice: effects of environmental enrichment and sexual dimorphism. **Behav Brain Res**, v. 268, p. 185-201, Jul 2014. ISSN 1872-7549. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24746486> >.

BOLTON, D. C.; MCKINLEY, M. P.; PRUSINER, S. B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. **Science**, v. 218, n. 4579, p. 1309-11, Dec 1982. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6815801> >.

BORNER, R. et al. Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease: stereological analysis in the albino Swiss mice model. **Prion**, v. 5, n. 3, p. 215-27, 2011 Jul-Sep 2011. ISSN 1933-690X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862877> >.

_____. Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease Stereological analysis in the albino Swiss mice model. **Prion**, v. 5, n. 3, p. 215-227, JUL-SEP 2011 2011. ISSN 1933-6896.

BRINKLEY, T. E. et al. Chronic inflammation is associated with low physical function in older adults across multiple comorbidities. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 64, n. 4, p. 455-61, Apr 2009. ISSN 1758-535X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196644> >.

BROWN, D. R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 2, p. 85-90, Feb 2001. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11164938 >.

BROWN, T. H.; ZADOR, A. M. **The synaptic organization of the brain**. New York, NY: Oxford University Press.: 1990.

BUELER, H. et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 577-82, Apr 16 1992. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1373228 >.

CARLO, C. N.; STEVENS, C. F. Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. **J Comp Neurol**, v. 519, n. 14, p. 2803-10, Oct 2011. ISSN 1096-9861. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21491430> >.

CHEN, C. C.; WANG, Y. H.; WU, K. Y. Consumption of bovine spongiform encephalopathy (BSE) contaminated beef and the risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Risk Anal**, v. 33, n. 11, p. 1958-68, Nov 2013. ISSN 1539-6924. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23755826> >.

CHIARINI, L. B. et al. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J**, v. 21, n. 13, p. 3317-26, Jul 1 2002. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12093733 >.

CHURCHILL, J. D. et al. Exercise, experience and the aging brain. **Neurobiol Aging**, v. 23, n. 5, p. 941-55, Sep-Oct 2002. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12392797 >.

CLARK, R. E.; SQUIRE, L. R. Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110 Suppl 2, p. 10365-70, Jun 2013. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23754372> >.

COITINHO, A. S. et al. Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. **Neuroreport**, v. 14, n. 10, p. 1375-9, Jul 18 2003. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12876477 >.

COLBERT, L. H. et al. Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults: findings from the Health, Aging and Body Composition Study. **J Am Geriatr Soc**, v. 52, n. 7, p. 1098-104, Jul 2004. ISSN 0002-8614 (Print)

0002-8614 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15209647 >.

COLLINGE, J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 519-50, 2001. ISSN 0147-006X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283320> >.

COOPER, J. D.; BIRD, S. M. Predicting incidence of variant Creutzfeldt-Jakob disease from UK dietary exposure to bovine spongiform encephalopathy for the 1940 to 1969 and post-1969 birth cohorts. **Int J Epidemiol**, v. 32, n. 5, p. 784-91, Oct 2003. ISSN 0300-5771. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559750> >.

CRUZ-ORIVE, L. M. Toward a more objective biology. **Neurobiol Aging**, v. 15, n. 3, p. 377-8; discussion 379-80, May-Jun 1994. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7936068 >.

CUNNINGHAM, C. et al. Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 4, p. 304-312, Feb 2009. ISSN 0006-3223. Available at: <<Go to ISI>://000263249900007 >.

_____. Neuropathologically distinct prion strains give rise to similar temporal profiles of behavioral deficits. **Neurobiol Dis**, v. 18, n. 2, p. 258-69, Mar 2005. ISSN 0969-9961. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15686954> >.

_____. Central and Systemic Endotoxin Challenges Exacerbate the Local Inflammatory Response and Increase Neuronal Death during Chronic Neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 40, p. 9275-9284 2005.

DE OLIVEIRA, T. C. et al. Beneficial effects of multisensory and cognitive stimulation on age-related cognitive decline in long-term-care institutions. **Clin Interv Aging**, v. 9, p. 309-20, 2014. ISSN 1178-1998. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600211> >.

DEACON, R. M. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. **Nat Protoc**, v. 1, n. 1, p. 118-21, 2006. ISSN 1750-2799. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406222> >.

_____. Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. **Behav Brain Res**, v. 200, n. 1, p. 128-33, Jun 2009. ISSN 1872-7549. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373978> >.

DEACON, R. M. et al. Burrowing into prion disease. **Neuroreport**, v. 12, n. 9, p. 2053-7, Jul 2001. ISSN 0959-4965. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435945> >.

DIEDRICH, J. F. et al. Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 2, p. 375-9, Jan 1991. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1671170> >.

DINIZ, D. G. et al. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **Eur J Neurosci**, v. 32, n. 3, p. 509-19, Aug 2010. ISSN 1460-9568. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20704596> >.

DONG, J. et al. Memantine combined with environmental enrichment improves spatial memory and alleviates Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated prone-8 (SAMP8) mice. **J Biomed Res**, v. 26, n. 6, p. 439-47, Nov 2012. ISSN 1674-8301. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554783> >.

DORPH-PETERSEN, K. A.; NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. J. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. **J Microsc**, v. 204, n. Pt 3, p. 232-46, Dec 2001. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11903800 >.

EGGERMONT, L. et al. Exercise, cognition and Alzheimer's disease: more is not necessarily better. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 30, n. 4, p. 562-75, 2006. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16359729 >.

EICHENBAUM, H. et al. Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 7, p. 1597-608, Aug 2012. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21810443> >.

EKLUND, C. M.; KENNEDY, R. C.; HADLOW, W. J. Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. **J Infect Dis**, v. 117, n. 1, p. 15-22, Feb 1967. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4961240> >.

FORDYCE, D. E.; STARNES, J. W.; FARRAR, R. P. Compensation of the age-related decline in hippocampal muscarinic receptor density through daily exercise or underfeeding. **J Gerontol**, v. 46, n. 6, p. B245-8, Nov 1991. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1940076 >.

FORDYCE, D. E.; WEHNER, J. M. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Brain Res**, v. 619, n. 1-2, p. 111-9, Aug 13 1993. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8374769 >.

FROTA DE ALMEIDA, M. N. et al. Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes. **BMC Neurosci**, v. 13, p. 23, 2012. ISSN 1471-2202. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22376223> >.

GAMBETTI, P.; PARCHI, P. Insomnia in prion diseases: sporadic and familial. **N Engl J Med**, v. 340, n. 21, p. 1675-7, May 27 1999. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Available at: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10341282>.

GARDELLA, D. et al. Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections. **J Neurosci Methods**, v. 124, n. 1, p. 45-59, Mar 30 2003. Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12648764>.

GARIFOLI, A. et al. Exercise increases cytochrome oxidase activity in specific cerebellar areas of the rat. **Arch Ital Biol**, v. 141, n. 4, p. 181-7, Oct 2003. Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14502832>.

GEDA, Y. E. et al. Physical exercise, aging, and mild cognitive impairment: a population-based study. **Arch Neurol**, v. 67, n. 1, p. 80-6, Jan 2010. ISSN 1538-3687 (Electronic)

0003-9942 (Linking). Available at: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20065133>.

GIL-MOHAPPEL, J. et al. Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75125, 2013. ISSN 1932-6203.

Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086453>>.

GILBERT, P. E.; KESNER, R. P.; LEE, I. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. **Hippocampus**, v. 11, n. 6, p. 626-36, 2001. ISSN 1050-9631. Available at: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11811656>>.

GINALDI, L. et al. Immunosenescence and infectious diseases. **Microbes Infect**, v. 3, n. 10, p. 851-7, Aug 2001. ISSN 1286-4579 (Print)

1286-4579 (Linking). Available at: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11580980>.

GLASER, E. M.; WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **Journal of Microscopy**, v. 192, p. 163

171, 1998.

GODDE, B. et al. Age-related changes in primary somatosensory cortex of rats: evidence for parallel degenerative and plastic-adaptive processes. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 7, p. 743-52,

Nov 2002. Available at: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12470685>.

GREENBERG, D. A.; JIN, K. From angiogenesis to neuropathology. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 954-9, Dec 15 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16355213 >.

GUNDERSEN, H. J. et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 5, p. 379-94, May 1988. ISSN 0903-4641. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3288247> >.

HAFTING, T. et al. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. **Nature**, v. 436, n. 7052, p. 801-6, Aug 11 2005. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15965463> >.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463-9, Jul 2008. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650917> >.

HANNAN, A. J. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 40, n. 1, p. 13-25, Feb 2014. ISSN 1365-2990. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24354721> >.

HARGREAVES, E. L. et al. Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. **Science**, v. 308, n. 5729, p. 1792-4, Jun 17 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961670> >.

HAYES, S. M. et al. A review of cardiorespiratory fitness-related neuroplasticity in the aging brain. **Front Aging Neurosci**, v. 5, p. 31, 2013. ISSN 1663-4365. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874299> >.

HERRING, A. et al. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. **Exp Neurol**, v. 216, n. 1, p. 184-92, Mar 2009. ISSN 1090-2430. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19118549> >.

HILLMAN, C. H. et al. The relationship of age and cardiovascular fitness to cognitive and motor processes. **Psychophysiology**, v. 39, n. 3, p. 303-12, May 2002. ISSN 0048-5772. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12212649> >.

HIRAI, K. et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 21, n. 9, p. 3017-23, May 1 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11312286 >.

HONEA, R. A. et al. Cardiorespiratory fitness and preserved medial temporal lobe volume in Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 23, n. 3, p. 188-97, 2009 Jul-Sep 2009. ISSN 1546-4156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812458> >.

INGRAM, D. K. Age-related decline in physical activity: generalization to nonhumans. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 9, p. 1623-9, Sep 2000. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10994915 >.

INGRAM, D. K. et al. Rodent models of memory dysfunction in Alzheimer's disease and normal aging: moving beyond the cholinergic hypothesis. **Life Sci**, v. 55, n. 25-26, p. 2037-49, 1994. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7997063 >.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **J Neurosci Methods**, v. 234, p. 139-46, Aug 2014. ISSN 1872-678X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24525328> >.

JO, S. et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. **Nat Med**, v. 20, n. 8, p. 886-96, Aug 2014. ISSN 1546-170X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973918> >.

JOHNSTON, A. R. et al. Scrapie infection alters the membrane and synaptic properties of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones. **J Physiol**, v. 500 (Pt 1), p. 1-15, Apr 1997. ISSN 0022-3751. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097928> >.

KATO, S. et al. Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque morphology and relationship between senile plaques and astrocytes. **Pathol Int**, v. 48, n. 5, p. 332-40, May 1998. ISSN 1320-5463. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704339> >.

KESNER, R. P. An analysis of the dentate gyrus function. **Behav Brain Res**, Jan 21 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348108> >.

KIM, J. et al. Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 73 p. 17-27, 1999.

KIMBERLIN, R. H.; COLE, S.; WALKER, C. A. Pathogenesis of scrapie is faster when infection is intraspinal instead of intracerebral. **Microb Pathog**, v. 2, n. 6, p. 405-15, Jun 1987. ISSN 0882-4010. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3148813> >.

KLEIM, J. A. et al. Motor learning induces astrocytic hypertrophy in the cerebellar cortex. **Behav Brain Res**, v. 178, n. 2, p. 244-9, Mar 28 2007. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17257689 >.

KNIGHT, R. S.; WILL, R. G. Prion diseases. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 75 Suppl 1, p. i36-42, Mar 2004. ISSN 0022-3050 (Print)

0022-3050 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14978149 >.

KOBILO, T. et al. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. **Learn Mem**, v. 18, n. 9, p. 605-9, 2011. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878528> >.

KOISTINAHO, M. et al. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. **Nat Med**, v. 10, n. 7, p. 719-26, Jul 2004. ISSN 1078-8956. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195085> >.

KRAFT, A. W. et al. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. **FASEB J**, v. 27, n. 1, p. 187-98, Jan 2013. ISSN 1530-6860. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23038755> >.

KUCHIBHOTLA, K. V. et al. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. **Science**, v. 323, n. 5918, p. 1211-5, Feb 2009. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251629> >.

LANE, N. A unifying view of ageing and disease: the double-agent theory. **J Theor Biol**, v. 225, n. 4, p. 531-40, Dec 21 2003. ISSN 0022-5193 (Print) 0022-5193 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14615212 >.

LARSON, E. B. et al. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. **Ann Intern Med**, v. 144, n. 2, p. 73-81, Jan 2006. ISSN 1539-3704. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418406> >.

LAUTENSCHLAGER, N. T. et al. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. **JAMA**, v. 300, n. 9, p. 1027-37, Sep 2008. ISSN 1538-3598. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768414> >.

LAZAROV, O. et al. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 701-13, Mar 2005. ISSN 0092-8674. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766532> >.

LEUTGEB, J. K.; MOSER, E. I. Enigmas of the dentate gyrus. **Neuron**, v. 55, n. 2, p. 176-8, Jul 2007. ISSN 0896-6273. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640520> >.

LI, F. et al. Memory impairment in early sensorimotor deprived rats is associated with suppressed hippocampal neurogenesis and altered CREB signaling. **Behav Brain Res**, v. 207, n. 2, p. 458-65, Mar 2010. ISSN 1872-7549. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891990> >.

LI, Y. et al. Neurofibromin modulates adult hippocampal neurogenesis and behavioral effects of antidepressants. **J Neurosci**, v. 32, n. 10, p. 3529-39, Mar 2012. ISSN 1529-2401. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399775> >.

_____. Molecular layer perforant path-associated cells contribute to feed-forward inhibition in the adult dentate gyrus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 22, p. 9106-11, May 2013. ISSN 1091-6490. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671081> >.

LIANG, W. et al. Habitual physical activity reduces the risk of ischemic stroke: a case-control study in southern china. **Cerebrovasc Dis**, v. 28, n. 5, p. 454-9, 2009. ISSN 1421-9786 (Electronic) 1015-9770 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19738374 >.

LOPES, M. H. et al. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci**, v. 25, n. 49, p. 11330-9, Dec 2005. ISSN 1529-2401. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339028> >.

LYTLE, M. E. et al. Exercise level and cognitive decline: the MoVIES project. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 18, n. 2, p. 57-64, 2004 Apr-Jun 2004. ISSN 0893-0341. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15249848> >.

MARTINS, V. R. et al. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Lett**, v. 512, n. 1-3, p. 25-8, Feb 13 2002. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11852045 >.

MCCLOSKEY, D. P.; ADAMO, D. S.; ANDERSON, B. J. Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. **Brain Res**, v. 891, n. 1-2, p. 168-75, Feb 9 2001. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11164820 >.

MCHUGH, T. J. et al. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. **Science**, v. 317, n. 5834, p. 94-9, Jul 2007. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556551> >.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Prog Neurobiol**, v. 93, n. 3, p. 421-43, Mar 2011. ISSN 1873-5118. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219963> >.

MOORE, R. C. et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. **J Mol Biol**, v. 292, n. 4, p. 797-817, Oct 1 1999. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10525406 >.

MOSER, E. I.; KROPFF, E.; MOSER, M. B. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. **Annu Rev Neurosci**, v. 31, p. 69-89, 2008. ISSN 0147-006X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284371> >.

NECCHI, D. et al. Regional alterations of the NO/NOS system in the aging brain: a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. **Brain Res**, v. 933, n. 1, p. 31-41, Apr 12 2002. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11929633 >.

NICKLAS, B. J.; BRINKLEY, T. E. Exercise training as a treatment for chronic inflammation in the elderly. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 37, n. 4, p. 165-70, Oct 2009. ISSN 1538-3008. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19955865> >.

NUSSBAUM, J. M.; SEWARD, M. E.; BLOOM, G. S. Alzheimer disease: a tale of two prions. **Prion**, v. 7, n. 1, p. 14-9, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1933-690X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22965142> >.

OHIRA, K. et al. Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. **Eur J Neurosci**, v. 25, n. 2, p. 406-16, Jan 2007. ISSN 0953-816X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284181> >.

ORRE, M. et al. Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 136, n. Pt 5, p. 1415-31, May 2013. ISSN 1460-2156. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23604491> >.

PALLESCHI, L. et al. Effect of aerobic training on the cognitive performance of elderly patients with senile dementia of Alzheimer type. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 22 Suppl 1, p. 47-50, 1996. ISSN 0167-4943. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18653007> >.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. . London, UK: Academic Press, 2001. ISBN 0-12-547636-1.

PEDERSEN, B. K. Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. **J Appl Physiol**, v. 107, n. 4, p. 1006-14, Oct 2009. ISSN 1522-1601 (Electronic). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19696361 >.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, Oct 2008. ISSN 0031-9333 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18923185 >.

PERRY, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain Behav Immun**, v. 18, n. 5, p. 407-13, Sep 2004. ISSN 0889-1591 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15265532 >.

PERRY, V. H.; CUNNINGHAM, C.; HOLMES, C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 2, p. 161-167, Feb 2007. ISSN 1474-1733. Available at: <<Go to ISI>://000243839200015 >.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, Apr 2005. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15772055>.

PIRTTIMAKI, T. M. et al. $\alpha 7$ Nicotinic receptor-mediated astrocytic gliotransmitter release: A β effects in a preclinical Alzheimer's mouse model. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81828, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312364>>.

POLITO, L. et al. Environmental enrichment lessens cognitive decline in APP23 mice without affecting brain sirtuin expression. **J Alzheimers Dis**, v. 42, n. 3, p. 851-64, 2014. ISSN 1875-8908. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961946>>.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 228, n. 2, p. 111-33, Feb 2003. ISSN 1535-3702 (Print) 1535-3699 (Linking). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12563018>.

PRUSINER, S. Molecular biology of prion diseases. **Science**, v. 252, p. 1515-1522, 1991.

PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**, v. 216, n. 4542, p. 136-44, Apr 1982. ISSN 0036-8075. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6801762>>.

RAEBER, A. J. et al. Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. **EMBO J**, v. 16, n. 20, p. 6057-65, Oct 1997. ISSN 0261-4189. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9321385>>.

RODRÍGUEZ, J. J. et al. Increased densities of resting and activated microglia in the dentate gyrus follow senile plaque formation in the CA1 subfield of the hippocampus in the triple transgenic model of Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, Jul 2013. ISSN 1872-7972. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23827221>>.

_____. Enriched environment and physical activity reverse astroglial degeneration in the hippocampus of AD transgenic mice. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e678, 2013. ISSN 2041-4889. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23788035>>.

RUSSELAKIS-CARNEIRO, M.; BETMOUNI, S.; PERRY, V. H. Inflammatory response and retinal ganglion cell degeneration following intraocular injection of ME7. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 25, n. 3, p. 196-206, Jun 1999. ISSN 0305-1846. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417661>>.

SAHAY, A. et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. **Nature**, v. 472, n. 7344, p. 466-70, Apr 2011. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460835> >.

SAKAGUCHI, S. et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. **Nature**, v. 380, n. 6574, p. 528-31, Apr 11 1996. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8606772 >.

SAMAIA, H. B.; BRENTANI, R. R. Can loss-of-function prion-related diseases exist? **Mol Psychiatry**, v. 3, n. 3, p. 196-7, May 1998. ISSN 1359-4184 (Print) 1359-4184 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9672888 >.

SAMAIA, H. B. et al. A prion-linked psychiatric disorder. **Nature**, v. 390, n. 6657, p. 241, Nov 20 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9384372 >.

SAMAKASHVILI, S. et al. Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease. **Electrophoresis**, v. 32, n. 19, p. 2757-64, Oct 2011. ISSN 1522-2683. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983823> >.

SAMPEDRO-PIQUERO, P. et al. Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 114, p. 16-25, Oct 2014. ISSN 1095-9564. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727294> >.

SCHIPPER, H. M. et al. Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Neurobiol Aging**, v. 27, n. 2, p. 252-61, Feb 2006. ISSN 0197-4580. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16399210> >.

SCHMIDT, B.; MARRONE, D. F.; MARKUS, E. J. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 1, p. 56-65, Jan 2012. ISSN 1872-7549. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907247> >.

SCHMITZ, C. Variation of fractionator estimates and its prediction. **Anat Embryol (Berl)**, v. 198, n. 5, p. 371-97, Nov 1998. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9801058 >.

SCHMITZ, C.; HOF, P. R. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. **J Chem Neuroanat**, v. 20, n. 1, p. 93-114, Oct 2000. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11074347 >.

_____. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, v. 130, n. 4, p. 813-31, 2005. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15652981 >.

SCULLY, D. et al. Regional dissociation of paradigm-specific synapse remodeling during memory consolidation in the adult rat dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 209, p. 74-83, May 2012. ISSN 1873-7544. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285310> >.

SHMERLING, D. et al. Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 203-14, Apr 17 1998. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9568713 >.

SHU, S.; JU, G.; FAN, L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neurosci Lett** v. 85, p. 169-171, 1988.

SKALICKY, M.; BUBNA-LITTITZ, H.; VIIDIK, A. Influence of physical exercise on aging rats: I. Life-long exercise preserves patterns of spontaneous activity. **Mech Ageing Dev**, v. 87, n. 2, p. 127-39, Jun 7 1996. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8783195 >.

SLOMIANKA, L.; WEST, M. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience** v. 136, p. 757-767, 2005.

SLOMIANKA, L.; WEST, M. J. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience**, v. 136, n. 3, p. 757-67, 2005. ISSN 0306-4522. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16344149> >.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010. ISSN 1432-0533. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20012068> >.

SPIRDUSO, W. W.; FARRAR, R. P. Effects of aerobic training on reactive capacity: an animal model. **J Gerontol**, v. 36, n. 6, p. 654-62, Nov 1981. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7299080 >.

SUTOO, D.; AKIYAMA, K. Regulation of brain function by exercise. **Neurobiol Dis**, v. 13, n. 1, p. 1-14, Jun 2003. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12758062 >.

THOMANN, P. A. et al. Hippocampal morphology and autobiographic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 9, n. 4, p. 507-15, May 2012. ISSN 1875-5828. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372439> >.

TORRES, J. B. et al. NADPH-diaphorase histochemical changes in the hippocampus, cerebellum and striatum are correlated with different modalities of exercise and watermaze performances. **Exp Brain Res**, v. 175, n. 2, p. 292-304, Nov 2006. ISSN 0014-4819 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16763833 >.

TURNER, D. A. et al. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. **Prog Neurobiol**, v. 55, n. 6, p. 537-62, Aug 1998. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9670217 >.

VALE, F. D. A. C. D. et al. **Tratamento da doença de Alzheimer**. *Dement Neuropsychol*. 5: 34-48 p. 2011.

VALERO, J. et al. Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APP(Sw,Ind) transgenic mice. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e16832, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21347380> >.

VAN GROEN, T.; MIETTINEN, P.; KADISH, I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 13, n. 1, p. 133-49, 2003. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12625464 >.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999. ISSN 1097-6256. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195220> >.

VAN PRAAG, H. et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neurosci**, v. 25, n. 38, p. 8680-5, Sep 21 2005. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16177036 >.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 19, n. 4, p. 283-95, Dec 2005. ISSN 1545-9683. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263961> >.

VIANA, L. C. et al. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. **Neuroscience**, v. 238, p. 280-96, May 2013. ISSN 1873-7544. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454543> >.

VIOLA, G. G. et al. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. **Brain Res**, v. 1274, p. 47-54, Jun 2009. ISSN 1872-6240. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374889> >.

VOLKERS, K. M.; SCHERDER, E. J. Impoverished environment, cognition, aging and dementia. **Rev Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 259-66, 2011. ISSN 0334-1763 (Print)

0334-1763 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21591910> >.

VUKOVIC, J. et al. Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches. **Neurochem Int**, v. 59, n. 3, p. 341-6, Sep 2011. ISSN 1872-9754. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699941> >.

WEISSMANN, C. Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. **J Biol Chem**, v. 274, n. 1, p. 3-6, Jan 1 1999. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9867802 >.

WEST, M. J. Design-based stereological methods for counting neurons. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 43-51, 2002. ISSN 0079-6123. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12143362> >.

WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H. J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat Rec**, v. 231, n. 4, p. 482-97, Dec 1991. ISSN 0003-276X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1793176> >.

WICK, G. et al. Diseases of aging. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1567-83, Feb 25 2000. Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10689131 >.

WILLIAMSON, L. L.; CHAO, A.; BILBO, S. D. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 3, p. 500-10, Mar 2012. ISSN 1090-2139. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281279> >.

WITTER, M. P. et al. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. **Prog Neurobiol**, v. 33, n. 3, p. 161-253, 1989. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2682783> >.

WONG, B. S. et al. Induction of HO-1 and NOS in doppel-expressing mice devoid of PrP: implications for doppel function. **Mol Cell Neurosci**, v. 17, n. 4, p. 768-75, Apr 2001. ISSN 1044-7431 (Print) 1044-7431 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11312611 >.

_____. Prion disease: A loss of antioxidant function? **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275, n. 2, p. 249-52, Aug 28 2000. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10964653 >.

WONG, N. K. et al. Glycosylation of prions and its effects on protein conformation relevant to amino acid mutations. **J Mol Graph Model**, v. 18, n. 2, p. 126-34, 163-5, Apr 2000. ISSN 1093-3263 (Print)

1093-3263 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10994516 >.

WOO, K. Is vitamin E the magic bullet for the treatment of Alzheimer's disease (AD)? **Perspectives**, v. 24, n. 1, p. 7-10, Spring 2000. Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12026332 >.

WYSS-CORAY, T. et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. **Nat Med**, v. 9, n. 4, p. 453-7, Apr 2003. ISSN 1078-8956. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612547> >.

XIAO, Q. et al. Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates A β clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. **J Neurosci**, v. 34, n. 29, p. 9607-20, Jul 2014. ISSN 1529-2401. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25031402> >.

YOSHIKE, Y. et al. GABA(A) receptor-mediated acceleration of aging-associated memory decline in APP/PS1 mice and its pharmacological treatment by picrotoxin. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. e3029, 2008. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18716656> >.

YOUNG, D. et al. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nat Med**, v. 5, n. 4, p. 448-53, Apr 1999. ISSN 1078-8956. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10202938> >.

ZANATA, S. M. et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J**, v. 21, n. 13, p. 3307-16, Jul 1 2002. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12093732 >.

ZHU, H.; DAHLSTRÖM, A. Glial fibrillary acidic protein-expressing cells in the neurogenic regions in normal and injured adult brains. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 12, p. 2783-92, Sep 2007. ISSN 0360-4012. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17394257> >.

ANEXO 1

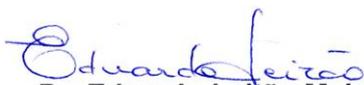


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**TERMO DE APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado **“Doenças Neurodegenerativas Crônicas na Amazônia Brasileira: o impacto da infecção e da inatividade sobre o curso temporal das demências”**, protocolo nº **1701/05** sob a responsabilidade dos pesquisadores *Benedito Paulo Bezerra e Pedro Fernando da Costa Vasconcelos* e coordenação do *Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz*, obtendo APROVAÇÃO na reunião do dia 12/09/2005, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 12 de setembro de 2005


Dr. Eduardo Leitão Maia

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HUJBB/UFPA

ANEXO 2

Tabela dos resultados estereológicos para a camada polimórfica do giro dentado e seus respectivos coeficientes de erro.

	NBH SE1	NBH SE2	NBH SE5	NBH EE2	NBH EE4	NBH EE6	ME7 SE1	ME7 SE3	ME7 SE5	ME7 SE6	ME7 EE1	ME7 EE6	ME7 EE 8
NUMERO DE SECCÕES	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3
NUMERO DE CAIXAS DE CONTAGEM	41	47	45	71	68	68	100	62	70	60	68	94	79
ESPESSURA PONDERADA DA SECCÃO	22.0	13.8	19.6	14.0	22.3	22.4	15	21	17.9	19.1	20.0	19.1	15.0
NUMERO TOTAL DE OBJETOS CONTADOS	148	281	172	443	245	252	227	130	144	146	258	309	241
POPULAÇÃO TOTAL ESTIMADA*	4487	4045	3204	5889	5013	5871	5565	5853	5118	4832	5441	6877	5294
COEFICIENTE DE ERRO (Scheaffer)	0.10	0.087	0.111	0.072	0.083	0.087	0.064	0.083	0.083	0.077	0.075	0.054	0.071
MEDIA*	6765.30			7753.39			6897.79				5870.76		
D.P.*	1669.8			2136.8			2389.1				874.6		
CV²=(D.P./Média)²	0.061			0.076			0.120				0.022		
CE²	0.004			0.005			0.004				0.005		
CE²/CV²	0.065			0.060			0.032				0.238		
CVB²	0.057			0.071			0.116				0.017		
CVB² (% of CV²)	93.485			93.972			96.770				76.154		

Tabela dos resultados estereológicos para o estrato radiato de CA3 e seus respectivos coeficientes de erro.

	NBH SE1	NBH SE2	NBH SE5	NBH EE2	NBH EE4	NBH EE6	ME7 SE1	ME7 SE3	ME7 SE5	ME7 SE6	ME7 EE1	ME7 EE6	ME7 EE8	ME7 EE9
NUMERO DE SECCÖES	4	4	3	3	4	3	4	3	4	3	3	3	3	3
NUMERO DE CAIXAS DE CONTAGEM	136	90	69	93	150	86	122	109	105	91	112	117	115	114
ESPESSURA PONDERADA DA SECCÖO	15.1	13.5	13.8	13.0	14.2	16.2	14.4	14.4	14.2	13.6	13.8	15.7	13.4	13.4
NUMERO TOTAL DE OBJETOS CONTADOS	492	388	249	288	452	232	210	334	246	318	501	290	337	473
POPULAÇÖO TOTAL ESTIMADA*	6630	8499	5168	5879	10080	7300	6441	9821	4033	7296	10420	9802	8935	10616
COEFICIENTE DE ERRO (Scheaffer)	0.05	0.066	0.068	0.070	0.056	0.077	0.062	0.060	0.067	0.060	0.056	0.066	0.058	0.058
MEDIA*	6765.30			7753.39			6897.79				5870.76			
D.P.*	1669.8			2136.8			2389.1				874.6			
CV²=(D.P./Média)²	0.061			0.076			0.120				0.022			
CE²	0.004			0.005			0.004				0.005			
CE²/CV²	0.065			0.060			0.032				0.238			
CVB²	0.057			0.071			0.116				0.017			
CVB² (% of CV²)	93.485			93.972			96.770				76.154			