



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

CÉSAR AUGUSTO RAIOL FÔRO

**INFLUÊNCIAS DO AMBIENTE E DA IDADE SOBRE A
COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS DO GIRO
DENTEADO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS ALBINOS**

Orientador: Prof. Dr. Cristovam W. Picanço Diniz.

Coorientadora: Profa. Dra. Marcia Consentino Kronka Sosthenes.

BELÉM – PARÁ

2015

CÉSAR AUGUSTO RAIOL FÔRO

**INFLUÊNCIAS DO AMBIENTE E DA IDADE SOBRE A
COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS DO GIRO
DENTEADO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS ALBINOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Cristovam W. Picanço Diniz.

Coorientadora: Profa. Dra. Marcia Consentino Kronka Sosthenes.

BELÉM – PARÁ

2015

**INFLUÊNCIAS DO AMBIENTE E DA IDADE SOBRE A
COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS DO GIRO
DENTEADO DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS ALBINOS**

CÉSAR AUGUSTO RAIOL FÔRO

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

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz/UFPA

Dr. (a) José Antônio Pinaço Diniz/IEC

Dr. (a) Roseane Borner de Oliveira/UFPA

AGRADECIMENTO

A Deus por todas as oportunidades.

Agradeço grandemente a todos meus familiares, ao meu pai Expedito, minha mãe Geralda, a minha irmã Jéssica, ao meu irmão Felipe e ao meu primo Arisson e sua mãe Carmem e aos meus primos e tias que os amo muito, que sempre me deram todo apoio e segurança quando precisei.

A Rafaela, minha querida namorada e futura esposa.

Ao meu orientador Professor Doutor Cristovam Wanderley Picanço Diniz, pela sua constante presença e cuidado em meu trabalho. E a minha coorientadora Professora Doutora Márcia Consentino Kronka Sosthenes, pela paciência e atenção.

De modo especial aos amigos Marcus de Oliveira, MSc e Camila Lima, MSc, sem o auxílio dos quais este trabalho não estaria concluído; ao Dr. Daniel Diniz, que sempre me apoiou de forma excepcional e ao Dr. Carlos Santos, que sempre me aconselhou. Sou muito agradecido pelas constantes contribuições inesperáveis que obtive no Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção.

E aos demais amigos e amigas que me ajudaram de forma direta e indiretamente.

Muito obrigado!

Sumário

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. PLASTICIDADE CEREBRAL E AMBIENTE.....	03
1.2. ASTRÓCITOS, PLASTICIDADE SINÁPTICA, ENVELHECIMENTO E DECLÍNIO COGNITIVO.....	04
2. OBJETIVOS.....	06
2.1. GERAL.....	06
2.2. ESPECÍFICOS.....	06
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	07
3.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	07
3.2. PERFUSÃO E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	07
3.3. RECONSTRUÇÃO MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA DOS ASTRÓCITOS EM 3D.....	08
3.4. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E ESTATÍSTICAS.....	09
4. RESULTADOS.....	16
4.1. ANÁLISE LAMINAR DA MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS.....	16
4.2. INFLUÊNCIAS AMBIENTAIS E DO ENVELHECIMENTO NA COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS DO GD.....	26
4.3. DESEMPENHO NO TESTE DE MEMÓRIA SEMELHANTE À EPISÓDICA.....	32
5. DISCUSSÃO.....	33
5.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS E AMOSTRAGEM ESTEREOLÓGICA SEM VIÉS.....	33
5.2. COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS E DESEMPENHO NOS TESTES DE MEMÓRIA EPISÓDICA.....	34
5.3. POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS DO AUMENTO NA COMPLEXIDADE DE ASTRÓCITOS.....	36
5.4. DECLÍNIO COGNITIVO NO ENVELHECIMENTO, EMPOBRECIMENTO AMBIENTAL E COMPLEXIDADE DOS ASTRÓCITOS.....	37
5.5. LIMITAÇÕES DO PROJETO EXPERIMENTAL E ABORDAGENS TÉCNICAS.....	37
6. CONCLUSÃO.....	40
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	41
ANEXO I: TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	54
ANEXO II: ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO NO DIA 28 DE MAIO DE 2015 NO EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE	55

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 - Fotomicrografia de secção em baixo aumento do giro dentado de camundongo, imunomarcada com o anticorpo anti-GFAP.....	10
FIGURA 2 – Explicação de alguns parâmetros morfológicos de um astrócito reconstruído.....	15
FIGURA 3 - Análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada granular do GD do grupo JAE.....	17
FIGURA 4 - Análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada granular do GD do grupo JAP.....	18
FIGURA 5 - Análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada granular do GD do grupo VAE.....	19
FIGURA 6 - Análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada polimórfica do GD do grupo JAE.....	20
FIGURA 7 - Análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada polimórfica do GD do grupo JAP.....	21
FIGURA 8 - Análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada polimórfica do GD do grupo VAE.....	22
FIGURA 9 - A análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada molecular do GD do grupo JAE.....	23
FIGURA 10 - A análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada molecular do GD do grupo JAP.....	24
FIGURA 11 - A análise de <i>Cluster</i> (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada molecular do GD do grupo VAE.....	25
FIGURA 12 - Representações gráficas da morfometria em 3D dos astrócitos da camada granular do GD de camundongos adultos jovens dos ambientes empobrecido (JAP) e enriquecido (JAE) e de camundongos envelhecidos do ambiente enriquecido (VAE).....	29
FIGURA 13 - Representações gráficas da morfometria em 3D dos astrócitos da camada polimórfica do GD de camundongos adultos jovens dos ambientes empobrecido (JAP) e enriquecido (JAE) e de camundongos envelhecidos do ambiente enriquecido (VAE).....	30
FIGURA 14 - Representações gráficas da morfometria em 3D dos astrócitos da camada molecular do GD de camundongos adultos jovens dos ambientes empobrecido (JAP) e enriquecido (JAE) e de camundongos envelhecidos do ambiente enriquecido (VAE).....	31
FIGURA 15 - Representação gráfica dos resultados dos testes integrados de reconhecimento de objeto.....	32
TABELA 1 - Definições dos parâmetros morfológicos utilizados para quantificar os aspectos morfológicos dos astrócitos.....	12
TABELA 2 - Diferenças morfológicas entre astrócitos reconstruídos em 3D das camadas granular, molecular e polimórfica do giro dentado.....	26
TABELA 3 - Influências do ambiente e da idade sobre as características morfológicas dos astrócitos da camada granular, polimórfica e molecular do giro dentado. Camundongos adultos jovens do ambiente empobrecido = JAP ou do ambiente enriquecido (JAE); Camundongos idosos do ambiente enriquecido = VAE.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE

AE: AMBIENTE ENRIQUECIDO

AP: AMBIENTE EMPOBRECIDO (PADRÃO)

AMPA: ÁCIDO α -AMINO-3-HIDROXI-5-METIL-4-ISOXAZOL PROPIÔNICO

ANOVA: ANÁLISE DE VARIÂNCIA

ATP: TRIFOSFATO DE ADENOSINA

CA: CORNO DE AMON

DAB: DIAMINOBENZIDINA

DF: DISTÂNCIA FOCAL

DP: DESVIO PADRÃO

E.P: ERRO PADRÃO

GD: GIRO DENTEADO

GFAP: PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL

IL: INTERLEUCINA

JAE: JOVENS ADULTOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO

JAP: JOVENS ADULTOS DO AMBIENTE EMPOBRECIDO

LTP: POTENCIAL DE LONGA DURAÇÃO

M: MOL

NA: NÚMERO DE ABERTURA

NMDA: N-METIL-D-ASPARTATO

pH: POTENCIAL HIDROGENIÔNICO

PBS: SALINA TAMPONADA COM FOSFATO

SNC: SISTEMA NERVOSO CENTRAL

TBST: SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA COM TRIS TWEEN

TNF: FATOR DE NECROSE TUMORAL

VAE: ADULTOS ENVELHECIDOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO

VAP: ADULTOS ENVELHECIDOS DO AMBIENTE EMPOBRECIDO

RESUMO

Durante nosso estudo anterior (Diniz *et al.*, 2010), os camundongos (*Mus musculus*) mantidos em ambiente empobrecido desde o desmame, mimetizando um estilo de vida sedentário, tem um desempenho pior em testes de memória espacial no labirinto aquático de Morris e não distinguem entre objetos antigos e recentes, e entre objetos deslocados e estacionários nos testes de memória semelhante à episódica. Contrastando com esses desempenhos os camundongos mantidos em gaiolas enriquecidas por igual período, preservam essas habilidades estando os resultados comportamentais associados à variação do número de astrócitos em função da camada. Usando as mesmas séries de seções anatômicas imunomarcadas seletivamente para proteína ácida fibrilar glial do estudo anterior, testamos a hipótese de que o empobrecimento ambiental reduziria a complexidade morfológica dos astrócitos e que essa redução estaria associada ao declínio nos testes de memória semelhante à episódica. Para isso utilizou-se microscopia óptica tridimensional empregando amostragem sistemática e aleatória sem viés para selecionar os astrócitos das camadas polimórfica, granular e molecular do giro denteado (GD). Testes de aglomerados e análises discriminantes das reconstruções morfométricas tridimensionais dos astrócitos de cada camada e grupo experimental revelaram dois principais fenótipos morfológicos. Em comparação ao tipo II, detectamos que os astrócitos do tipo I são mais complexos, revelaram maior volume de seus ramos, maior número de segmentos e vértices. A análise integrada com os achados comportamentais anteriores dos mesmos sujeitos revelou que as reduções da complexidade morfológica encontrada em camundongos jovens de ambiente empobrecido e camundongos envelhecidos do ambiente enriquecido, foram observadas em ambos os tipos de astrócitos das camadas giro denteado. Tomados em conjunto nossos dados sugerem que os efeitos em longo prazo do empobrecimento ambiental e do envelhecimento sobre a morfologia dos astrócitos podem contribuir pelo menos em parte para as alterações dos circuitos subjacentes ao declínio de cognitivo observado.

Palavras-chave: Ambiente, envelhecimento, plasticidade cerebral, morfologia dos astrócitos e giro denteado.

ABSTRACT

During our previous study (Diniz *et al.*, 2010), mice (*Mus musculus*) maintained in an impoverished environment that mimicked a sedentary lifestyle from weaning generally performed worse on spatial memory tasks (the Morris water maze) and did not distinguish between old and recent or between displaced and stationary objects in episodic-like memory tests. In contrast, mice maintained in enriched cages for equal time preserved those abilities. These behavioral outcomes were associated with layer-dependent, numerical astrocytic changes. Using the same serial anatomical sections selectively immunolabeled for glial fibrillary acid protein from the previous study, we tested the hypothesis that environmental impoverishment would reduce the morphological complexity of astrocytes, and that such changes would be associated with learning and memory decline. We used three-dimensional microscopic reconstructions and unbiased systematic and random sampling approaches to select astrocytes from the polymorphic, granular, and molecular layers of the dentate gyrus. Cluster and discriminant analysis of three-dimensional astrocytic morphometric features from each layer and experimental group revealed two main morphological phenotypes. Type I astrocytes were more complex than type II; they exhibited larger tree areas, larger tree volumes, more segments, and more vertices. Integrated analysis with previous behavioral findings from the same animals revealed that the reductions in morphological complexity observed in young mice from impoverished and aged mice from enriched environments were observed in both astrocyte types in all layers of the dentate gyrus. We suggest that long-term environmental impoverishment and aging effects on astrocyte plasticity may represent at least part of the circuitry changes underlying learning and memory decline.

Key words: Environment, aging, brain plasticity, astrocytes morphology and dentate gyrus.

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm relacionado a atividade física e cognitiva a um alto risco de declínio cognitivo associado a idade (Erickson *et al.*, 2012; Tyndall *et al.*, 2013). Nesse contexto, um estilo de vida ativo pode ajudar a prevenir tais déficits (Small *et al.*, 2012; Pedrero-Chamizo *et al.*, 2013; Fernández-Mayoralas *et al.*, 2015); para conteúdos recentes veja (Mangialasche *et al.*, 2012; Stranahan & Mattson, 2012; Lovden *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). Coerentemente com essa idéia, o declínio cognitivo observado durante o envelhecimento normal ou patológico parece ser agravado após a institucionalização (Volkers & Scherder, 2011; Zalik & Zalar, 2013). A institucionalização está associada ao que se pode chamar de empobrecimento do ambiente, caracterizado pela redução da estimulação cognitiva e sensório-motora, redução de interações sociais e de atividade física contribuindo para um estilo de vida sedentário (Volkers & Scherder, 2011; Pedrero-Chamizo *et al.*, 2013; Maseda *et al.*, 2014; Fernández-Mayoralas *et al.*, 2015).

Do mesmo modo, tem sido demonstrado em comparação aos indivíduos pareados por idade e mantidos em gaiolas empobrecidas convencionais de laboratório que camundongos e ratos idosos vivendo em ambiente enriquecido tem melhor desempenho nas tarefas de aprendizagem e memória (Winocur, 1998; Teather & Wurtman, 2005; 2006; Gregory & Szumlinski, 2008; Bell *et al.*, 2009; Diniz *et al.*, 2010a; Kumar *et al.*, 2012; Speisman *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013; Speisman *et al.*, 2013a; Speisman *et al.*, 2013b).

A análise celular e molecular destes eventos demonstram que, os efeitos benéficos do enriquecimento ambiental com exercício voluntário, estão associados a uma variedade de alterações neuronais e neuroimunológicas tanto em indivíduos jovens quanto idosos (Kempermann *et al.*, 1997; van Praag *et al.*, 2005; Kobilko *et al.*, 2011; Leger *et al.*, 2012; Speisman *et al.*, 2013a; Bureš *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2014; Hosseiny *et al.*, 2014; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014a; Suzuki *et al.*, 2014; Vallès *et al.*, 2014).

No entanto, muitos dos detalhes conhecidos sobre as alterações celulares e moleculares no giro dentado associados às alterações ambientais, provém do domínio neuronal (Merkley *et al.*, 2014; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2014; Bergami *et al.*, 2015; Donato *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015). De fato, poucos trabalhos foram dedicados a descrever mudanças numéricas gliais em correlação a aprendizagem, memória e declínio cognitivo associados ao envelhecimento (Soffie *et al.*, 1999; Diniz *et al.*, 2010a; Kohman *et al.*, 2011; Diniz *et al.*, 2012; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014b). Sobre a morfologia dos astrócitos, ainda menos se sabe sobre

as influências do ambiente ou idade, utilizando método de amostragem estereológica sem viés e reconstrução tridimensional (Geinisman *et al.*, 1978; Gómez-Pinilla *et al.*, 1997; Gómez-Pinilla *et al.*, 1998; Ehninger & Kempermann, 2003; Argandoña *et al.*, 2009; Diniz *et al.*, 2010a; Diniz *et al.*, 2010b; Jinno, 2011). Assim, decidimos investigar em detalhes as influências ambientais e do envelhecimento sobre a morfologia dos astrócitos do giro dentado das camadas molecular, granular e polimórfica, usando reconstrução tridimensional microscópica e amostragem estereológica imparcial.

Reforçando nossa escolha pela investigação morfológica dos astrócitos, estudos recentes mostraram que quando células progenitoras astrogliais humanas são transplantadas para cérebros de roedores (Han *et al.*, 2013), camundongos com células humanas transplantadas mostraram melhor potenciação de longa duração (LTP) e aprendizagem. Nesses camundongos quiméricos, grandes regiões do SNC, incluindo o hipocampo, consistem de neurônios de camundongos (e oligodendrócitos), cercados por astrócitos e células progenitoras humanas (Windrem *et al.*, 2008). Esses autores testaram tanto os camundongos transplantados quanto animais controles com uma bateria de tarefas de aprendizagem e memória, e descobriram que os camundongos quiméricos mostram melhor desempenho em todos os testes. Essas descobertas sugerem que os astrócitos humanos podem, pelo menos em parte, contribuir de forma significativa para os processos que fazem a cognição humana superiores à cognição do camundongo (Franklin & Bussey, 2013; Zhang & Barres, 2013). Coincidentemente, os astrócitos humanos são maiores e estruturalmente mais complexo do que os astrócitos de camundongos (Oberheim *et al.*, 2006). Em comparação aos camundongos, os astrócitos humanos tinham um soma (corpo celular) com diâmetro de 2,6 milímetros mais longo, 10 vezes mais processos-GFAP-positivos e ondas de cálcio 4 vezes mais rápidas (Oberheim *et al.*, 2009).

Tomados em conjunto, esses achados levantam questões importantes relacionadas à morfologia dos astrócitos e cognição. Por exemplo, poderia a morfologia astrogliar mais complexa do giro dentado, estar associada a melhores desempenhos em tarefas de reconhecimento de objeto? Se assim for, essas correlações morfológicas e comportamentais se aplicam a todas as camadas do giro dentado ou são restritas a uma ou outra camada?

1.1. PLASTICIDADE CEREBRAL E AMBIENTE

Embora os estudos de plasticidade associados aos efeitos ambientais demonstrem uma morfologia neuronal alterada, foi igualmente descrito que intensas mudanças morfológicas também acontecem em células gliais (Sirevaag e Greenough, 1987, Komitova *et al.*, 2002). Os astrócitos são as células gliais mais numerosas do hipocampo de camundongos e a eles tem se associado a uma variedade de papéis funcionais contribuindo para a formação, adaptação, e operação dos circuitos neurais. Em uma única frase, os astrócitos permitem que os neurônios funcionem fornecendo energia e substratos para a neurotransmissão contribuindo diretamente para a formação e modulação das sinapses através de mecanismo bidirecional de comunicação com os neurônios (Allen e Barres, 2009). Além disso, contribuem para o controle do fluxo sanguíneo cerebral, para constituição da barreira hemato-encefálica e para a resposta imune aos agentes agressores (Wang e Bordey, 2008).

Durante o envelhecimento, entretanto os astrócitos sofrem mudanças e vários estudos revelaram aumento do número deles e da microglia (Pilegaard e Ladefoged, 1996, Long *et al.*, 1998, Mouton *et al.*, 2002).

Estudos integrados envolvendo envelhecimento, ambiente e mudanças gliais tornaram-se mais frequentes porque os astrócitos são implicados em vários processos de regulação hipocampal local que afetam aprendizagem e memória (Junjaud *et al.*, 2006, Magistretti, 2006, Mothet *et al.*, 2006, Todd *et al.*, 2006, Perea e Araque, 2007). Por exemplo, no hipocampo de ratos envelhecidos que cresceram em ambiente enriquecido foi previamente descrito que, na fase de envelhecimento, os astrócitos hipocampais eram menores em tamanho e em número quando comparados aos dos animais que cresceram em ambiente padrão (Soffie *et al.*, 1999). Por outro, lado os astrócitos de CA1 do camundongo adulto alojado em gaiolas enriquecidas apresentaram-se em número, semelhante aos de animais alojados em gaiola padrão com a diferença de que os astrócitos do ambiente enriquecido se apresentaram com ramificações mais numerosas e longas (Viola *et al.*, 2009). Entretanto, outros autores não encontraram correlações de longo prazo entre plasticidade astrocitária e ambiente sugerindo a hipótese de que os astrócitos podem exibir respostas transitórias associadas à história de stress de cada rato, em vez de respostas adaptativas de longo prazo como consequência dos ambientes complexos das gaiolas enriquecidas (Sirevaag e Greenough, 1991).

1.2. ASTRÓCITOS, PLASTICIDADE SINÁPTICA, ENVELHECIMENTO E DECLÍNIO COGNITIVO

Mais recentemente emergiu o conceito de redes astrogliais para comunicação a longa distância associando os astrócitos às redes de conexão organizadas que permitem a troca de informações reguladas por sinais intra e extracelulares, através de canais que atravessam junções em fenda (do inglês “gap junctions”). Essa comunicação a longa distância entre células da glia modulando a atividade sináptica neuronal e contribuindo diretamente para a plasticidade sináptica adicionou nova dimensão de complexidade a análise das funções cerebrais (Giaume *et al.*, 2010). Como referido anteriormente, os astrócitos participam do controle da excitabilidade neuronal e transmissão sináptica através da liberação de moléculas neuroativas, como glutamato, a D-serina e o ATP (Halassa *et al.*, 2007, Lee e Haydon, 2007) e outros gliotransmissores como a taurina e o TNF- α (Panatier, A. *et al.* 2006). Além disso, realizam recaptação do glutamato, regulando os níveis do neurotransmissor (Lee e Haydon, 2007). E ainda, os astrócitos, também secretam fatores solúveis como trombospondinas e colesterol, que influenciam a formação das espinhas dendríticas e maturação sináptica (Ullian, Christopherson e Barres, 2004, Christopherson *et al.*, 2005). Importante lembrar do ponto de vista quantitativo que no hipocampo, mais de 50% das sinapses excitatórias são associadas, em graus variados, com processos astrocíticos; um único astrócito pode estar relacionado a aproximadamente 100.000 contatos sinápticos, sugerindo sua participação na dinâmica das sinapses e das redes neuronais (Ventura e Harris, 1999, Bushong *et al.*, 2002).

Em 1991 se descreveu pela primeira vez a influência da potenciação de longo prazo induzida por estimulação repetida e de alta frequência da via perfurante sobre a distribuição espacial dos processos astrocíticos na neurópila da camada molecular do giro denteado que continha as sinapses potenciadas. Foram encontradas mudanças significativas na ramificação dos processos astrocíticos tanto quanto na sua relação topográfica com os complexos sinápticos (Wenzel *et al.*, 1991). Mais recentemente demonstrou-se a presença, em astrócitos da camada molecular do giro denteado, de potencial de longa duração semelhante à potenciação de longo prazo neuronal, sucedendo à estimulação de alta frequência da via perfurante (Zhang, Zhang e Chen, 2009) confirmando-se que esse processo era dependente da exocitose de glutamato (Jourdain *et al.*, 2007).

De maneira resumida: os astrócitos permitem que os neurônios funcionem fornecendo energia e substratos para a neurotransmissão contribuindo diretamente para a formação e modulação das sinapses através de mecanismo bidirecional de comunicação entre eles (Allen e Barres, 2009).

Conversamente os astrócitos parecem se alterar com o envelhecimento em forma, número, distribuição laminar (Diniz, 2010, Almeida *et al.*, 2011, Diniz *et al.*, 2011) e perfil imunológico (Godbout e Johnson, 2009, Jinno, 2011, Salminen *et al.*, 2011) e essas alterações parecem estar relacionadas com o declínio cognitivo associado à neuroinflamação que acompanha a senescência (Albayram *et al.*, 2011).

Qualquer que seja a idade, animais da mesma variedade genética exibem disfunções cognitivas hipocampais semelhantes depois de viverem em ambientes empobrecidos, apresentando déficits de aprendizado e memória espacial (Teather *et al.*, 2002, Teather e Wurtman, 2005, 2006, Iso, Simoda e Matsuyama, 2007). Entretanto, estudos recentes em camundongos de mesma variedade demonstraram que mecanismos moleculares associados ao declínio cognitivo durante o envelhecimento envolvem processos fisiológicos que não são replicados completamente em camundongos jovens (Han *et al.*, 2006, Ju *et al.*, 2006, Murphy *et al.*, 2006, Droge e Schipper, 2007). Esse conjunto de dados apontam para a ocorrência de muitas questões abertas associando ambiente, envelhecimento e outros fatores que impactam funções cognitivas, com distintos processos celulares e moleculares em variedades e idades diferentes de camundongos.

Nesta dissertação integramos nossa análise comportamental e estereológica anterior (Diniz, *et al.*, 2010) com os novos achados morfológicos dos mesmos grupos de camundongos para investigar essas questões.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Investigar o impacto do ambiente empobrecido e do envelhecimento sobre a plasticidade astrogliar no giro denteado do camundongo suíço albino fêmea.

2.2. ESPECÍFICOS

Em fêmeas de camundongos adultos jovens ou envelhecidos da variedade suíça albina investigar o impacto do ambiente empobrecido e do envelhecimento:

1. Sobre a memória de objeto em teste para a memória semelhante à episódica, e
2. Sobre a morfologia dos astrócitos nas camadas molecular, granular e polimórfica do giro denteado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Setenta e um camundongos albinos suíços fêmeas, incluindo adultos jovens (6 meses) e idosos (20 meses), foram utilizados e manipulados segundo os "Principles of Laboratory Animal Care" (National Institutes of Health) nas instalações do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário "João de Barros Barreto" da Universidade Federal do Pará. Os animais foram alojados desde o desmame em condições enriquecidas (AE, n=42) ou em condições de empobrecimento (AP, n=29). Estes formaram então, 4 grupos experimentais: ambiente enriquecido, adultos jovens, (JAE, n = 12), ambiente empobrecido, adultos jovens (JAP, n = 13), ambiente enriquecido, adultos idosos (VAE, n = 30), e, ambiente empobrecido, com adultos idosos (VAP, n = 16).

As condições enriquecidas impostas eram compostas de 2 níveis nas gaiolas de arame (100×50×100cm), equipadas com cordas, pontes com hastes, túneis, rodas de correr e brinquedos. Os brinquedos eram feitos de diferentes formas, de plástico, de madeira, de metal e de cores diferentes, e eram trocados periodicamente (a cada duas semanas). Cada gaiola do AE alojava de 12 a 15 camundongos jovens ou idosos. Água e alimentos eram fornecidos nos níveis superior e inferior respectivamente. Assim, esses camundongos eram obrigados a se deslocar de um compartimento para outro para beber e se alimentar. As gaiolas de condições de empobrecimento ambiental eram compostas de plástico (32 × 39 × 100 centímetros), sem equipamentos ou brinquedos. Cada gaiola AP alojava de 12 a 13 camundongos jovens ou idosos. Todos os animais tinham livre acesso a água e comida. Além disso, os animais foram mantidos no ciclo claro e escuro de 12h. Os testes comportamentais foram realizados durante o ciclo claro.

3.2. PERFUSÃO E IMUNOHISTOQUÍMICA

No final dos testes comportamentais, 5 a 9 indivíduos de cada grupo experimental foram pesados e sacrificados com uma overdose de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) (Konig Laboratories©). Eles foram em seguida perfundidos transcárdialmente com solução salina heparinizada durante 10 min, seguido por uma fixação de aldeído (4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 - 7,4) durante 30 min. Todos os demais produtos químicos foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich© Brasil (São Paulo, Brasil).

Após a perfusão e craniotomia, os cérebros foram removidos e cortados em um vibrátomo a espessuras de 70 µm. Uma em cada 5 seções foi utilizada para imunomarcá-la a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) por imunohistoquímica em flutuação livre. As seções foram lavadas uma vez em tampão de fosfato 0,1 M pH 7,2-7,4, e transferidas para o ácido bórico 0,2 M pH 9,0 e aquecidos nessa solução a 65-70 °C durante 1 h. Após o resfriamento a temperatura ambiente os cortes foram em seguida lavados 3 vezes, 5 minutos cada, em tampão TRIS-Salina-Triton a 5% (TBST) a 0,05M pH 7,0. As seções foram incubadas sob agitação constante em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1% em metanol durante 10 min, e lavadas duas vezes, 2 minutos cada, em tampão fosfato-salina a 0,1 M, pH 7,2 -7,4 (PBS). As seções foram então, bloqueadas com imunoglobulina durante 1 h, de acordo com as instruções do kit de imunomarcção (MOM kit, Vector Laboratories®, EUA). O bloqueio foi seguido por 3 lavagens, 2 minutos cada, em PBS. As seções foram incubadas numa solução de trabalho de concentrado de proteína por 5 min, em seguida, incubadas com anticorpo monoclonal anticorpo primário anti-GFAP (MAB360, Chemicon Int®, USA), diluído em solução de concentrado de proteína (kit MOM), a 4 °C durante 3 dias com agitação suave contínua. Em seguida, as seções foram lavadas 3 vezes, 2 minutos cada, com PBS e incubadas durante 20 h com o anticorpo secundário de cavalo anti-camundongo biotilado (kit MOM), diluído 1: 200 em PBS. Após 3 lavagens, 2 minutos cada, com PBS, os cortes foram transferidos para uma solução de complexo de avidina-biotina-peroxidase (ABC, Vector Laboratories®, USA, 1:200) durante 1,5 h, e posteriormente lavadas 3 vezes, 2 minutos cada, em PBS, e processada com o método de histoquímica de glicose oxidase-DAB-níquel e peroxidase (Shu, Ju, & Fan, 1988).

As reações eram interrompidas após os ramos finos das extremidades dos astrócitos serem detectados ao microscópio óptico. As seções foram lavadas 4 vezes, 5 minutos cada, em PBS, montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas em álcool e xileno, sendo recobertas com Entellan® (Merck®) e lamínulas. Cinco indivíduos de cada grupo com coleções completas de imunohistoquímica para GFAP, com astrócitos bem definidos em seus detalhes morfológicos, foram utilizados para a reconstrução tridimensional e análise morfométrica.

3.3. RECONSTRUÇÃO MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA DOS ASTRÓCITOS EM 3D

Selecionamos cinco encéfalos de cada grupo experimental para imunomarcção da GFAP e reconstrução tridimensional. Para analisar as seções do encéfalo, nós usamos microscópio NIKON Eclipse 80i (Nikon®, Japão), equipado com uma plataforma motorizada

(MAC6000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). Os astrócitos de diferentes camadas de interesse foram analisados utilizando lente objetiva de alta resolução de $100\times$ em óleo de imersão (Plan-Fluoride, Nikon, NA 1,3, DF = 0,19 μm). As imagens foram capturadas por câmera de vídeo e as reconstruções realizadas com o software Neurolucida, seguido do Neurolucida Explorer para extração numérica dos dados (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, USA). Embora o encolhimento no eixo do z não seja um evento linear, o software utilizado no presente estudo corrigiu o encolhimento no eixo z, com base em evidências anteriores de 75% de encolhimento (Carlo & Stevens, 2011). Sem a correção, essa retração iria distorcer significativamente as medidas de comprimento ao longo desse eixo. Apenas as células com processos gliais íntegros foram incluídas para análise 3D (células que estavam com seus ramos acidentalmente cortados ou não totalmente imunomarcadas não foram selecionadas para reconstrução).

3.4. ANÁLISES MORFOMÉTRICAS E ESTATÍSTICAS

Na análise morfométrica foram empregados 15 indivíduos, 5 de cada grupo experimental (JAP, n = 5; JAE, n = 5 e VAE, n = 5). Como apenas dois animais idosos do grupo empobrecido tiveram concluídas a sua imunomarcação para GFAP, removemos este grupo da análise morfométrica. Portanto, os astrócitos da análise morfológica foram limitados a JAP, JAE e VAE.

A partir destes três grupos, reconstruímos digitalmente em 3D, 688 astrócitos das camadas do giro dentado: 229 da polimórfica (JAE = 78, JAP = 78, VAE = 73), 230 da granular (JAE = 75, JAP = 77, VAE = 78) e 229 da molecular (JAE = 78, JAP = 72, VAE = 79). Os astrócitos foram selecionados de maneira imparcial, aleatória e sistematicamente em cada camada (Figura 1). Para definir os limites das camadas do giro dentado do hipocampo, usamos diferenças arquitetônicas na região da neurópila facilmente visíveis nas secções imunomarcadas. Amostras sistemáticas e aleatórias foram tomadas a partir de uma série de secções do giro dentado dorsal e ventral para garantir que todas as regiões tivessem a mesma probabilidade de serem incluídas nas amostras analisadas. Cada caixa com interseção com as camadas do giro dentado indica um sítio do qual foi selecionado apenas um astrócito para reconstrução tridimensional. (Figura 1). As células selecionadas foram reconstruídas a partir de secções do giro dentado, que incluíam todas as camadas e cujos limites podiam ser inequivocamente reconhecidos.

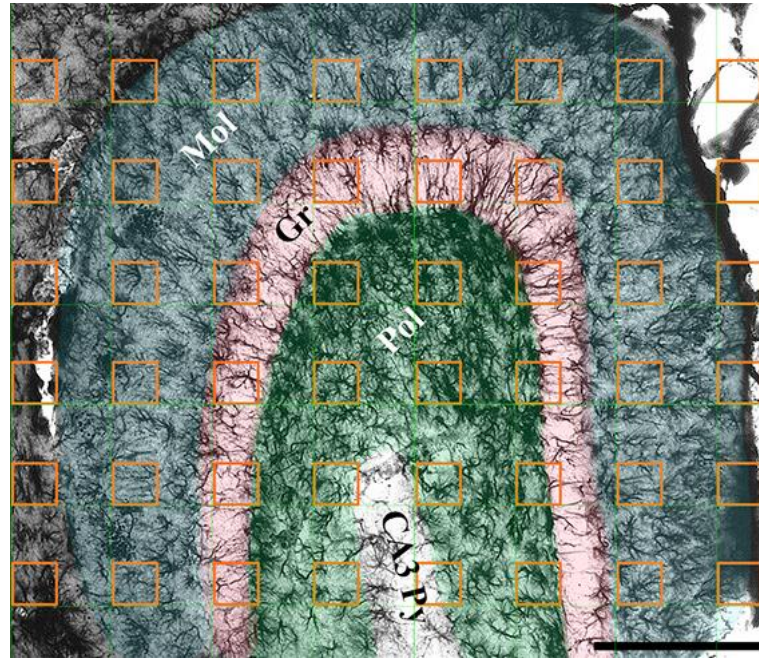


Figura 1: Fotomicrografia de baixo aumento do giro dentado de camundongos de uma secção imunomarcada com o anticorpo anti-GFAP para mostrar distribuição laminar dos astrócitos e definir as camadas e os limites do giro denteado. Note que a camada granular (Gr) facilmente mostra sua organização laminar indicando os limites com as camadas adjacentes molecular (Mol) e polimórfica (POL). Os limites da camada polimórfica do giro dentado com a camada piramidal de CA3 (CA3Py) são claramente visíveis, devido à redução da imunomarcagem para GFAP na camada piramidal. A grade definida por linhas retas verdes paralelas aos eixos X e Y estabelecem os intervalos entre as caixas quadradas em laranja, e ilustram o método de amostragem aleatória e sistemática. O número de caixas colocadas em cada secção é proporcional à área do giro denteado naquela secção e um único astrócito localizado no interior de cada caixa foi selecionado para a reconstrução tridimensional. 688 astrócitos 229 da polimórfica (JAE = 78, JAP = 78, VAE = 73), 230 da granular (JAE = 75, JAP = 77, VAE = 78) e 229 da molecular (JAE = 78, JAP = 72, VAE = 79) foram selecionados para a reconstrução tridimensional utilizando esta estratégia de amostragem. Escala: 250 μm .

Primeiramente, para cada grupo experimental, investigamos a presença de características morfológicas compartilhadas pelos astrócitos encontrados nas camadas de interesse. Submetemos todas as variáveis quantitativas morfométricas de cada grupo separadamente para uma análise inicial de *cluster* (método de agrupamento hierárquico de Ward's), que incluiu todos os animais de cada grupo. Esse método é mais adequado para as variáveis quantitativas, e não para variáveis binárias. A análise de agrupamento abrange um número de diferentes algoritmos de classificação aplicados a uma grande variedade de problemas em pesquisa (Steele & Weller, 1995; Schweitzer & Renehan, 1997; Gomes-Leal *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2007); eles são usados principalmente quando não se tem uma hipótese *a priori* sobre os objetos que pertencem a um grupo de *cluster* específico. Nós aplicamos este procedimento estatístico multivariado para a nossa amostra de astrócitos para procurar potenciais classes morfológicas astrogliais dentro de cada camada de cada grupo experimental.

As classes de astrócitos sugeridas pela análise de *cluster* foram ainda avaliadas com uma análise da função discriminante empregando o software Statistica 7.0 (Statsoft©, Tulsa, OK). A análise da função discriminante é usada para determinar quais variáveis discriminam entre dois ou mais grupos que ocorrem naturalmente. A ideia subjacente a esse procedimento foi determinar em que extensão os grupos diferem no que diz respeito à média de uma variável, e em seguida usar essa variável para prever a associação ao grupo. No presente estudo, foi utilizado o *software* para realizar comparações entre a matriz total de variâncias e covariâncias. Essas matrizes foram comparadas através de testes F multivariados para determinar se existem diferenças significativas (em relação a todas as variáveis) entre os grupos. Na análise da função discriminante, o programa constrói um modelo de discriminação passo-a-passo. Nesse modelo, a cada passo, todas as variáveis foram analisadas e avaliadas para determinar qual variável que mais contribuiu para a discriminação entre os grupos. Nós aplicamos esse procedimento para determinar variáveis morfométricas que proporcionaram a melhor separação entre as classes astrogliais sugeridas pela análise de *cluster*. Além disso, a média aritmética e o desvio padrão foram calculados para as variáveis morfométricas que melhor distinguiram os grupos astrogliais. Análise estatística paramétrica com teste t foi aplicada para comparar os grupos de astrócitos dentro de cada grupo experimental e detectar possíveis diferenças morfológicas entre astrócitos médios de cada grupo experimental e camadas.

Foi realizada a análise de agrupamento (método de Ward's) com base nas quantificações de 30 características morfométricas dos astrócitos, 10 relacionadas ao corpo celular e 20 relacionadas aos ramos: 1. Área Soma (μm^2); 2. Perímetro do Soma; 3. *Feret* diâmetro mínimo; 4. *Feret* diâmetro máximo (diâmetro máximo de uma forma); 5. Compacidade; 6. Fator de forma; 7. Solidez; 8. Esfericidade; 9. Aspecto *ratio* (proporção); 10. Convexidade; 11. Comprimento dos ramos (μm); 12. Comprimento total dos ramos (μm); 13. Área de superfície (μm^2); 14. Volume dos ramos (μm^3); 15. Segmentos/mm; 16. Tortuosidade; 17. Dimensão fractal (k-dim); 18. Diâmetro da base do segmento primário (μm); 19. Número total de segmentos; 20. Número de varicosidade; 21. Ângulo planar; 22. Número de ramos; 23. Complexidade; 24. Volume convexo de superfície (*convex – hull volume*); 25. Área de superfície convexa (*convex – hull*); 26. Área do soma convexa de superfície (*convex – hull area*); 27. Perímetro convexo de superfície (*convex – hull contour*); 28. Vértice Va; 29. Vértice Vb; 30. Vértice Vc.

A Tabela 1 descreve todas as variáveis morfométricas utilizadas.

Tabela 1. Definições dos parâmetros morfológicos utilizados para quantificar os aspectos morfológicos dos astrócitos do giro denteado em camundongos Suíços albinos.

Análise da ramificação da estrutura	
Segmento	Qualquer parte da estrutura ramificada astroglial que são limitadas entre o corpo celular e um ponto de ramificação, ou entre pontos de ramificações ou entre um ponto de ramificação e uma extremidade (ponta ou terminal do processo glial).
Segmentos/mm	Número de segmentos / comprimento total dos segmentos (expresso em milímetros).
Número de ramos	Número de ramos do astrócito.
Número total de segmentos	Referem-se ao número total de segmentos em um ramo.
Comprimento dos ramos (segmentos)	Comprimento médio dos segmentos utilizados para traçar o ramo de interesse. Comprimento médio = [Comprimento] / [Número de segmentos].
Comprimento total dos ramos	Comprimento total para todos os ramos na árvore.
Tortuosidade	= [Comprimento real do segmento] / [Distância entre as extremidades do segmento]. O menor valor é 1; isto representa um segmento em reta. Tortuosidade permite que os segmentos de diferentes comprimentos possam ser comparados em termos de complexidade dos caminhos que descrevem.
Área de Superfície média dos segmentos	Calculado pela modelagem de cada segmento como um tronco (tronco de um cone circular reto).
Volume dos ramos	Computado pela modelagem de cada pedaço de cada segmento como um tronco.
Volume total dos ramos	O volume total de todos os ramos da árvore glial.
Diâmetro da base do ramo primário	Diâmetro do primeiro segmento.
Ângulo planar	Calculado com base nos pontos finais dos segmentos. Refere-se a mudança de direção (angulação) de um segmento (segmento de origem) em relação ao segmento anterior (segmento parental).
Superfície convexa <i>Convex-hull</i>	Estima um campo de cobertura tridimensional ocupada pela árvore glial como um sólido construído a partir da modelagem de uma superfície conectando as terminações mais distais da célula reconstruída. A quantificação do espaço físico pode ser definida em termos de volume e área de superfície dos processos gliais e área e perímetro do corpo celular.
Dimensão 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 e implicam na complexidade de uma estrutura.
Complexidade	Complexidade = [Soma das ordens terminais + Número de terminais] * [Comprimento total dos ramos / Número de segmentos primários]. Terminal: Refere-se a terminações. Ordens Terminais: Número de ramos "irmãos" encontrados à medida que avançar a partir do terminal para o corpo celular (calculadas para cada terminal).

Vértices (bi e trifurcações)	<p>Principais tipos de vértices:</p> <p>Ponto de bifurcação (ou origem): A origem é o ponto em que a estrutura está ligada ao corpo. Vd (bifurcação) ou Vt (trifurcação): Ponto de ramificação. Vp: extremidades do vértice (ou pingente).</p> <p>Tipos de pontos de bifurcação (Vd):</p> <p>Va: vértices primários ligando a 2 extremidades (Vp).</p> <p>Vb: vértices secundários ligando a 1 extremidade (Vp) e a 1 bifurcação (Vd) ou a 1 trifurcação (Vt).</p> <p>Vc: vértices terciários ligando outras 2 bifurcações (Vd) ou 2 trifurcações (Vt), ou 1 bifurcação (Vd) e 1 trifurcação (Vt).</p> <p>Tipos de pontos de trifurcação (Vt):</p> <p>Va': vértices primários ligando a 3 extremidades (Vp).</p> <p>Vb': vértices secundários ligando a 2 extremidades (Vp) e a 1 bifurcação (Vd) ou a 1 trifurcação (Vt).</p> <p>Vc': vértice terciário ligando a 1 extremidade (Vp) e a 2 bifurcações (Vd), ou 2 trifurcações (Vt), ou a 1 bifurcação (Vd) e a 1 trifurcação (Vt).</p> <p>Vd': vértice quaternário ligando a outras 3 bifurcações (Vd), ou a 3 trifurcações (Vt), ou a 1 bifurcação (Vd) e a 2 trifurcações (Vt), ou a 2 bifurcações (Vd) e a 1 trifurcação (Vt).</p>
Corpo Celular	
Área	Refere-se à área em 2 dimensões da secção transversal contidas dentro do limite do corpo da célula.
Perímetro	Comprimento do contorno representando que envolve o corpo da célula.
<i>Feret</i> max / min	Dimensões maiores e menores do corpo da célula como se um paquímetro fosse utilizado para medir todo o contorno. As duas quantificações são independentes uma da outra e não necessariamente em ângulos retos entre si.
Aspecto <i>Ratio</i> (proporção)	<p>Aspecto Rácio = [Diâmetro mínimo] / [Diâmetro máximo]</p> <p>Indica o grau de achatamento do corpo da célula:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Faixa de valores é 0-1. • Um círculo tem um aspecto rácio de 1.
Compacidade	$\text{Compacidade} = \frac{\sqrt{\left(\frac{4}{\pi}\right) \times \text{Area}}}{\text{Max Diam}}$ <ul style="list-style-type: none"> • O intervalo de valores é de 0 a 1. • Um círculo é a forma mais compacta possível (compacidade = 1).
Convexidade	<p>Convexidade = [Perímetro do convexo imaginário] / [Perímetro real do corpo celular]</p> <ul style="list-style-type: none"> • Um objeto completamente convexo não tem endentações (variações ao longo do contorno), e tem um valor convexidade de 1 (por exemplo, círculos, elipses, e quadrados). • Objetos côncavos tem convexidade de valores inferiores a 1. • Contornos com baixa convexidade tem uma grande divisão entre o interior e as áreas externas.
Fator de forma	$\text{Fator da forma} = 4\pi \times \frac{\text{Area}}{\text{perimeter}^2}$

	<ul style="list-style-type: none"> • Como a forma de contorno que se aproxima de um círculo perfeito, esse valor se aproxima de no máximo de 1,0. • Formas de contorno achatadas formam valores que se aproximam de 0.
Esfericidade	<p>Esfericidade = $[\text{Compacidade}]^2$</p> <p>Usar para diferenciar objetos que têm valores de compacidade pequenas.</p>
Solidez	<p>Solidez = $[\text{Área}] / [\text{Área convexa}]$</p> <p>A área delimitada por um 'elástico' esticada em torno de um contorno é chamado de área convexa.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Círculos, quadrados, e elipses têm uma solidez de 1. • Endentações no contorno tomam uma área fora da área convexa, diminuindo a área real dentro do contorno.

Assim, todos os astrócitos de cada área ou lâmina de interesse foram analisados pelo *software* Neuroexplorer (MicroBrightField Inc.©) que foi utilizado para processar os dados obtidos com o *software* Neurolucida (MicroBrightField Inc.©). Analisamos os resultados da influência ambiental na morfologia dos astrócitos comparando os grupos jovens JAP e JAE e entre os grupos JAE e VAE para discriminar as influências do envelhecimento sobre as características morfológicas dos astrócitos.

A Figura 2 demonstra algumas das características utilizadas no estudo para uma básica compreensão morfológica da reconstrução.

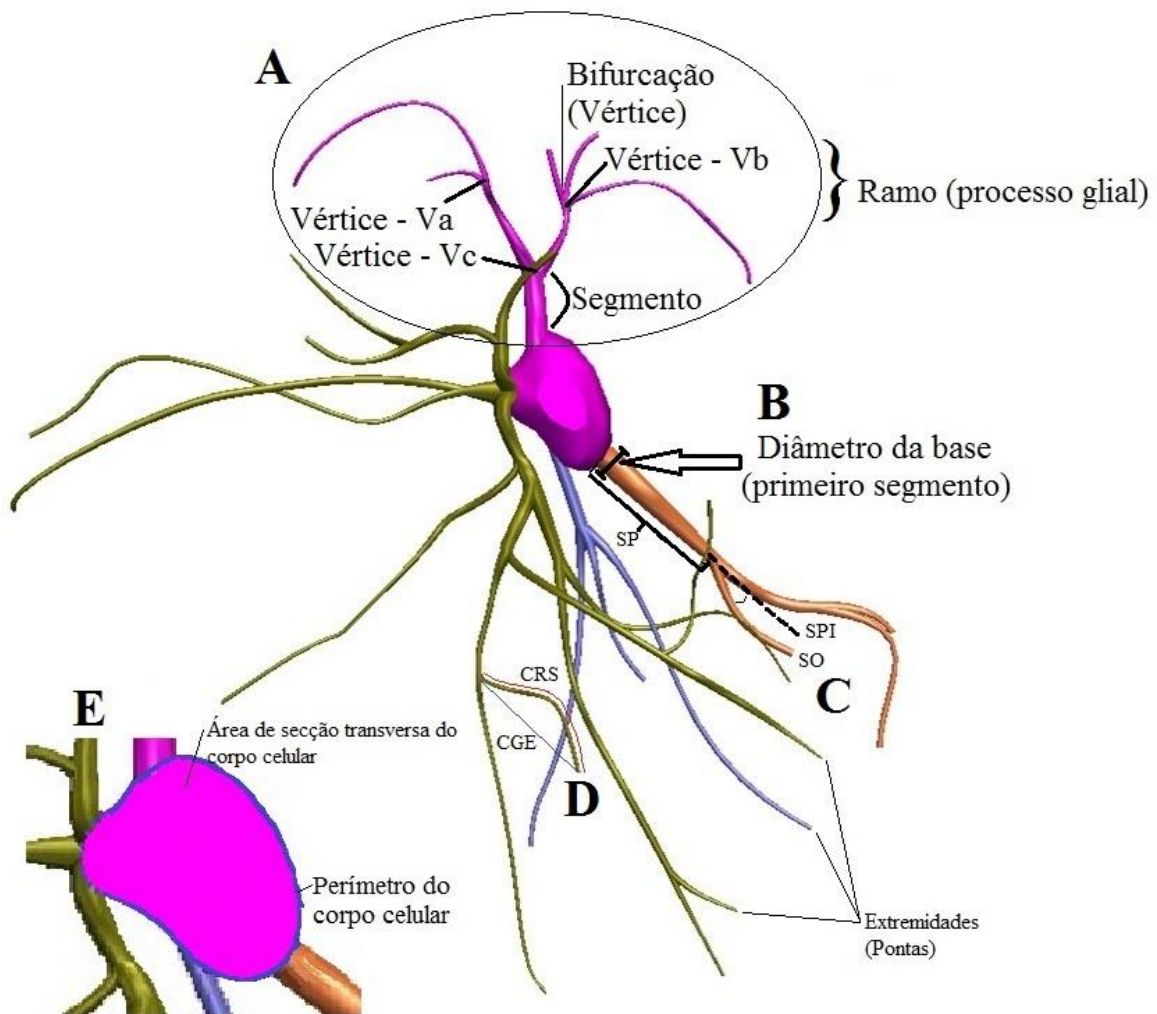


Figura 2: Reconstrução de um astrócito para representar algumas das características morfométricas avaliadas para a morfologia dos diferentes *clusters* e grupos de astrócitos. Em **A** estão representados os 3 dos diferentes tipos de vértices existentes: tipo Va, Vb e Vc. Note que o tipo Va origina dois segmentos que terminam em apenas extremidades (pontas); já o tipo Vb origina dois segmentos sendo que um termina em extremidade e o outro que termina em um ponto de ramificação que origina uma bifurcação ou trifurcação. E por fim o tipo Vc que origina dois segmentos que terminam em dois pontos de ramificação que podem ser ambos, bifurcações ou trifurcações ou uma bifurcação e outra trifurcação. Cada porção do processo astroglial que se origina do corpo celular até um ponto de ramificação, independente do seu tipo, e ainda cada porção que se situa entre pontos de ramificação e cada porção que parte de um ponto de ramificação até uma extremidade (ponta) é designado como segmento. Sendo assim todos os segmentos de um processo glial, que se origina diretamente do corpo celular compõem um ramo. Em **B** está representado o parâmetro diâmetro da base, que nada mais é o diâmetro transversal do primeiro segmento de cada ramo que parte diretamente do corpo celular. Em **C** está representado o parâmetro ângulo planar que é computado entre os ângulos gerados pelas mudanças de orientação espacial entre os segmentos após uma bifurcação; tal ângulo é calculado entre o ângulo gerado pelo segmento parental imaginário (SPI) e o pelo segmento de origem (SO). O segmento parental imaginário (SPI) é uma continuidade imaginária do segmento parental (SP) que é uma porção que é limitada, e anterior, a bifurcação que origina os SPI e SO. Em **D** está explanado a característica tortuosidade que é calculada para cada segmento de uma célula, e que ocorre da seguinte maneira: Tortuosidade (T) = comprimento real do segmento (CRS) / comprimento geométrico entre as duas extremidades (CGE), quer seja originadas do corpo celular ou de uma ramificação até uma outra ramificação ou até uma extremidade (ponta). Podendo ser representada pela fórmula $T = CRS / CGE$. Em **E** está representado o mesmo corpo celular, ampliado, da reconstrução completa e foi dedicado para explicar o perímetro e área da secção transversa do corpo celular. O perímetro é exatamente o comprimento geométrico formado durante a reconstrução do contorno do corpo celular; e a área da secção transversa é a área existente no plano XY delimitada pelo contorno do corpo celular. Todos os parâmetros e suas interpretações foram obtidos pelos *softwares* NeuroLucida e Neuroexplorer (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, USA).

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE LAMINAR DA MORFOLOGIA DOS ASTRÓCITOS NO GIRO DENTEADO DO CAMUNDONGO SUÍÇO ALBINO.

Usamos reconstruções microscópicas tridimensionais com método de amostragem aleatória, sistemática e sem viés para selecionar astrócitos das camadas polimórfica, granular e molecular do giro denteado. Com exceção dos astrócitos da camada polimórfica dos camundongos jovens pertencentes ao ambiente empobrecido (com três fenótipos morfológicos), todas as outras camadas de todos os grupos experimentais mostraram dois tipos principais grupos de morfologias de astrócitos. As Figuras 3 a 11 mostram análise de *cluster* e análise discriminante para ilustrar estes achados juntamente com as reconstruções tridimensionais dos astrócitos com características morfológicas próximas ao "astrócito médio" de cada *cluster* das camadas polimórfica, granular e molecular de todos os grupos experimentais.

As Figuras 3, 4 e 5 mostram os resultados da camada granular do giro denteado (GrGD), as Figuras 6, 7 e 8 mostram os da polimórfica (PolGD) e as Figuras 9, 10 e 11 os da camada molecular (MolGD). A análise de *cluster* das características morfológicas dos astrócitos do grupo jovem do JAE (Figuras 3, 6 e 9), e do grupo envelhecido do VAE (Figuras 5, 8 e 11), independente da camada, revelaram dois tipos principais de astrócitos designados tipos I e II. Com a exceção da camada polimórfica dos camundongos jovens do ambiente empobrecido (JAP), que revelou três principais fenótipos morfológicos (Figura 7), os astrócitos de todas as outras camadas deste grupo (Figuras 4 e 10) apresentaram dois principais fenótipos morfológicos. Em comparação ao tipo II, o fenotipo morfológico tipo I mostrou em média, independentemente da camada de giro denteado, áreas de árvores maiores, valores maiores de complexidade e K-dim, maior comprimento total de ramos, maior número de segmentos, valores mais elevados de volume dos ramos, maior número de vértices (Va, Vb e Vc) e maiores perímetros *convex-hull*, áreas *convex-hull*, superfícies *convex-hull* e volumes *convex-hull*. Em comparação aos fenótipos morfológicos dos astrócitos I e II, os astrócitos do tipo III da camada polimórfica do grupo JAP, foram em média, menos tortuosos, com um menor comprimento total dos ramos e uma maior densidade de segmentos / mm (Figura 7).

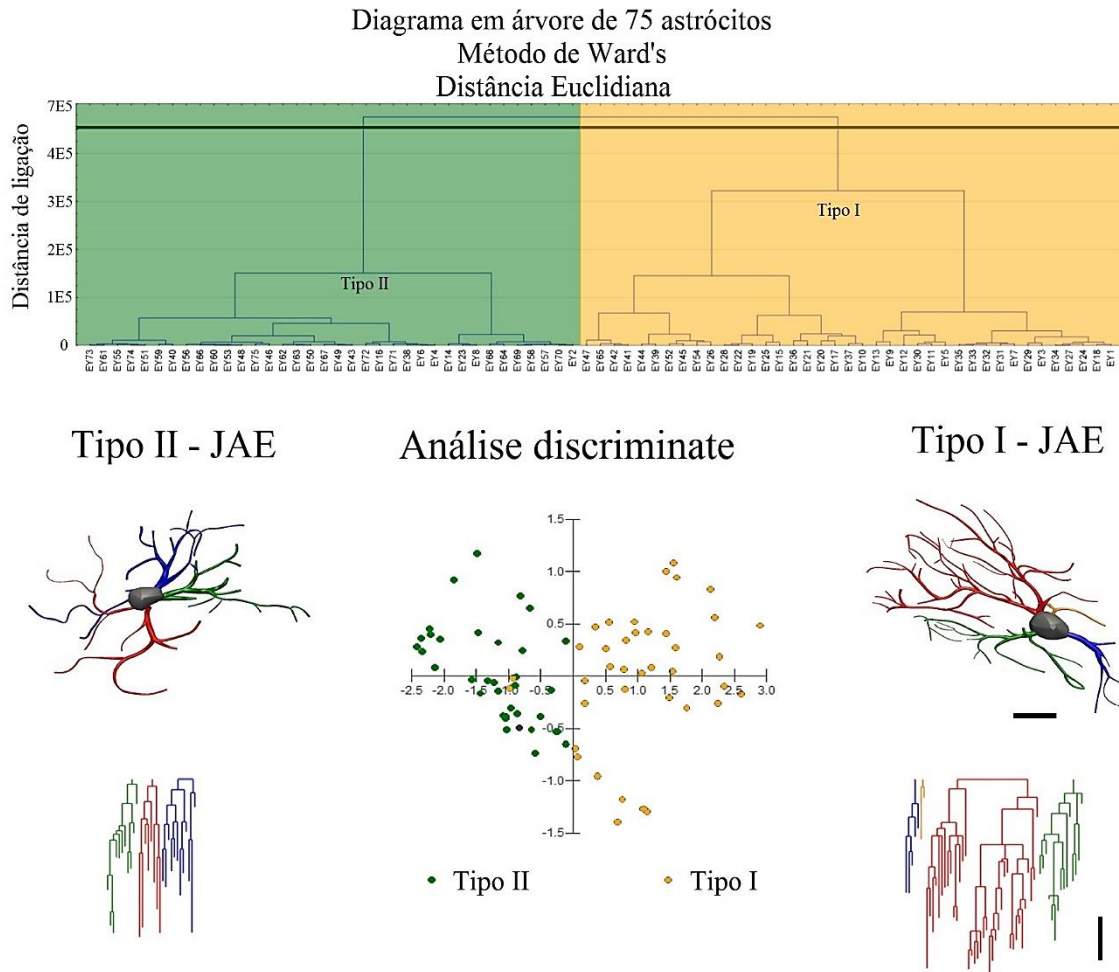


Figura 3: Fenótipos morfológicos dos astrócitos da camada granular do giro dentado de camundongos adultos jovens criados em ambiente enriquecido. Análise de *Cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada granular do giro dentado de cinco camundongos adultos jovens criados em ambiente enriquecido (JAE). Acima: os grupos de dendrogramas de 75 astrócitos do giro dentado representados pelos dois fenótipos morfológicos principais de astrócitos (tipos I e II). A representação gráfica da análise discriminante está retratada no centro, abaixo da análise de *cluster*. Essa análise mostrou que as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram: volume *convex-hull* ($p < 0,0003$), vértices Vb ($p < 0,0346$), número de segmentos ($p < 0,017$) e tortuosidade ($p < 0,021$) e que tanto astrócitos do tipo I (pontos laranja no lado direito) e do tipo II (pontos verdes à esquerda) revelaram distribuições dispersas em torno dos eixos X e Y. Os astrócitos foram reconstruídos de ambas as regiões rostral e caudal do giro dentado, e a análise de *cluster* foi baseada em 30 características morfométricas dos astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental JAE. Os dendrogramas foram gerados e analisados com o programa Neuroexplorer® (MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) estão mostrados em apenas uma cor. Note que em comparação com tipo II, o astrócito do tipo I é mais complexo, apresenta maior área de superfície dos ramos e maior número de segmentos e vértices. Escalas horizontais e verticais: 10 μ m.

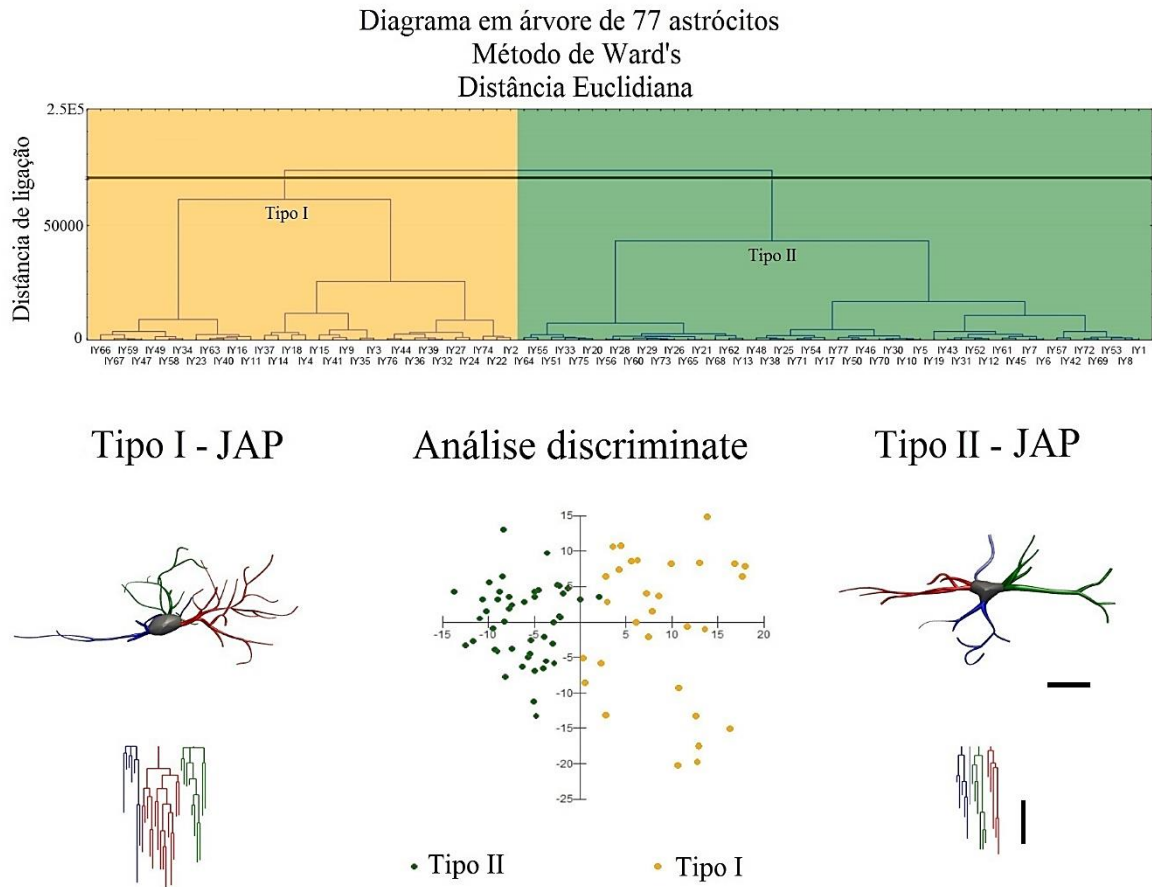


Figura 4: Fenótipos morfológicos dos astrócitos da camada granular do giro denteado de camundongos adultos jovens criados em ambiente empobrecido. A análise de *Cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada granular do giro denteado de cinco camundongos adultos jovens criados em ambiente empobrecido (JAP). Acima: os grupos de dendrogramas de 77 astrócitos do giro denteado representados pelos dois fenótipos morfológicos principais de astrócitos (tipos I e II). A representação gráfica da análise discriminante está retratada no centro, abaixo da análise de *cluster*. Esta análise mostrou que as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram a complexidade ($p < 1 \times 10^{-6}$), os vértices V_c ($p < 0,05$) e área de superfície dos ramos ($p < 0,06$) e que tipo II (pontos verdes na esquerda) tiveram uma distribuição mais compacta do que a do tipo I (astrócitos pontos laranja à direita). Os astrócitos foram reconstruídos de ambas as regiões rostral e caudal do giro denteado, e a análise de *cluster* foi baseada em 30 características morfométricas dos astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental JAP. Os dendrogramas foram gerados e analisados com o programa Neuroexplorer ®(MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) estão mostrados em apenas uma cor. Note que em comparação com do tipo II, astrócito do tipo I é morfológicamente mais complexo com número mais elevado de segmentos e vértices. Escalas horizontais e verticais: 10 μ m.

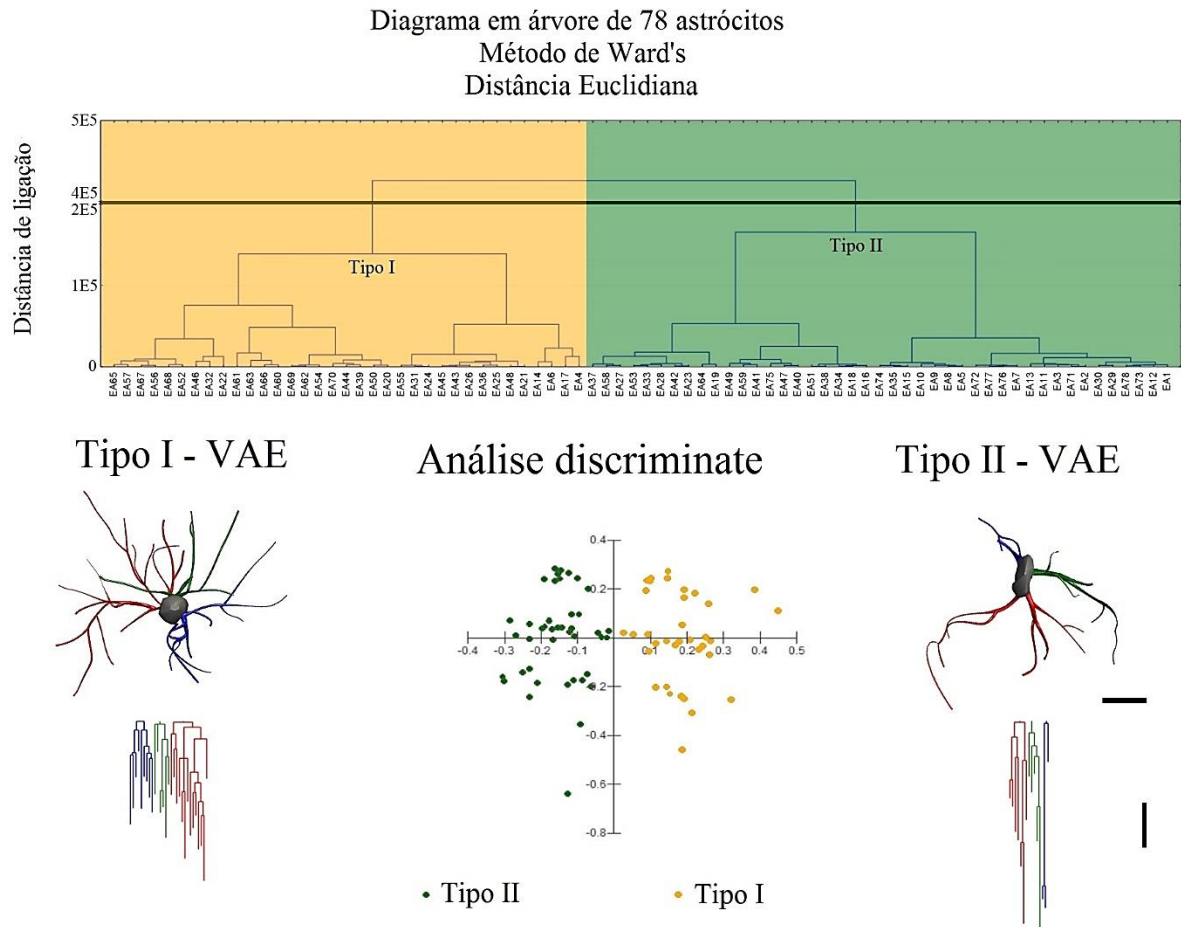


Figura 5: Fenótipos morfológicos dos astrócitos da camada granular do giro dentado de camundongos envelhecidos criados em ambiente enriquecido. A análise de *Cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada granular do giro dentado de cinco camundongos adultos velhos criados em ambiente enriquecido (VAE). Acima: os grupos de dendrogramas de 78 astrócitos representados pelos dois fenótipos morfológicos principais de astrócitos (tipos I e II). A representação gráfica da análise discriminante está retratada no centro, abaixo da análise de *cluster*. Esta análise mostrou que as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram a complexidade ($p < 0,0071$), comprimento total ($p < 0,000001$), área convexa de casco ($p < 0,0255$), número de ramos ($p < 0,0118$) e a dimensão fractal (K-dim, $p < 0,0372$) e revela que tanto os astrócitos do tipo I (pontos laranja à direita) e os do tipo II (pontos verdes à esquerda) mostraram distribuições dispersas em torno dos eixos X e Y. Os astrócitos foram reconstruídos de ambas as regiões rostral e caudal do giro dentado, e a análise de *cluster* foi baseada em 30 características morfométricas das reconstruções 3D dos astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental VAE. Os dendrogramas foram gerados e analisados com o programa Neuroexplorer® (MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) estão mostrados em apenas uma cor. Note que em comparação com o tipo II, astrócito do tipo I é mais complexo, apresenta áreas de superfície maiores dos seus ramos, maiores comprimentos médios dos ramos e maior número de segmentos e vértices. Escalas horizontais e verticais: 10 μm .

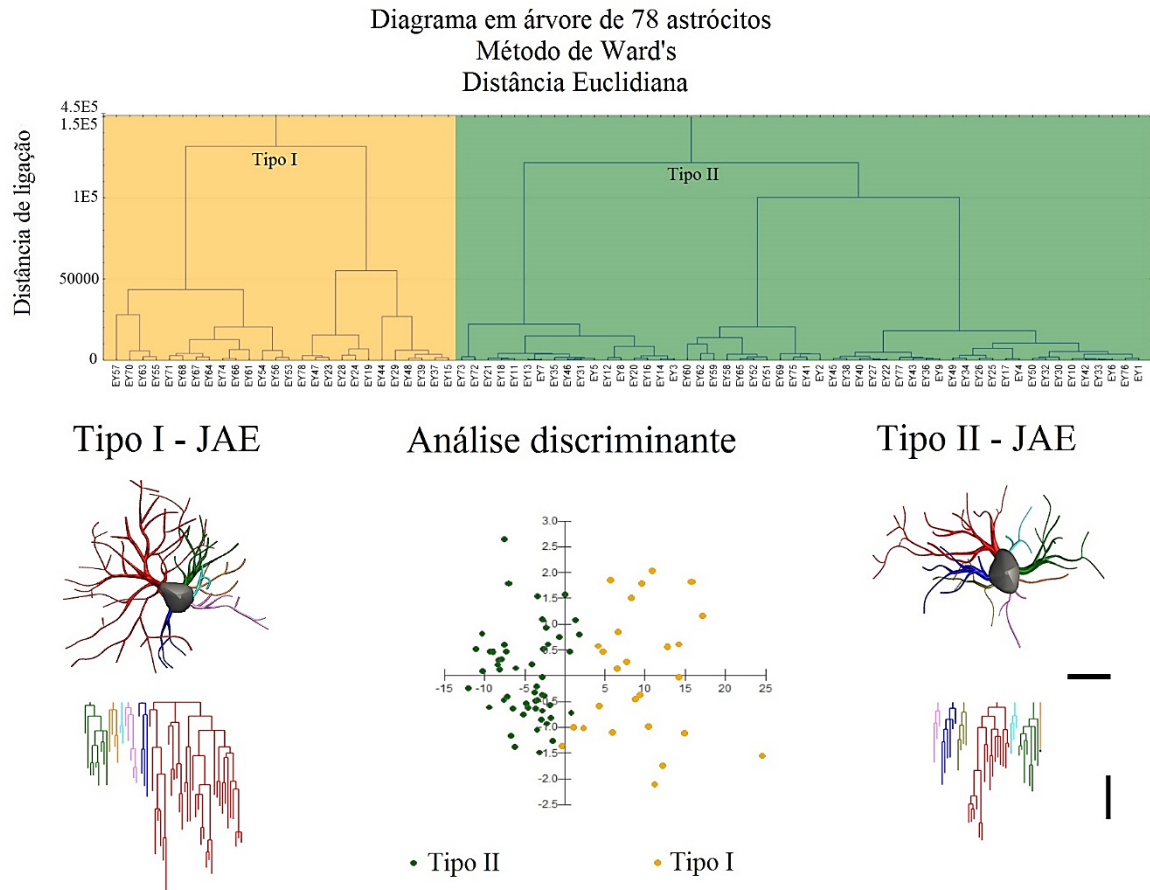


Figura 6: Fenótipos morfológicos dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado de camundongos adultos jovens criados em ambiente enriquecido. Análise de *cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada polimórfica do giro dentado de cinco camundongos adultos jovens criados em ambiente enriquecido (JAE). Acima: os grupos de dendrogramas de 78 astrócitos do giro dentado representados pelos dois fenótipos morfológicos principais de astrócitos (tipos I e II). A representação gráfica da análise discriminante está retratada no centro, abaixo da análise de *cluster*. Esta análise mostrou que a formação do cluster é principalmente baseada na complexidade morfológica ($p < 1 \times 10^{-6}$) com pouca contribuição do comprimento médio dos ramos ($p < 0,08$) e que em comparação com o tipo I (pontos laranja à direita), o astrócito do tipo II revelou distribuição mais compacta (pontos verdes à esquerda). Os astrócitos foram reconstruídos em ambas as regiões rostral e caudal do giro dentado, e a análise de cluster foi baseada em 30 características morfométricas dos astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental JAE. Os dendrogramas foram gerados e analisados com o programa Neuroexplorer® (MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) estão mostrados em apenas uma cor. Note que em comparação com o tipo II, astrócito do tipo I é mais complexo, apresenta maiores áreas de superfície dos ramos e maior número de segmentos e vértices. Escalas horizontais e verticais: 10 μ m.

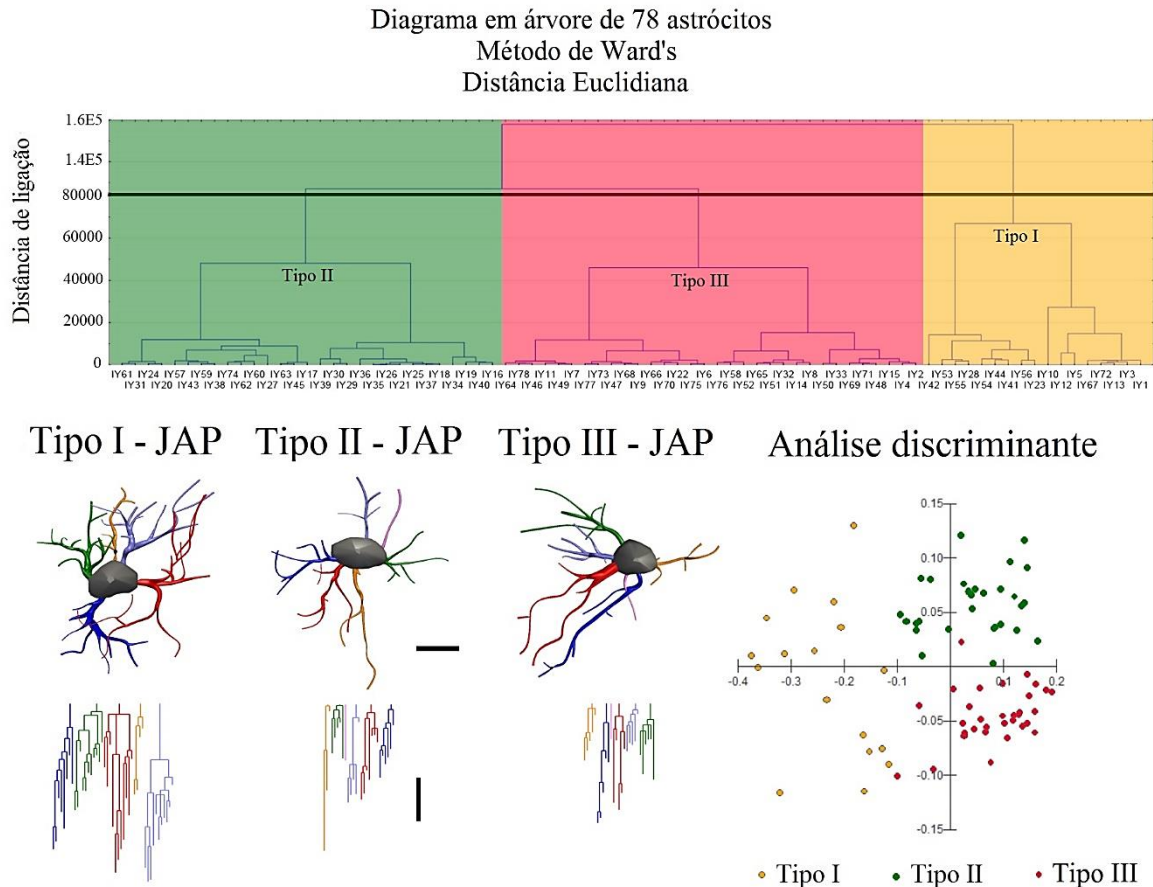


Figura 7: Fenótipos morfológicos dos astrócitos na camada polimórfica do giro denteado de camundongos adultos jovens criados em ambiente empobrecido. Análise de *cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada polimórfica do giro denteado de cinco camundongos adultos criados em ambiente empobrecido (JAP). Acima: grupos de dendrogramas de 78 astrócitos do giro denteado representados pelos 3 principais fenótipos morfológicos designados como tipo I, II e III. A representação gráfica da análise discriminante está plotada à direita, abaixo da análise de *cluster* e revela que ao comparar com tipo II (pontos verdes no lado direito, acima do eixo X) e tipo III (pontos vermelhos à direita e abaixo do eixo X), os astrócitos do tipo I mostraram uma distribuição mais dispersa (pontos laranja à esquerda, acima e abaixo do eixo X). Esta análise mostrou que as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram a complexidade ($p < 1 \times 10^{-6}$), volume convexo de superfície ($p < 0,01891$), o comprimento médio dos ramos ($p < 0,000174$), superfície convexa ($p < 0,03$), comprimento total dos ramos ($0,000252$), número de segmentos ($p < 0,01373$) e dimensão fractal (K-dim, $p < 0,023$). Os astrócitos foram reconstruídos em ambas as regiões rostral e caudal do giro denteado, e a análise de *cluster* foi baseada em 30 características morfométricas dos astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro denteado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental JAP. Os dendrogramas foram gerados e analisados com o programa Neuroexplorer® (MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) estão mostrados em apenas uma cor. Note que em relação ao tipo II, o astrócito do tipo I é, em média, mais complexo, apresenta ramificações primárias mais espessas, as áreas de superfície dos ramos maiores e maior número de segmentos e vértices. Em comparação com os fenótipos morfológicos dos astrócitos I e II, os astrócitos do tipo III da camada polimórfica do JAP, foram em média, menos tortuosos, com menores volumes, áreas e perímetros *convex hull*. Escalas horizontais e verticais: 10 μm .

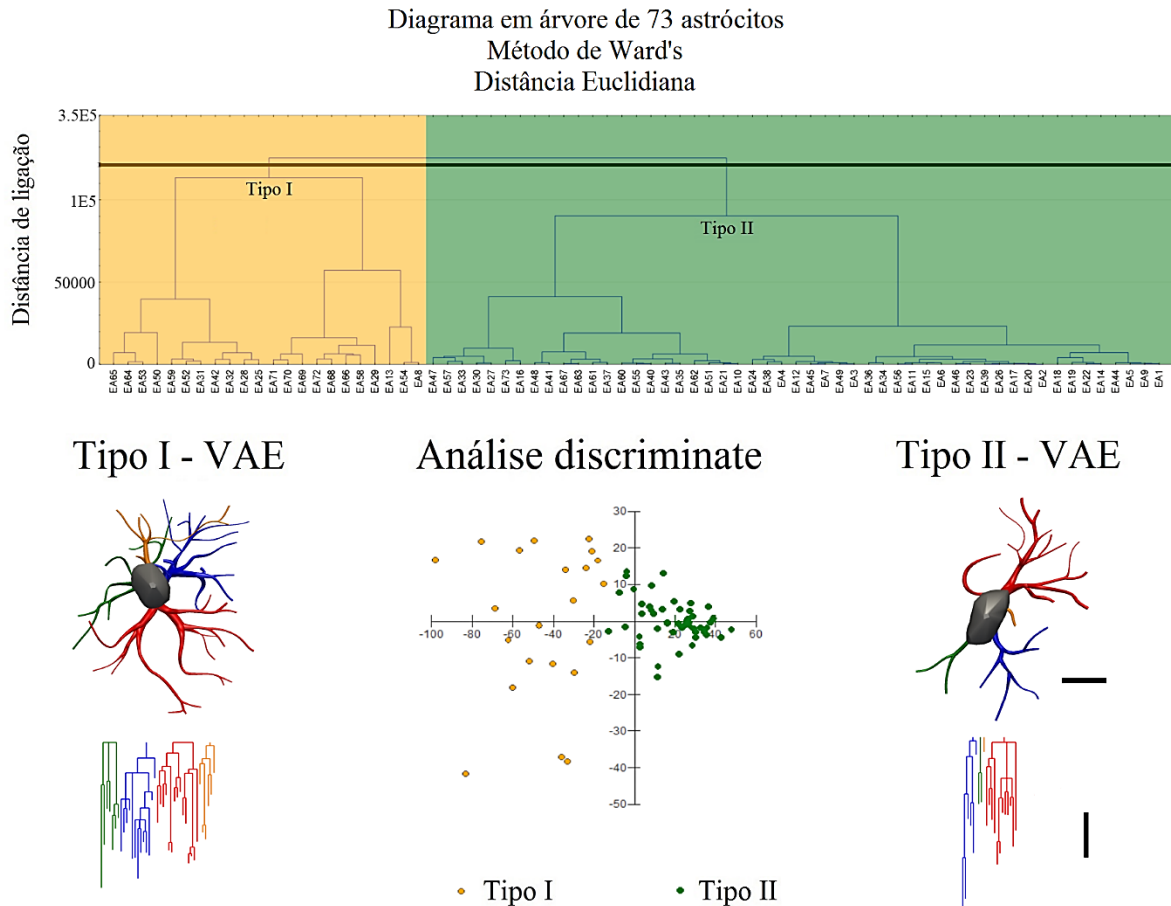


Figura 8: Fenótipos morfológicos dos astrócitos da camada polimórfica do giro denteado de camundongos envelhecidos criados em ambiente enriquecido. Análise de *cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada polimórfica do giro denteado de cinco camundongos adultos criados em ambiente enriquecido (VAE). Acima: grupos de dendrogramas de 73 astrócitos giro denteado representados pelos dois fenótipos morfológicos principais de astrócitos (tipos I e II). A representação gráfica da análise discriminante está plotada no centro, abaixo da análise de *cluster* e mostra a distribuição mais compacta para o astrócito do tipo II (maior parte dos pontos verdes estão no lado direito do eixo Y, próximo do eixo X). Esta análise mostrou que as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram complexidade (1×10^{-6}), volume do *convex hull* ($p < 0,000025$), e comprimento médio dos ramos ($p < 0,0355$) e ainda revela que, em comparação ao tipo I (pontos laranja no lado esquerdo), os astrócitos do tipo II (pontos verdes à direita) têm uma distribuição mais compacta. Os astrócitos foram reconstruídos em ambas as regiões rostral e caudal do giro denteado, e a análise de *cluster* foi baseada em 30 características morfométricas dos astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental VAE. Os dendrogramas foram gerados e analisados com o programa Neuroexplorer® (MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) estão mostrados em apenas uma cor. Note que em comparação com o tipo II, o astrócito do tipo I é mais complexo, apresenta maiores áreas de superfície dos ramos e maior número de segmentos e vértices. Escalas horizontais e verticais: 10 μm .

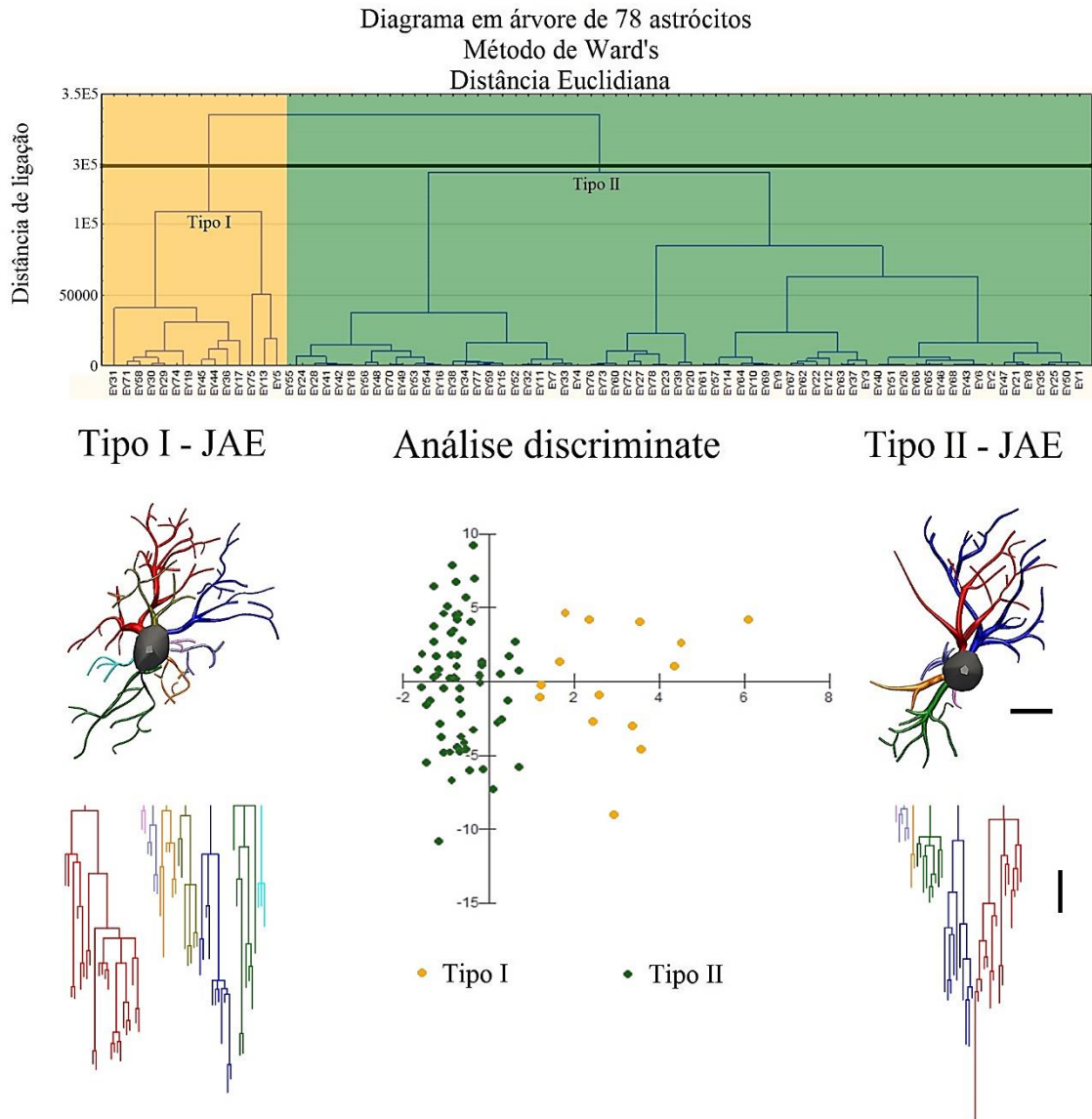


Figura 9: Fenótipos morfológicos dos astrócitos da camada molecular do giro denteado de camundongos adultos jovens criados em ambiente enriquecido. A análise de *cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada molecular do giro denteado de cinco camundongos adultos jovens criados em ambiente enriquecido (JAE). Acima: grupos de dendrogramas de 78 astrócitos do giro denteado representados pelos dois fenótipos morfológicos principais de astrócitos (tipos I e II). A representação gráfica da análise discriminante está plotada no centro, abaixo da análise de *cluster*. Esta análise mostrou que as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram a complexidade ($p < 1 \times 10^{-6}$), área de superfície *convex-hull* ($p < 0,000001$), número de segmentos ($p < 0,0001$), número de ramos ($p < 0,003$), número de segmentos / mm ($p < 0,0067$) e comprimento médio dos ramos ($p < 0,0282$) e que, em comparação com o tipo I (pontos laranja no lado direito do eixo Y) os astrócitos do tipo II (pontos verdes ao lado esquerdo) mostraram uma distribuição mais compacta. Os astrócitos foram reconstruídos em de ambas as regiões rostral e caudal do giro denteado, e a análise de *cluster* foi baseada em 30 características morfométricas dos astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental JAE. Os dendrogramas foram plotados e analisados com o programa Neuroexplorer® (MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) são mostrados em apenas uma cor. Note que em comparação com o tipo II, o astrócito do tipo I é mais complexo, apresenta maiores áreas de superfície de ramos e maior número de segmentos e vértices. Escalas horizontais e verticais: 10 μm .

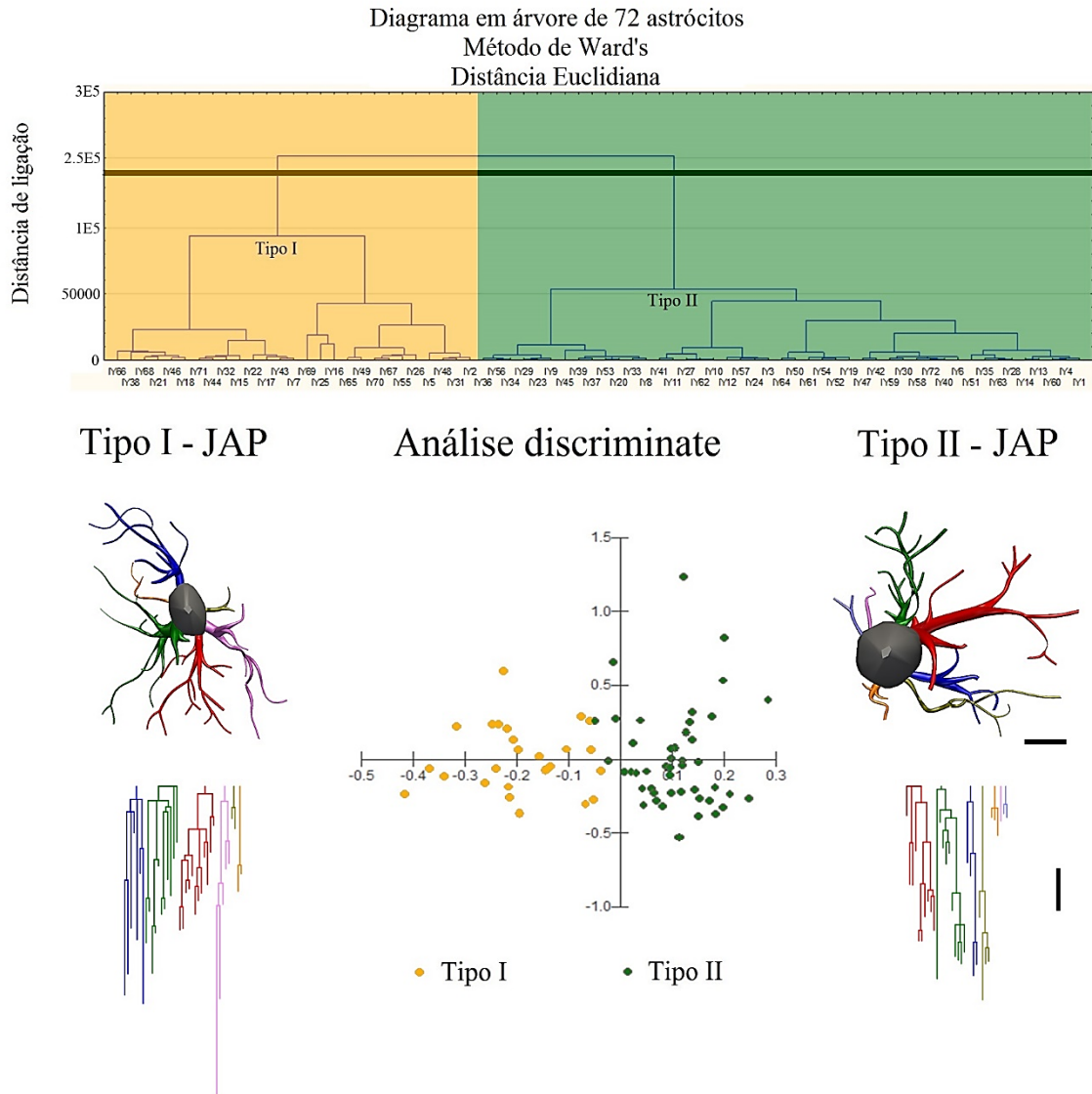


Figura 10: Fenótipos morfológicos dos astrócitos da camada molecular do giro denteado de camundongos adultos jovens criados em ambiente pobre. Análise de *cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada molecular do giro denteado de cinco camundongos adultos jovens criados em ambiente empobrecido (JAP). Acima: grupos de dendrogramas de 72 astrócitos do giro denteado representados pelos dois fenótipos morfológicos principais de astrócitos (tipos I e II). A representação gráfica da análise discriminante está plotada no centro, abaixo da análise cluster. Esta análise mostrou que as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram: volume *convex hull* ($p < 0,00041$), a complexidade ($p < 0,00066$), volume dos ramos ($p < 0,0106$), segmentos / mm ($p < 0,004$), área de superfície ($p < 0,0189$) e a solidez ($p < 0,0182$) e que tanto o tipo I (pontos laranja no lado esquerdo do eixo Y) e astrócitos do tipo II (pontos verdes no lado direito) apresentaram um grau semelhante de dispersão em torno dos eixos Y e X. Os astrócitos foram reconstruídos em ambas as regiões rostral e caudal do giro denteado, e a análise de cluster foi baseada em 30 características morfométricas astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro denteado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental JAP. Os dendrogramas foram plotados e analisados com o programa Neuroexplorer® (MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) são mostrados em apenas uma cor. Note que em comparação com o tipo II, o astrócito do tipo I é mais complexo, apresenta maiores áreas de superfície dos ramos e maior número de segmentos e vértices. Escalas horizontais e verticais: 10 μm .

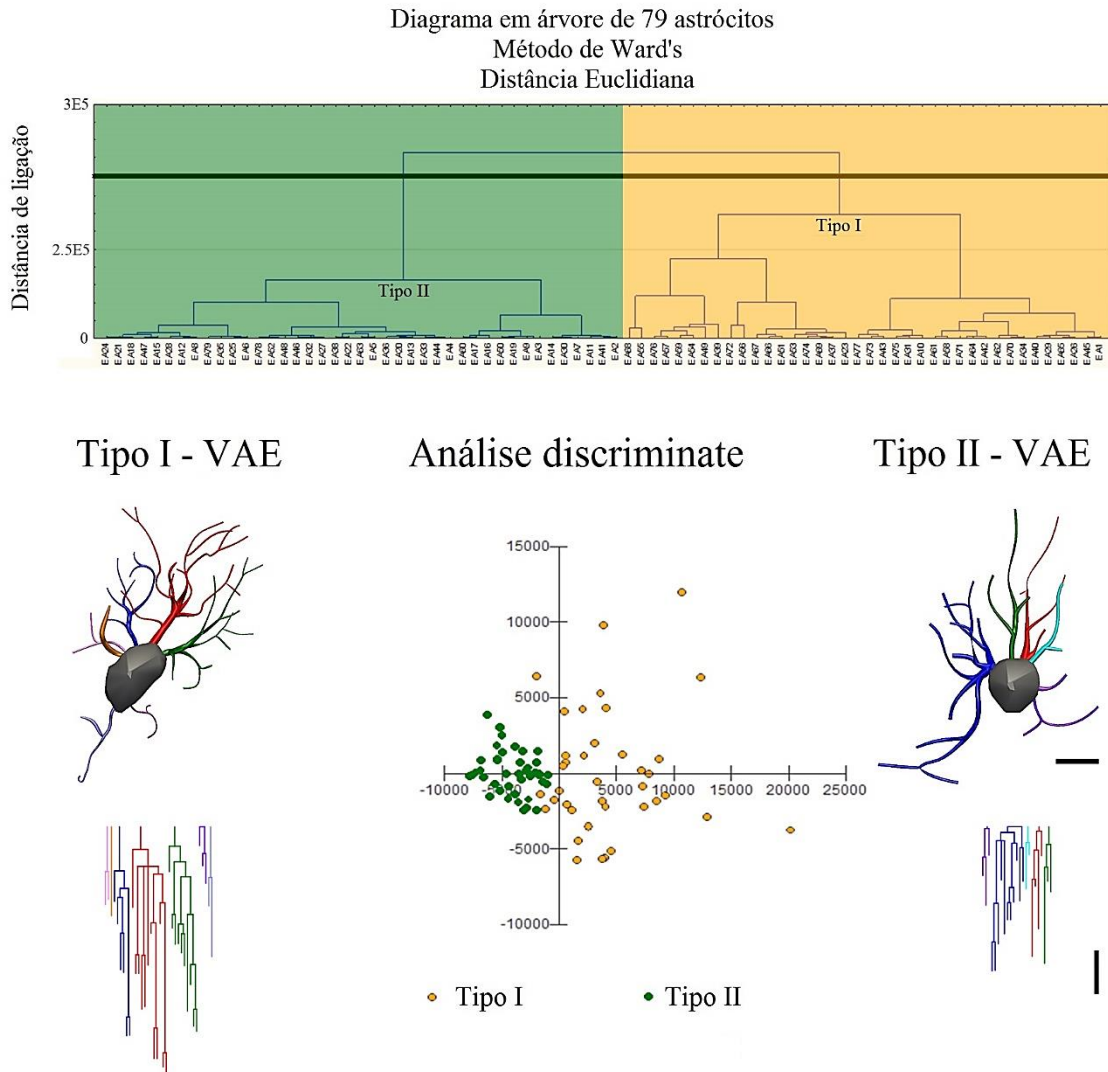


Figura 11: Fenótipos morfológicos de astrócitos da camada molecular do giro dentado de camundongos com envelhecidos criados em ambiente enriquecido. Análise de *cluster* (método de Ward), análise discriminante e reconstruções tridimensionais de astrócitos da camada molecular do giro dentado de cinco camundongos adultos velhos criados em ambiente enriquecido (VAE). Acima: grupos de dendrograma de 79 astrócitos do giro dentado representados pelos dois fenótipos morfológicos principais de astrócitos (tipos I e II). A representação gráfica da análise discriminante está plotada no centro, abaixo da análise de *cluster*. Este estudo mostrou que as variáveis que mais contribuíram para a formação dos grupos foram: volume *convex-hull* ($p < 1 \times 10^{-6}$), a complexidade ($p < 0,012$), e que em comparação ao tipo I (pontos laranja no lado direito do eixo Y) os astrócitos do tipo II (pontos verdes sobre o lado esquerdo) mostraram uma distribuição mais compacto em torno do eixo X. Os astrócitos foram reconstruídos em ambas as regiões rostral e caudal do giro dentado, e a análise de cluster foi baseada em 30 características morfométricas dos astrócitos. As reconstruções tridimensionais dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado com dendrogramas lineares correspondentes a cada ramificação dos astrócitos, estão exibidas abaixo (esquerda e direita), com o comprimento de cada segmento do ramo exibido em escala como linhas verticais, e ramos irmãos separados horizontalmente (abaixo). Os astrócitos aqui selecionados para ilustração exibem características morfométricas representativas das características morfológicas médias dos outros astrócitos pertencentes ao grupo experimental VAE. Os dendrogramas foram plotados e analisados com o programa Neuroexplorer® (MicroBrightField©). Os ramos do mesmo tronco parental (ramo principal) são mostrados em apenas uma cor. Note que em comparação ao tipo II, o astrócito do tipo I é mais complexo, apresenta maiores áreas de superfície dos ramos e maior número de segmentos e vértices. Escalas horizontais e verticais: 10 μm .

4.2. INFLUÊNCIAS AMBIENTAIS E DO ENVELHECIMENTO NA COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS DO GIRO DENTEADO

O parâmetro complexidade foi anteriormente definido (Pillai *et al.*, 2012) pela seguinte equação:

$$\text{Complexidade} = [\text{Soma das ordens terminais} + \text{Número de terminais}] \times [\text{Comprimento total de ramos} / \text{número de segmentos primários}].$$

Para detalhes, veja:

<http://www.mfbioscience.com/help/nx11/Default.htm#Analyses/BranchedStructure/neuronSumm.htm>

A partir dessa equação, é possível prontamente reconhecer que valores mais elevados de complexidade implicaram em astrócitos mais ramificados e mais longos. Nós designamos de tipo I os astrócitos que, em comparação ao tipo II, apresentaram valores significativamente mais elevados de complexidade. Então comparamos os astrócitos do grupo JAP com os do JAE e os astrócitos do JAE com os do VAE. Em ambas comparações, os astrócitos de todas as camadas do GD dos camundongos do grupo JAE revelaram valores mais elevados de complexidade, em média, em relação as suas comparações correspondentes, e possíveis, camundongos do grupo JAP e do VAE (Tabela 2).

Tabela 2. Diferenças morfológicas entre astrócitos reconstruídos em 3D das camadas granular, molecular e polimórfica do giro dentado camundongos adultos jovens pertencentes aos ambientes empobrecido (JAP) e enriquecido (JAE), e dos camundongos idosos criados no ambiente enriquecido (VAE).

<u>Granular</u>		
Tipo I		
JAE = 45595,6 ± 2755,5	JAP = 14858,12 ± 699,1	JAE x JAP, U = 24, z (U) = 6,9, p < 0,0001
	VAE = 24346,9 ± 1194,2	JAE x VAE, U = 166, z (U) = 5,6, p < 0,0001
Tipo II		
JAE = 18033,52 ± 1389,32	JAP = 5242,5 ± 295,9	JAE x JAP, U = 141, z (U) = 6,4, p < 0,0001
	VAE = 8382,2 ± 494,2	JAE x VAE, U = 281, z (U) = 4,8, p < 0,0001
<u>Molecular</u>		
Tipo I		
JAE = 31269,56 ± 2975,49	JAP = 14484,5 ± 1050,8	JAE x JAP, U = 33, z (U) = 4,22, p < 0,0001
	VAE = 8079,81 ± 749,50	JAE x VAE, U = 10, z (U) = 5,28, p < 0,0001
Tipo II		
JAE = 11105,03 ± 613,75	JAP = 6691,09 ± 483,02	JAE x JAP, U = 696, z (U) = 4,70, p < 0,0001
	VAE = 3400,49 ± 228,41	JAE x VAE, U = 135, z (U) = 7,73, p < 0,0001
<u>Polimórfica</u>		
Tipo I		
JAE = 31097,8 ± 1498,91	JAP = 17234,94 ± 1440	JAE x JAP, teste-t bicaudal, t ₃₉ = 6,13, p < 0,0001
	VAE = 20714,8 ± 2552,4	JAE x VAE, teste-t bicaudal, t ₂₁ = 3,74, p < 0,001
Tipo II		
JAE = 11936,08 ± 664,41	JAP = 6304,78 ± 503,6	JAE x JAP, U = 258, z (U) = 4,89, p < 0,0001
	VAE = 6050,13 ± 458,08	JAE x VAE, U = 438, z (U) = 5,86, p < 0,0001

As figuras 12-14 e tabela 3 ilustram a média das características morfológicas selecionadas dos astrócitos de cada camada sob as influências das alterações ambientais e da idade. A seleção foi baseada nas características morfológicas que sofreram influências significativas tanto pelo ambiente quanto pela idade em todas as camadas, sugerindo que estas alterações morfológicas sofrem a mesma influência laminar. Em comparação aos astrócitos do giro denteado de camundongos jovens criados no ambiente empobrecido de gaiolas padrão de laboratório, os astrócitos do giro denteado de camundongos jovens criados em ambiente enriquecido tiveram em média, significativamente maiores comprimentos totais de seus ramos, maior número de segmentos, maiores áreas de superfície, maior complexidade e número de vértices (Va, Vb e Vc). No entanto, com o envelhecimento os camundongos do ambiente enriquecido (grupo VAE), em comparação aos camundongos jovens do mesmo ambiente (JAE), mostraram árvores retraídas, com redução do seu comprimento total, número de segmentos, área de superfície e número de vértices (Va, Vb e Vc), e um menor nível de complexidade morfológica (Tabela 3).

Tabela 3. Influências do ambiente e da idade sobre as características morfológicas dos astrócitos da camada granular, polimórfica e molecular do giro denteado. Camundongos adultos jovens do ambiente empobrecido = JAP ou do ambiente enriquecido (JAE); Camundongos idosos do ambiente enriquecido = VAE; E. P. = Erro padrão. Note que os valores médios das características morfológicas dos astrócitos de todas as camadas do giro denteado de JAE são significativamente mais elevados do que os dos grupos JAP e VAE.

Granular	JAP		JAE		VAE		Valores t e p	
	média	e. p.	média	e. p.	média	e. p.	(jap x jae)	(jae x vae)
Comprimento total dos ramos (μm)	302,22	10,31	567,42	22,93	464,06	17,60	$t_{102,86} = 10,55$ $p < 0,0001$	$t_{140,12} = 3,58$ $p < 0,0005$
Comprimento médio dos ramos (μm)	8,18	0,17	8,86	0,28	12,36	0,40	$t_{123,6} = 2,03$ $p < 0,04$	$t_{135,62} = 7,02$ $p < 0,0001$
Número de segmentos	37,71	1,33	64,95	2,21	38,42	1,16	$t_{121,95} = 10,56$ $p < 0,0001$	$t_{112,27} = 10,63$ $p < 0,0001$
Área da superfície (μm^2)	468,34	17,55	993,11	38,79	782,41	38,05	$t_{103,19} = 12,32$ $p < 0,0001$	$t_{151} = 3,88$ $p < 0,0002$
Complexidade	9113,74	633,44	32365,81	2242,33	15546,00	1083,90	$t_{85,75} = 9,98$ $p < 0,0001$	$t_{107,01} = 6,75$ $p < 0,0001$
Vértice (Va)	6,54	0,26	10,77	0,40	6,59	0,22	$t_{127,47} = 8,95$ $p < 0,0001$	$t_{116,57} = 9,22$ $p < 0,0001$
Vértice (Vb)	5,99	0,28	11,23	0,54	6,05	0,32	$t_{110,91} = 8,57$ $p < 0,0001$	$t_{120,12} = 8,21$ $p < 0,0001$
Vértice (Vc)	2,78	0,19	6,40	0,33	3,14	0,19	$t_{119,02} = 9,56$ $p < 0,0001$	$t_{117,92} = 8,64$ $p < 0,0001$
Polifórmica								
Comprimento total dos ramos (μm)	345,18	10,50	497,84	15,90	383,56	12,79	$t_{133,44} = 8,01$ $p < 0,0001$	$t_{144,25} = 5,60$ $p < 0,0001$
Comprimento médio dos ramos (μm)	6,59	0,15	5,67	0,11	8,16	0,15	$t_{143,39} = -4,91$ $p < 0,0001$	$t_{133,81} = -13,02$ $p < 0,0001$
Número de segmento	53,94	1,66	88,54	2,54	48,62	1,95	$t_{132,75} = 11,39$ $p < 0,0001$	$t_{141,94} = 12,45$ $p < 0,0001$
Área de superfície (μm^2)	517,62	17,43	837,13	31,03	662,77	31,80	$t_{121,19} = 8,98$ $p < 0,0001$	$t_{149} = 3,92$ $p < 0,0001$
Complexidade	8616,50	654,01	18323,00	1223,80	10469,60	1141,62	$t_{117,66} = 6,99$ $p < 0,0001$	$t_{149} = 4,68$ $p < 0,0001$
Vértice (Va)	9,64	0,34	15,27	0,78	8,97	0,35	$t_{104,72} = 6,59$ $p < 0,0001$	$t_{106,81} = 7,32$ $p < 0,0001$
Vértice (Vb)	7,92	0,39	14,82	0,83	6,46	0,40	$t_{109,45} = 7,56$ $p < 0,0001$	$t_{111,51} = 9,08$ $p < 0,0001$
Vértice (Vc)	3,63	0,21	7,05	0,39	3,09	0,25	$t_{117,98} = 7,69$ $p < 0,0001$	$t_{128,75} = 8,53$ $p < 0,0001$
Molecular								
Comprimento total dos ramos (μm)	423,45	12,59	482,64	15,14	314,55	8,59	$t_{148} = 2,98$ $p < 0,0035$	$t_{122,09} = 9,65$ $p < 0,0001$
Comprimento médio dos ramos (μm)	8,25	0,23	7,12	0,13	7,61	0,14	$t_{114,82} = -4,33$ $p < 0,0001$	$t_{155} = -2,58$ $p < 0,0109$
Número de segmentos	52,32	1,40	69,01	2,33	41,87	1,15	$t_{124,79} = 6,13$ $p < 0,0001$	$t_{112,41} = 10,42$ $p < 0,0001$
Área da superfície (μm^2)	698,31	24,29	930,52	33,98	509,62	20,70	$t_{137} = 5,56$ $p < 0,0001$	$t_{127,42} = 10,58$ $p < 0,0001$
Complexidade	9505,40	657,45	14724,00	1139,70	5651,30	460,59	$t_{122,11} = 3,97$ $p < 0,0001$	$t_{101,53} = 7,38$ $p < 0,0001$
Vértice Va)	9,35	0,27	11,42	0,41	7,76	0,21	$t_{131,8} = 4,18$ $p < 0,0001$	$t_{115,24} = 7,86$ $p < 0,0001$
Vértice (Vb)	7,21	0,37	10,22	0,44	5,94	0,26	$t_{148} = 5,15$ $p < 0,0001$	$t_{123,85} = 8,33$ $p < 0,0001$
Vértice (Vc)	3,43	0,22	5,05	0,31	3,43	0,22	$t_{136,6} = 4,23$ $p < 0,0001$	$t_{120,58} = 7,58$ $p < 0,0001$

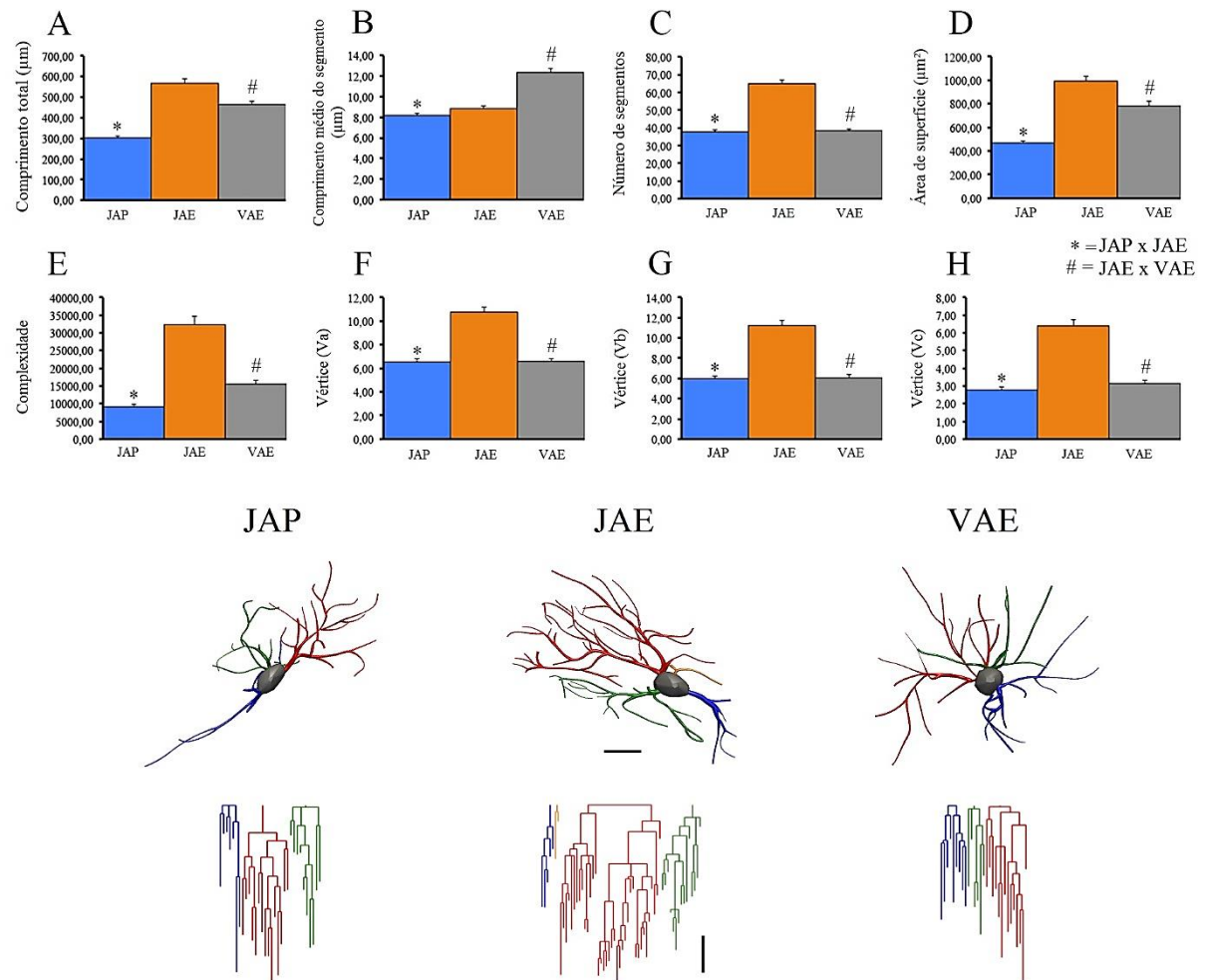


Figura 12: Influências do ambiente e envelhecimento sobre a morfologia dos astrócitos da camada granular do giro dentado. As representações gráficas da morfometria em 3D dos astrócitos da camada granular do giro dentado de camundongos adultos jovens dos ambientes empobrecido (JAP) e enriquecido (JAE) e de camundongos envelhecidos do ambiente enriquecido (VAE). Note que o envelhecimento e empobrecimento ambiental estão associados com encolhimento significativo do comprimento total dos ramos dos astrócitos (A), o número de segmentos (C), a área de superfície dos ramos (D), a complexidade (E) e vértices Va, Vb e Vc (F, G e H), respectivamente. Análise de segmento demonstrou que o ambiente empobrecido reduz o comprimento, área e volume dos segmentos (A e D). (*) indica diferenças estatisticamente significativas entre JAP e JAE; (#) indica diferenças significativas entre JAE e VAE. Escalas horizontais e verticais: 10 µm.

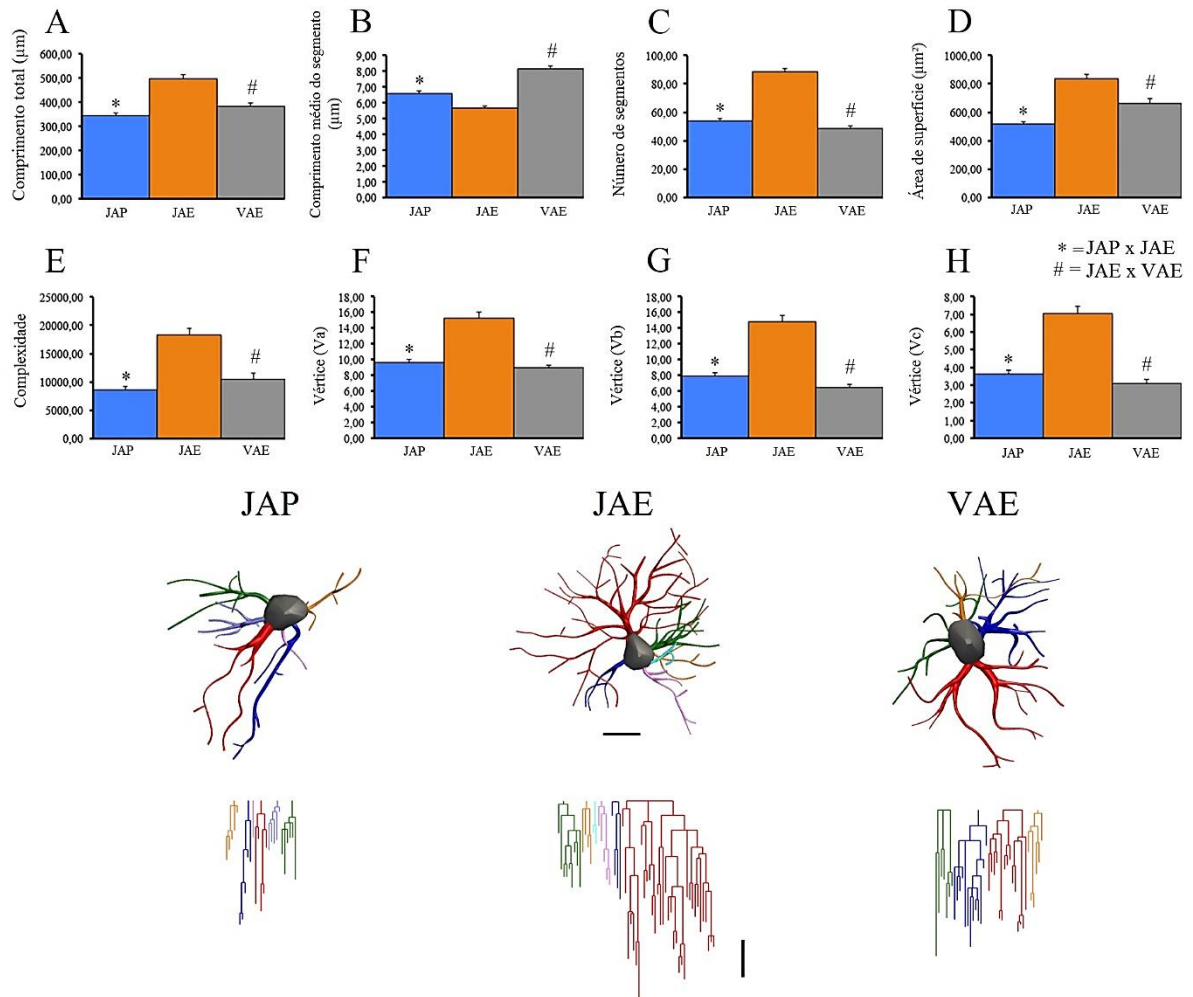


Figura 13: Influências do ambiente e envelhecimento sobre a morfologia dos astrócitos da camada polimórfica do giro dentado de camundongos adultos jovens dos ambientes empobrecido (JAP) e enriquecido (JAE) e de camundongos envelhecidos do ambiente enriquecido (VAE). Note que o envelhecimento e empobrecimento ambiental estão associados com o encolhimento significativo do comprimento total dos ramos dos astrócito (A), o número de segmentos (C), a área de superfície dos ramos (D), a complexidade (E) e vértices Va, Vb e Vc (F, G e H), respectivamente. Análise do segmento demonstrou que o ambiente empobrecido reduz o comprimento, área e volume dos segmentos (A e D). (*) indica diferenças estatisticamente significativas entre JAP e JAE; (#) indica diferenças significativas entre JAE e VAE. Escalas horizontais e verticais: 10 μm .

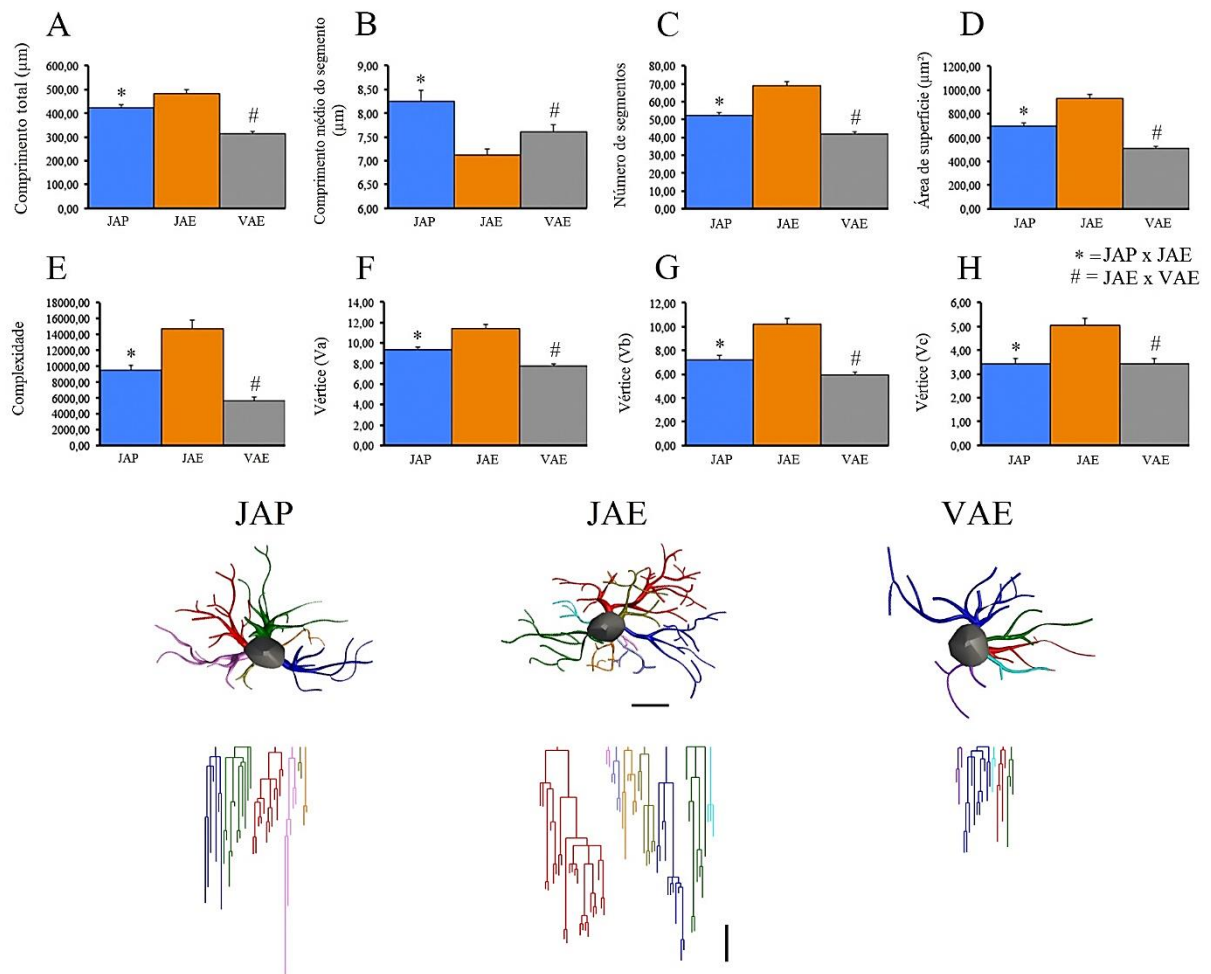


Figura 14: Influências do ambiente e envelhecimento sobre a morfologia dos astrócitos da camada molecular do giro dentado. As representações gráficas da morfometria em 3D dos astrócitos da camada molecular do giro dentado de camundongos adultos jovens dos ambientes empobrecido (JAP) e enriquecido (JAE) e de camundongos envelhecidos do ambiente enriquecido (VAE). Note que o envelhecimento e empobrecimento ambiental estão associadas com o encolhimento significativo do comprimento total dos ramos dos astrócitos (A), o número de segmentos (C), a área de superfície dos ramos (D), a complexidade (E) e vértices Va, Vb e Vc (F, G e H), respectivamente. Análise do segmento demonstrou que o ambiente empobrecido reduz o comprimento, área e volume dos segmentos (A e D). (*) indica diferenças estatisticamente significativas entre JAP e JAE; (#) indica diferenças significativas entre JAE e VAE. Escalas horizontais e verticais: 10 µm.

Dessa forma, sugerimos que o envelhecimento e o empobrecimento ambiental estão associados a arborização reduzida e a astrócitos menos ramificados.

4.3. DESEMPENHO NO TESTE DE MEMÓRIA SEMELHANTE À EPISÓDICA

Nos testes de memória semelhante à episódica, somente os animais do ambiente enriquecido, (JAE e VAE) tiveram habilidade para integrar reconhecimento de objetos em um contexto espaço-temporal. Os animais do ambiente empobrecido foram incapazes de fazer as distinções apropriadas (Figura 15).

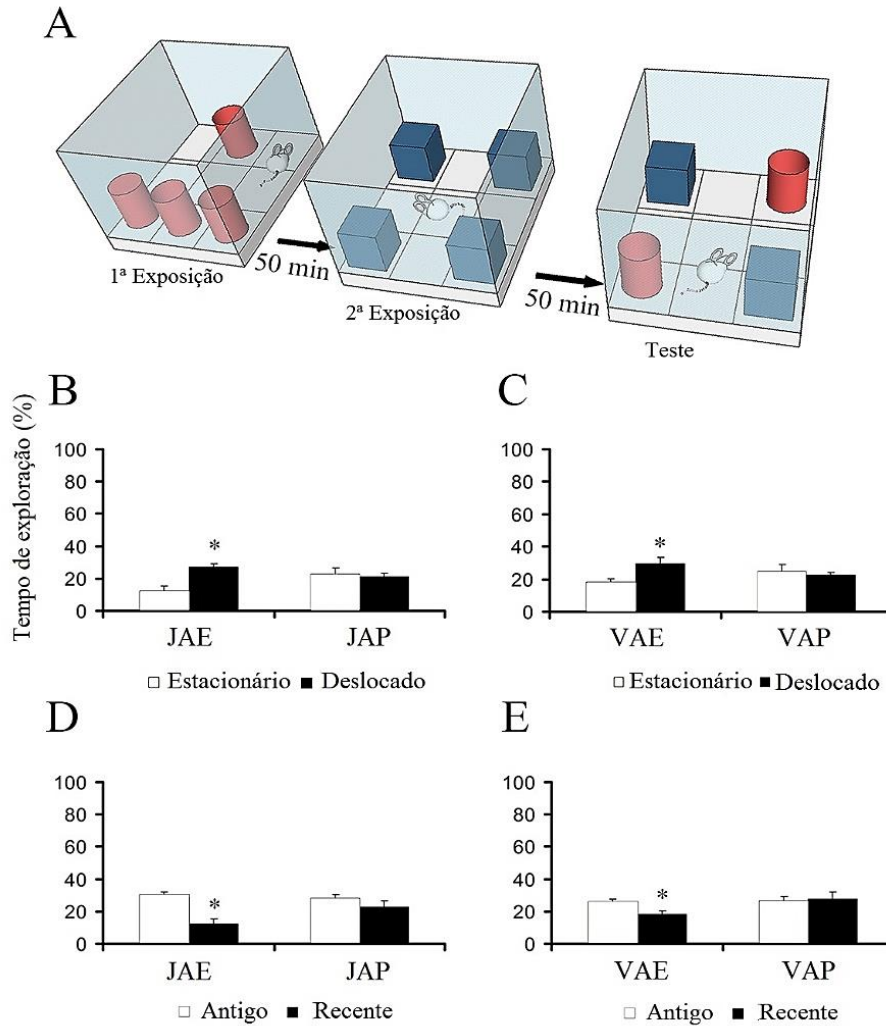


Figura 15: Representação gráfica dos resultados dos testes integrados de reconhecimento de objeto, com base em (Dere *et al.*, 2007). Desempenhos em valores percentuais estão indicados no eixo Y e os grupos experimentais estão indicados no eixo. As barras indicam os valores médios para erro padrão (\pm). Os dois gráficos à esquerda e os outros dois à direita correspondem respectivamente a grupos de jovens e velhos. VAE, camundongos envelhecidos que cresceram em ambiente enriquecido; VAP, camundongos envelhecidos que cresceram em ambiente empobrecido; JAE, camundongos jovens que cresceram em ambiente enriquecido; JAP, camundongos jovens que cresceram em ambiente empobrecido. (*ANOVA; $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A partir de trabalhos anteriores, tornou-se evidente que os camundongos mantidos em um ambiente enriquecido, mimetizando um estilo de vida ativo, expressam melhores resultados nas tarefas de memória espacial no labirinto aquático de Morris, e distinguem entre os objetos antigos e recentes, e entre os deslocados e estacionários no teste de memória semelhante à episódica. Em contraste, os camundongos mantidos em ambiente empobrecido em gaiolas padrão de laboratórios, perdem essas habilidades, e esses resultados comportamentais foram associados às mudanças numéricas distintas dos astrócitos nas diferentes camadas do giro denteado, e alteração morfológicas na camada molecular do giro denteado (DINIZ, *et al.*, 2010, DINIZ *et al.*, 2012). Aqui nós integramos os resultados dos estudos anteriores com a análise tridimensional morfológica dos astrócitos reconstruídos, testando a hipótese de que os efeitos benéficos do enriquecimento ambiental em camundongos, estão associados a melhor desempenho em testes de memória espacial e semelhante à episódica, e a maior complexidade morfológica dos astrócitos do giro denteado, e que estes eventos de alteração morfológica ocorrem em todas as camadas.

5.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS E AMOSTRAGEM ESTEREOLÓGICA SEM VIÉS

A amostragem que ocorre em todos os níveis de um projeto experimental deve ser aleatória e a estimativa livre de tendências a priori no sentido estatístico (West, 2012). Para detectar e quantificar os detalhes morfométricos ao longo de uma série de características morfológicas dos astrócitos em todas as camadas do giro denteado, usamos amostragem aleatória e sistemática estereológica (West, 1999) combinada à reconstrução tridimensional. Até agora não há resultados anteriores associando abordagem amostral estereológica com reconstruções microscópicas em 3D para avaliar fenótipos morfológicos de astrócitos no giro denteado de camundongos. Essa abordagem foi escolhida para garantir que todas as regiões da área de interesse tivessem a mesma probabilidade de serem incluídas na amostra (amostra sistemática e randomizada) e que os detalhes morfológicos mais finos (dos astrócitos em reconstrução 3D) pudessem ser quantificados em todos os grupos experimentais com métodos sem viés.

A partir desse método de amostragem, associada à estatística multivariada empregando análise de *cluster* (método de Ward) e análise discriminante das características morfométricas, encontramos que, com a exceção da camada polimórfica do giro dentado dos

camundongos adultos jovens do ambiente empobrecido - JAP (com três fenótipos morfológicos), dois tipos principais de astrócitos ocupam todas as camadas do giro dentado de fêmeas de camundongos suíços albinos adultos e envelhecidos. Constatamos também que alguns parâmetros morfológicos são suficientes para distinguir as alterações na forma dos astrócitos associadas às influências ambientais e da idade que incluem comprimento total, comprimento dos ramos, número de segmentos, área de superfície dos ramos, complexidade e análise dos vértices (Va, Vb e Vc). Como a complexidade foi, de longe, o recurso morfológico que mais contribuiu para a formação dos grupos, permitindo a distinção de influências ambientais e da idade sobre a morfologia dos astrócitos em todas as camadas, vamos discuti-la como base para a classificação morfológica dos astrócitos e possíveis implicações funcionais.

5.2. COMPLEXIDADE MORFOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS E DESEMPENHO NOS TESTES DE MEMÓRIA EPISÓDICA

A memória episódica permite uma distinção clara entre os objetos novos e familiares; para revisão consultar (Eichenbaum *et al.*, 2012; Pause *et al.*, 2013) em recentes trabalhos. Para lidar com as tarefas de memória, o cérebro deve acentuar as diferenças entre as experiências antigas e novas, antes de ocorrer a codificação (Schmidt *et al.*, 2012). Para esse efeito, as vias perfurantes medial e lateral transmitem informações espaciais e não-espaciais para o giro dentado, que são necessárias para o reconhecimento de localização do objeto (Onde?), da identidade (o quê?), e momento (quando?) em que o objeto de interesse foi encontrado. Porções laterais do córtex entorrinal projetam para os níveis caudais do giro dentado e do hipocampo, e porções mediais do córtex entorrinal projetam para os níveis rostrais (Witter *et al.*, 1989; Witter e Amaral, 1991). Constatamos em nossas análises prévias (Diniz *et al.*, 2010) que somente jovens adultos e camundongos idosos pertencentes ao ambiente enriquecido foram capazes de integrar o reconhecimento de objetos em um contexto espaço-temporal. Os indivíduos do ambiente empobrecido foram incapazes de fazer as distinções apropriadas. No componente espacial da memória semelhante a episódica (Onde?), os sujeitos jovens e idosos alojados em condições enriquecidas dedicaram, significativamente, maior parte do tempo com o objeto deslocado do que com o objeto estacionário (imóvel). Nos componentes o que? e quando? os animais jovens e idosos alojados em condições enriquecidas gastaram, significativamente mais tempo no objeto antigo do que no recente (Figura 15). Coerentemente, a análise de outros autores empregando camundongos idosos, encontraram resultados similares nos testes de memória semelhante à episódica (Tronche *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2013) e

memória de trabalho, e memória de reconhecimento da identidade do objeto (Da Silva Costa-Aze *et al.*, 2011).

A base fisiopatológica para essas deficiências da memória ainda não foram completamente elucidadas, mas o impacto do ambiente enriquecido em células gliais foi previamente descrito (Altman & Das, 1964). Nesse sentido, a novidade do presente trabalho está relacionada com a análise laminar das alterações morfológicas dos astrócitos do giro denteado associadas à idade e às alterações ambientais, utilizando uma combinação de abordagem de amostragem estereológica (sistemática e sem viés) e de reconstrução tridimensional.

Partindo da nossa análise estereológica prévia do giro denteado de camundongos idosos, encontramos, em comparação a secções equivalentes de jovens adultos criados nas mesmas condições, hiperplasia significativa de astrócitos na camada molecular. Coerentemente no nosso trabalho anterior (Diniz *et al.*, 2010), o grupo VAE, mas não o VAP, exibiu capacidade de formar memórias integradas no contexto espaço-temporal. No entanto, a camada molecular do giro denteado foi afetada aditivamente pelo ambiente e pelo envelhecimento; por conta desse efeito especulou-se que a astrocitose induzida pelo enriquecimento do ambiente pode ter um papel funcional diferente daquela induzida pelo envelhecimento. Paradoxalmente, nossos resultados preliminares das análises morfométricas na camada molecular do giro denteado, utilizando método de amostragem aleatória, mas não sistemática (Diniz *et al.*, 2012), confirmou sugestões anteriores no hipocampo de ratos velhos (Soffie *et al.*, 1999) de que os astrócitos do hipocampo dos indivíduos idosos do ambiente enriquecido, em comparação aos do ambiente empobrecidos, eram menores.

Aqui nós confirmamos nossos resultados morfológicos preliminares e os expandimos para as camadas granulares e polimórficas, para demonstrar que o empobrecimento ambiental e envelhecimento reduzem a complexidade morfológica, e diminuem os processos gliais dos astrócitos. Embora a base molecular dessas mudanças continue a ser investigada, é importante apresentar possíveis implicações associadas às influências do envelhecimento e do ambiente na morfologia dos astrócitos do giro denteado.

5.3. POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS DO AUMENTO NA COMPLEXIDADE DOS ASTRÓCITOS

Estudos recentes têm mostrado que, em comparação aos controles, quando as células progenitoras astrogliais humanas são transplantadas para o prosencéfalo de camundongos (Han *et al.*, 2013), revelam melhora na potenciação de longa duração (LTP) e aprendizagem. Em comparação aos de camundongos, os astrócitos humanos têm diâmetros de soma de 2,6 milímetros mais longo com 10 vezes mais processos GFAP-positivos, e ondas de cálcio 4 vezes mais rápidas (Oberheim *et al.*, 2009). Em conjunto, esses resultados sugerem que os astrócitos humanos mais complexos podem contribuir para melhorar o desempenho em tarefas de aprendizagem nos camundongos quiméricos.

No cérebro de roedor um único astrócito pode contatar centenas de milhares de sinapses (Halassa *et al.*, 2007; Halassa *et al.*, 2009; Halassa & Haydon, 2010). Esse complexo substrato morfológico ramificado fornece a base estrutural das interações funcionais com neurônios e outras células gliais e vasos sanguíneos (Reichenbach *et al.*, 2010). A partir de estimulação neuronal e estudos da morfologia dos astrócitos, aprendemos que os astrócitos reagem à estimulação neuronal mudando sua morfologia e a análise ultra estrutural da projeção alvo da região estimulada, e revela que a estimulação neuronal gera um aumento significativo do envoltório astrocítico em torno das sinapses excitatórias em espinhas dendríticas (Genoud *et al.*, 2006).

Como o enriquecimento ambiental, no presente trabalho, está associado a um maior grau de estimulação visuo-espacial, somatossensorial e motor de longa duração, melhores desempenhos em tarefas de memória episódica e astrócitos mais complexos foram encontrados no ambiente enriquecido, sugerimos que pelo menos parte dessa proteção cognitiva possa estar associada à plasticidade astrocítica. Realmente os astrócitos de camundongos do ambiente enriquecido exibem processos mais longos e mais ramificados que podem abranger um maior número de sinapses do que os astrócitos dos camundongos do ambiente empobrecido. Esse aumento das interações entre astrócitos e neurônios ocorrendo em todas as camadas do giro denteado talvez seja determinante para acentuar a contribuição do giro denteado para os melhores desempenhos nos testes de memória episódica. No entanto, como nós não quantificamos o número de sinapses envolvidas pelos astrócitos, utilizando análise ultraestrutura por microscopia eletrônica, essas hipóteses ainda precisam ser investigadas.

5.4. DECLÍNIO COGNITIVO NO ENVELHECIMENTO, EMPOBRECIMENTO AMBIENTAL E COMPLEXIDADE DOS ASTRÓCITOS.

Evidências crescentes indicam que o número de células que expressam biomarcadores de senescência celular aumentam com o envelhecimento e os astrócitos no cérebro envelhecido expressam fenótipos com características secretoras associada à senescência. De fato, astrócitos idosos mostram um aumento do nível de proteína ácida fibrilar glial e filamentos intermediários imunomarcados para vimentina, aumento na expressão de diversas citocinas (TNF α , IL-1 β e IL-6) no cérebro de rato (Campuzano *et al.*, 2009) e o aumento da acumulação de agregados proteotóxicos (Salminen *et al.*, 2011).

Permanece por ser investigado como essas mudanças afetariam a excitose do glutamato pelo astrócito nas células granulares no eixo entorrinal – giro denteado (através da via perfurante). Por esse mecanismo os astrócitos participam da intimidade dos circuitos sinápticos envolvidos no processamento cognitivo e no controle sináptico do input das fibras musgosas no sentido CA3 (Jourdain *et al.*, 2007). Além disso, mesmo na ausência de doença neurológica, um fenótipo de astrócito mais reativo é expresso durante o envelhecimento como parte de um perfil pró-inflamatório aumentado, podendo estar associado a disfunção cognitiva (Godbout e Johnson, 2009). Coerentemente, uma diminuição na capacidade dos ratos idosos a manterem a potenciação de longa duração (LTP) na via perfurante do giro dentado parece estar também relacionada com a ativação da micróglia (Lynch, 2010). Tomando estas observações em conjunto, é razoável sugerir que, em comparação aos indivíduos idosos alojados em condições enriquecidas, os indivíduos mantidos em condições empobrecidas podem ter um aumento no número de astrócitos de fenótipo secretor associados à senescência, reduzindo a complexidade dos astrócitos (Lynch, 2010).

5.5. LIMITAÇÕES DO PROJETO EXPERIMENTAL E ABORDAGENS TÉCNICAS

A primeira, mas não menos importante limitação do presente estudo está relacionada com a ausência de reconstruções tridimensionais dos astrócitos do grupo de camundongos idosos de ambiente empobrecidos. Embora tivéssemos dados preliminares de dois animais, esta pequena amostra exclui a possibilidade de comparar o impacto do envelhecimento e empobrecimento na morfologia dos astrócitos. Portanto, a nossa análise de efeitos do envelhecimento está limitada ao ambiente enriquecido.

Outra limitação importante é que além do envelhecimento e ambiente, os hormônios sexuais podem alterar o número e a morfologia das células gliais no hipocampo e no giro denteado (Lei *et al.*, 2003; Lâm & Leranth, 2003). De fato, camundongos fêmeas idosas C57Bl6J apresentam 35% mais astrócitos do que os machos da mesma idade (Mouton *et al.*, 2002). Além disso, já foi demonstrado um aumento da imunorreatividade da GFAP em camundongos idosos tratados com estradiol (Saravia *et al.*, 2007). No presente trabalho, as fêmeas idosas podem estar desprovidas de proteção estrogênica; assim, nós sugerimos que pelo menos uma parte das modificações morfológicas podem estar relacionadas com a estropausa. Em apoio a este raciocínio, camundongos fêmeas ovariectomizadas submetidas a reposição estrogênica mostraram redução do número de astrócitos no giro dentado em comparação um grupo placebo ovariectomizado (Lei *et al.*, 2003).

Além disso, a plasticidade dos astrócitos podem ser afetadas por corticosteroides, os quais inibem a ativação astrocítica (Liu *et al.*, 2008). No presente trabalho, pode-se argumentar que o estresse induzido pela manipulação durante os testes comportamentais pode ter alterado os níveis de corticosteroides plasmáticos e isso afetaria a plasticidade astrocítica. Nós não mensuramos os níveis de corticosteroides no plasma; portanto, não podemos excluir a possibilidade de que diferentes níveis de corticosteroides possam explicar os resultados. No entanto, testes comportamentais foram aplicados a todos os indivíduos de todos os grupos experimentais; assim, podemos excluir a possibilidade de que o estresse induzido pela manipulação possa explicar os resultados.

Finalmente, as influências do enriquecimento ambiental e do envelhecimento sobre alterações morfológicas de astrócitos e memória foram previamente investigadas em camundongos e ratos utilizando abordagens, modelos e técnicas diferentes (Soffie *et al.*, 1999; Diniz *et al.*, 2010a; Diniz *et al.*, 2010c; Williamson *et al.*, 2012; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014b) resultando, por vezes, em conclusões contraditórias. Essas contradições podem resultar de diferentes métodos, diferentes linhagens de animais, variações nos procedimentos histológicos, diferentes protocolos de estereologia, e ambiguidades na definição dos objetos e áreas de interesse. Para reduzir estas possíveis fontes de erro quando se comparam os grupos de animais, no presente trabalho, todas as amostras foram obtidas com os mesmos protocolos de processamento de tecido (perfusão, imunorreação, desidratação, contracoloração e lavagens) e todos os dados foram coletados e analisados com a mesma amostragem imparcial da abordagem, *software* e *hardware*. Para detectar possíveis variações nos critérios de identificação das características morfométricas dos objetos de interesse, submetemos os dados

coletados a procedimentos de verificação por diferentes investigadores, reconstruindo as mesmas células, usando o mesmo anticorpo monoclonal GFAP como marcador seletivo para astrócitos. Esperamos como resultado desses controles, minimizar possíveis variações associadas a fontes não-biológicas (Mouton *et al.*, 2002; Slomianka & West, 2005).

No entanto, uma limitação importante do estudo pode ser a precisão das medidas morfométricas. Reconstruções 3D microscópicas podem ser afetadas por fatores mecânicos associados com o seccionamento do vibrátomo e ao procedimento de desidratação, o que pode induzir a retração não-uniforme dos tecidos no eixo z (Hosseini-Sharifabad & Nyengaard, 2007). Assim, as estimativas de modificações nas dimensões x / y durante o processamento de tecidos não pode ser linearmente extrapolada a dimensão do eixo z. Essas restrições metodológicas impostas devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados do presente estudo. Recentemente, foi demonstrado que no eixo z (perpendicular à superfície de corte), as secções encolhem em média até cerca de 25% da espessura original do corte após a bateria de desidratação e lavagens (Carlo e Stevens, 2011). Com base nesses resultados, implementamos correções em todas as reconstruções dos astrócitos, assumindo 75% de retração da espessura do eixo z. Nenhuma correção foi aplicada para os eixos x / y, porque não se detectaram retrações ao longo desses eixos após a bateria de desidratação histológica.

Embora nenhum procedimento estereológico tenha sido realizado para estimar o número total de cada tipo de astrócitos nas áreas de interesse, os critérios para a seleção de astrócitos para reconstruções em 3D foram sistematicamente cegos e aleatórios em todas as análises. Além disso, utilizou-se um grande número de astrócitos para a reconstrução (688 astrócitos, 229 da camada polimórfica, 230 da camada granular e 229 da camada molecular do giro dentado); por conseguinte, é razoável supor que não exista, *à priori*, viés amostral introduzido pela nossa escolha de quais astrócitos usar para a reconstrução entre os possíveis.

6 - CONCLUSÃO

Em conclusão, nossas análises estereológica (anterior, Diniz *et al.* 2010) e morfométrica (atual) de astrócitos do giro denteado revelaram alterações significativas da distribuição laminar e morfologia dos astrócitos em resposta às mudanças ambientais (entre os grupos jovens) e envelhecimento (entre os grupos de mesmo ambiente) em fêmeas adultas de camundongos suíços albinos. A presença de plasticidade astrogliar associada às alterações de aprendizagem e memória nesses animais sugere que a redução da complexidade astrocítica pode estar contribuindo para alterar a fisiologia dos circuitos subjacentes ao declínio cognitivo observado nos animais que cresceram no ambiente empobrecido.

7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Albayram, O., et al. Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.**108**, p.11256-11261, Jul 5.2011.
- Allen, N.J., Barres, B.A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, v.457, p.675-677, Feb 5.2009.
- Altman, J. & Das, G.D. (1964) Autoradiographic Examination of the Effects of Enriched Environment on the Rate of Glial Multiplication in the Adult Rat Brain. *Nature*, **204**, 1161-1163.
- Argandoña, E.G., Bengoetxea, H. & Lafuente, J.V. (2009) Physical exercise is required for environmental enrichment to offset the quantitative effects of dark-rearing on the S-100beta astrocytic density in the rat visual cortex. *J Anat*, **215**, 132-140.
- Bell, J.A., Livesey, P.J. & Meyer, J.F. (2009) Environmental enrichment influences survival rate and enhances exploration and learning but produces variable responses to the radial maze in old rats. *Dev Psychobiol*, **51**, 564-578.
- Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S.G., Motori, E., Eriksson, T.M., Göbel, J., Yang, S.M., Conzelmann, K.K., Schinder, A.F., Götz, M. & Berninger, B. (2015) A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron*, **85**, 710-717.
- Bureš, Z., Bartošová, J., Lindovský, J., Chumak, T., Popelář, J. & Syka, J. (2014) Acoustical enrichment during early postnatal development changes response properties of inferior colliculus neurons in rats. *Eur J Neurosci*, **40**, 3674-3683.
- Bushong, E.A., et al. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, v.**22**, p.183-192, Jan 1.2002.
- Campuzano, O., Castillo-Ruiz, M.M., Acarin, L., Castellano, B. & Gonzalez, B. (2009) Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *Journal of neuroscience research*, **87**, 2484-2497.

- Carlo, C.N. & Stevens, C.F. (2011) Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. *J Comp Neurol*, **519**, 2803-2810.
- Christopherson, K.S., et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, v.**120**, p.421-433, Feb 11.2005.
- Cheng, L., Wang, S.H., Jia, N., Xie, M. & Liao, X.M. (2014) Environmental stimulation influence the cognition of developing mice by inducing changes in oxidative and apoptosis status. *Brain Dev*, **36**, 51-56.
- Da Silva Costa-Aze, V., Dauphin, F. & Boulouard, M. (2011) Serotonin 5-HT₆ receptor blockade reverses the age-related deficits of recognition memory and working memory in mice. *Behav Brain Res*, **222**, 134-140.
- Davis, K.E., Eacott, M.J., Easton, A. & Gigg, J. (2013) Episodic-like memory is sensitive to both Alzheimer's-like pathological accumulation and normal ageing processes in mice. *Behav Brain Res*, **254**, 73-82.
- Dere, E., Huston, J.P. & De Souza Silva, M.A. (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, **31**, 673-704.
- Diniz, D., CA, F., CM, R., DA, G., FR, d.O., JM, P., AA, d.S., TP, T., LS, T., MCP, T., EG, V., JB, T., C, C., VH, P., PF, V. & CWP, D. (2010a) Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *Eur J Neurosci*, **32**, 509-519.
- Diniz, D., Foro, C., Bento-Torres, J., Vasconcelos, P. & CW, P.-D. (2012) Aging, environmental enrichment, object recognition and astrocyte plasticity in dentate gyrus. In Gonzalez-Perez, O. (ed) *Astrocytes: Structure, Functions and Role in Disease*. Nova Science Publisher Inc, New York, pp. in press.
- Diniz, D.G., Foro, C.A., Rego, C.M., Gloria, D.A., de Oliveira, F.R., Paes, J.M., de Sousa, A.A., Tokuhashi, T.P., Trindade, L.S., Turiel, M.C., Vasconcelos, E.G., Torres, J.B., Cunningham,

- C., Perry, V.H., Vasconcelos, P.F. & Diniz, C.W. (2010b) Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *Eur J Neurosci*, **32**, 509-519.
- Diniz, D.G., Foro, C.A.R., Rego, C.M.D., Gloria, D.A., de Oliveira, F.R.R., Paes, J.M.P., de Sousa, A.A., Tokuhashi, T.P., Trindade, L.S., Turiel, M.C.P., Vasconcelos, E.G.R., Torres, J.B., Cunnigham, C., Perry, V.H., da Costa Vasconcelos, P.F. & Diniz, C.W.P. (2010c) Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *European Journal of Neuroscience*, **32**, 509-519.
- Donato, F., Chowdhury, A., Lahr, M. & Caroni, P. (2015) Early- and late-born parvalbumin basket cell subpopulations exhibiting distinct regulation and roles in learning. *Neuron*, **85**, 770-786.
- Droge, W., SCHIPPER, H.M. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*, v.6, p.361-370, Jun.2007.
- Ehninger, D. & Kempermann, G. (2003) Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex*, **13**, 845-851.
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R. & Lipton, P. (2012) Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. *Neurosci Biobehav Rev*, **36**, 1597-1608.
- Erickson, K.I., Weinstein, A.M. & Lopez, O.L. (2012) Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer's disease. *Arch Med Res*, **43**, 615-621.
- Fernández-Mayoralas, G., Rojo-Pérez, F., Martínez-Martín, P., Prieto-Flores, M.E., Rodríguez-Blázquez, C., Martín-García, S., Rojo-Abuín, J.M. & Forjaz, M.J. (2015) Active ageing and quality of life: factors associated with participation in leisure activities among institutionalized older adults, with and without dementia. *Aging Ment Health*, 1-11.
- Franklin, R.J. & Bussey, T.J. (2013) Do your glial cells make you clever? *Cell Stem Cell*, **12**, 265-266.

- Geinisman, Y., Bondareff, W. & Dodge, J.T. (1978) Hypertrophy of astroglial processes in the dentate gyrus of the senescent rat. *Am J Anat*, **153**, 537-543.
- Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E. & Knott, G.W. (2006) Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biol*, **4**, e343.
- Giaume, C., et al. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*, v.**11**, p.87-99, Feb.2010.
- Godbout, J.P. & Johnson, R.W. (2009) Age and Neuroinflammation: A Lifetime of Psychoneuroimmune Consequences. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, **29**, 321-337.
- Gomes-Leal, W., Silva, G.J., Oliveira, R.B. & Picanco-Diniz, C.W. (2002) Computer-assisted morphometric analysis of intrinsic axon terminals in the supragranular layers of cat striate cortex. *Anat Embryol (Berl)*, **205**, 291-300.
- Gregory, M.L. & Szumlinski, K.K. (2008) Impoverished rearing impairs working memory and metabotropic glutamate receptor 5 expression. *Neuroreport*, **19**, 239-243.
- Gómez-Pinilla, F., Dao, L. & So, V. (1997) Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res*, **764**, 1-8.
- Gómez-Pinilla, F., So, V. & Kesslak, J.P. (1998) Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. *Neuroscience*, **85**, 53-61.
- Halassa, M.M., Fellin, T. & Haydon, P.G. (2009) Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology*, **57**, 343-346.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.H. & Haydon, P.G. (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*, **27**, 6473-6477.

- Halassa, M.M. & Haydon, P.G. (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*, **72**, 335-355.
- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., Xu, Q., Oberheim, N.A., Bekar, L., Betstadt, S., Silva, A.J., Takano, T., Goldman, S.A. & Nedergaard, M. (2013) Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, **12**, 342-353.
- Han, M., et al. Bcl-2 over-expression fails to prevent age-related loss of calretinin positive neurons in the mouse dentate gyrus. *Mol Neurodegener*, v.1, p.9, 2006.
- Hosseini-Sharifabad, M. & Nyengaard, J.R. (2007) Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *J Neurosci Methods*, **162**, 206-214.
- Hosseiny, S., Pietri, M., Petit-Paitel, A., Zarif, H., Heurteaux, C., Chabry, J. & Guyon, A. (2014) Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. *Brain Struct Funct*.
- Huang, W., Ming, G.L. & Song, H. (2015) Experience matters: enrichment remodels synaptic inputs to adult-born neurons. *Neuron*, **85**, 659-661.
- Iso, H., SIMODA, S., MATSUYAMA, T. Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. *Behav Brain Res*, v.179, p.90-98, Apr 16.2007.
- Jinno, S. (2011) Regional and laminar differences in antigen profiles and spatial distributions of astrocytes in the mouse hippocampus, with reference to aging. *Neuroscience*, **180**, 41-52.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V. & Volterra, A. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature neuroscience*, **10**, 331-339.
- Ju, Y.J., et al. Decreased expression of DNA repair proteins Ku70 and Mre11 is associated with aging and may contribute to the cellular senescence. *Exp Mol Med*, v.38, p.686-693, Dec 31.2006.

- Junjaud, G., et al. Age-related effects of the neuromodulator D-serine on neurotransmission and synaptic potentiation in the CA1 hippocampal area of the rat. *J Neurochem*, v.**98**, p.1159-1166, Aug.2006.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, **386**, 493-495.
- Kobilo, T., Liu, Q.R., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y. & van Praag, H. (2011) Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*, **18**, 605-609.
- Kohman, R.A., Deyoung, E.K., Bhattacharya, T.K., Peterson, L.N. & Rhodes, J.S. (2011) Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain Behav Immun*.
- Komitova, M., et al. Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, v.**22**, p.852-860, Jul.2002.
- Kumar, A., Rani, A., Tchigranova, O., Lee, W.H. & Foster, T.C. (2012) Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiol Aging*, **33**, 828.e821-817.
- Leger, M., Quiedeville, A., Paizanis, E., Natkunarajah, S., Freret, T., Boulouard, M. & Schumann-Bard, P. (2012) Environmental enrichment enhances episodic-like memory in association with a modified neuronal activation profile in adult mice. *PLoS One*, **7**, e48043.
- Lee, S.Y., Haydon, P.G. Astrocytic glutamate targets NMDA receptors. *J Physiol*, v.**581**, p.887-888, Jun 15.2007.
- Lei, D.L., Long, J.M., Hengemihle, J., O'Neill, J., Manaye, K.F., Ingram, D.K. & Mouton, P.R. (2003) Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. *Neuroscience*, **121**, 659-666.

- Liu, W.L., Lee, Y.H., Tsai, S.Y., Hsu, C.Y., Sun, Y.Y., Yang, L.Y., Tsai, S.H. & Yang, W.C. (2008) Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia*, **56**, 1390-1400.
- Lovden, M., Xu, W. & Wang, H.X. (2013) Lifestyle change and the prevention of cognitive decline and dementia: what is the evidence? *Current opinion in psychiatry*, **26**, 239-243.
- Lynch, M.A. (2010) Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function. *Frontiers in aging neuroscience*, **1**, 6.
- Lâm, T.T. & Leranth, C. (2003) Gonadal hormones act extrinsic to the hippocampus to influence the density of hippocampal astroglial processes. *Neuroscience*, **116**, 491-498.
- Magistretti, P.J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*, v.**209**, p.2304-2311, Jun.2006.
- Mangialasche, F., Kivipelto, M., Solomon, A. & Fratiglioni, L. (2012) Dementia prevention: current epidemiological evidence and future perspective. *Alzheimers Res Ther*, **4**, 6.
- Maseda, A., Balo, A., Lorenzo-López, L., Lodeiro-Fernández, L., Rodríguez-Villamil, J.L. & Millán-Calenti, J.C. (2014) Cognitive and affective assessment in day care versus institutionalized elderly patients: a 1-year longitudinal study. *Clin Interv Aging*, **9**, 887-894.
- Mendes, F.e.C., de Almeida, M.N., Felício, A.P., Fadel, A.C., Silva, D.e.J., Borralho, T.G., da Silva, R.P., Bento-Torres, J., Vasconcelos, P.F., Perry, V.H., Ramos, E.M., Picanço-Diniz, C.W. & Sosthenes, M.C. (2013) Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. *BMC Neurosci*, **14**, 63.
- Merkley, C.M., Jian, C., Mosa, A., Tan, Y.F. & Wojtowicz, J.M. (2014) Homeostatic regulation of adult hippocampal neurogenesis in aging rats: long-term effects of early exercise. *Front Neurosci*, **8**, 174.
- Mothet, J.P., et al. A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging Cell*, v.**5**, p.267-274, Jun.2006.

- Mouton, P.R., Long, J.M., Lei, D.L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M.E. & Ingram, D.K. (2002) Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*, **956**, 30-35.
- Murphy, G.G., et al. Investigation of age-related cognitive decline using mice as a model system: neurophysiological correlates. *Am J Geriatr Psychiatry*, v.14, p.1012-1021, Dec.2006.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A. & Nedergaard, M. (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*, **29**, 3276-3287.
- Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S. & Nedergaard, M. (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*, **29**, 547-553.
- Panatier, A., Theodosis, D. T., Mothet, J. P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D. A., Oliet, S. H. R. Glial control of NMDA receptor activity contributes to synaptic memory. *Cell* **125**: 775–784, 2006.
- Pause, B.M., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Pietrowsky, R. & Dere, E. (2013) Perspectives on episodic-like and episodic memory. *Front Behav Neurosci*, **7**, 33.
- Pedrero-Chamizo, R., Albers, U., Tobaruela, J.L., Meléndez, A., Castillo, M.J. & González-Gross, M. (2013) Physical strength is associated with Mini-Mental State Examination scores in Spanish institutionalized elderly. *Geriatr Gerontol Int*, **13**, 1026-1034.
- Perea, G. & Araque, A. (2010) GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev*, **63**, 93-102.
- Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, **32**, 421-431.
- Perea, G., Araque, A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*, v.317, p.1083-1086, Aug 24.2007.

- Pilegaard, K., Ladefoged, O. Total number of astrocytes in the molecular layer of the dentate gyrus of rats at different ages. *Anal Quant Cytol Histol*, v.**18**, p.279-285, Aug.1996.
- Pillai, A.G., de Jong, D., Kanatsou, S., Krugers, H., Knapman, A., Heinzmann, J.M., Holsboer, F., Landgraf, R., Joëls, M. & Touma, C. (2012) Dendritic morphology of hippocampal and amygdalar neurons in adolescent mice is resilient to genetic differences in stress reactivity. *PLoS One*, **7**, e38971.
- Ramírez-Rodríguez, G., Ocaña-Fernández, M.A., Vega-Rivera, N.M., Torres-Pérez, O.M., Gómez-Sánchez, A., Estrada-Camarena, E. & Ortiz-López, L. (2014) Environmental enrichment induces neuroplastic changes in middle age female Balb/c mice and increases the hippocampal levels of BDNF, p-Akt and p-MAPK1/2. *Neuroscience*, **260**, 158-170.
- Reichenbach, A., Derouiche, A. & Kirchhoff, F. (2010) Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res Rev*, **63**, 11-25.
- Rocha, E.G., Santiago, L.F., Freire, M.A.M., Gomes-Leal, W., Dias, I.A., Lent, R., Houzel, J.C., Franca, J.G., Pereira, A. & Picanco-Diniz, C.W. (2007) Callosal axon arbors in the limb representations of the somatosensory cortex (SI) in the agouti (*Dasyprocta prinnolopha*). *Journal of Comparative Neurology*, **500**, 255-266.
- Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M. & Soininen, H. (2011) Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci*, **34**, 3-11.
- Sampedro-Piquero, P., Begega, A. & Arias, J.L. (2014a) Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: relations to spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors. *Physiol Behav*, **129**, 118-129.
- Sampedro-Piquero, P., De Bartolo, P., Petrosini, L., Zancada-Menendez, C., Arias, J.L. & Begega, A. (2014b) Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats. *Neurobiol Learn Mem*, **114**, 16-25.

- Saravia, F., Beauquis, J., Pietranera, L. & De Nicola, A.F. (2007) Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology*, **32**, 480-492.
- Schweitzer, L. & Renehan, W.E. (1997) The use of cluster analysis for cell typing. *Brain Res Brain Res Protoc*, **1**, 100-108.
- Sirevaag, A.M., Greenough, W.T. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries. *Brain Res*, v.**424**, p.320-332, Oct 27.1987.
- Sirevaag, A.M., Greenough, W.T. Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments. *Brain Res*, v.**540**, p.273-278, Feb 1.1991.
- Small, B.J., Dixon, R.A., McArdle, J.J. & Grimm, K.J. (2012) Do changes in lifestyle engagement moderate cognitive decline in normal aging? Evidence from the Victoria Longitudinal Study. *Neuropsychology*, **26**, 144-155.
- Soffie, M., Hahn, K., Terao, E. & Eclancher, F. (1999) Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res*, **101**, 37-49.
- Speisman, R.B., Kumar, A., Rani, A., Foster, T.C. & Ormerod, B.K. (2013a) Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. *Brain Behav Immun*, **28**, 25-43.
- Speisman, R.B., Kumar, A., Rani, A., Pastoriza, J.M., Severance, J.E., Foster, T.C. & Ormerod, B.K. (2012) Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol Aging*.
- Speisman, R.B., Kumar, A., Rani, A., Pastoriza, J.M., Severance, J.E., Foster, T.C. & Ormerod, B.K. (2013b) Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol Aging*, **34**, 263-274.

- Steele, G.E. & Weller, R.E. (1995) Qualitative and quantitative features of axons projecting from caudal to rostral inferior temporal cortex of squirrel monkeys. *Vis Neurosci*, **12**, 701-722.
- Stranahan, A.M. & Mattson, M.P. (2012) Metabolic reserve as a determinant of cognitive aging. *J Alzheimers Dis*, **30 Suppl 2**, S5-13.
- Suzuki, H., Kanagawa, D., Nakazawa, H., Tawara-Hirata, Y., Kogure, Y., Shimizu-Okabe, C., Takayama, C., Ishikawa, Y. & Shiosaka, S. (2014) Role of neuropsin in parvalbumin immunoreactivity changes in hippocampal basket terminals of mice reared in various environments. *Front Cell Neurosci*, **8**, 420.
- Teather, L.A., et al. Environmental conditions influence hippocampus-dependent behaviours and brain levels of amyloid precursor protein in rats. *Eur J Neurosci*, v.**16**, p.2405-2415, Dec.2002.
- Teather, L.A. & Wurtman, R.J. (2005) Dietary CDP-choline supplementation prevents memory impairment caused by impoverished environmental conditions in rats. *Learn Mem*, **12**, 39-43.
- Teather, L.A. & Wurtman, R.J. (2006) Chronic administration of UMP ameliorates the impairment of hippocampal-dependent memory in impoverished rats. *J Nutr*, **136**, 2834-2837.
- Todd, K.J., et al. Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris*, v.**99**, p.75-83, Mar-May.2006.
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A. & Oliet, S.H. (2008) Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev*, **88**, 983-1008.
- Tronche, C., Lestage, P., Louis, C., Carrie, I. & Béracochéa, D. (2010) Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice. *Behav Brain Res*, **215**, 255-260.
- Tyndall, A.V., Davenport, M.H., Wilson, B.J., Burek, G.M., Arsenault-Lapierre, G., Haley, E., Eskes, G.A., Friedenreich, C.M., Hill, M.D., Hogan, D.B., Longman, R.S., Anderson, T.J., Leigh, R., Smith, E.E. & Poulin, M.J. (2013) The brain-in-motion study: effect of a 6-month aerobic

exercise intervention on cerebrovascular regulation and cognitive function in older adults. *BMC Geriatr*, **13**, 21.

Ullian, E.M., Christopherson, K.S., Barres, B.A. Role for glia in synaptogenesis. *Glia*, v.**47**, p.209-216, Aug 15.2004.

Vallès, A., Granic, I., De W CHRISTOPHERSON eerd, P. & Martens, G.J. (2014) Molecular correlates of cortical network modulation by long-term sensory experience in the adult rat barrel cortex. *Learn Mem*, **21**, 305-310.

van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C. & Gage, F.H. (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, **25**, 8680-8685.

Ventura, R., HARRIS, K.M. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci*, v.**19**, p.6897-6906, Aug 15.1999.

Viola, G.G., et al. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res*, v.1274, p.47-54, Jun 5.2009.

Volkers, K.M. & Scherder, E.J. (2011) Impoverished environment, cognition, aging and dementia. *Rev Neurosci*, **22**, 259-266.

Wang, D.D., Bordey, A. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*, v.86, p.342-367, Dec 11.2008.

Wenzel, J., et al. The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain. *Brain Res*, v.**560**, p.122-131, Sep 27.1991.

West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci*, **22**, 51-61.

- West, M.J. (2012) Systematic versus random sampling in stereological studies. *Cold Spring Harb Protoc*, **2012**.
- Williamson, L.L., Chao, A. & Bilbo, S.D. (2012) Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain Behav Immun*, **26**, 500-510.
- Windrem, M.S., Schanz, S.J., Guo, M., Tian, G.F., Washco, V., Stanwood, N., Rasband, M., Roy, N.S., Nedergaard, M., Havton, L.A., Wang, S. & Goldman, S.A. (2008) Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell*, **2**, 553-565.
- Winocur, G. (1998) Environmental influences on cognitive decline in aged rats. *Neurobiol Aging*, **19**, 589-597.
- Yuan, Z., Wang, M., Yan, B., Gu, P., Jiang, X., Yang, X. & Cui, D. (2012) An enriched environment improves cognitive performance in mice from the senescence-accelerated prone mouse 8 strain: Role of upregulated neurotrophic factor expression in the hippocampus. *Neural Regen Res*, **7**, 1797-1804.
- Zalik, E. & Zalar, B. (2013) Differences in mood between elderly persons living in different residential environments in Slovenia. *Psychiatria Danubina*, **25**, 40-48.
- Zhang, Y. & Barres, B.A. (2013) A smarter mouse with human astrocytes. *Bioessays*.
- Zhang, X., Zhang, J., Chen, C. Long-term potentiation at hippocampal perforant path-dentate astrocyte synapses. *Biochem Biophys Res Commun*, v.**383**, p.326-330, Jun 5.2009.
- Zhao, E., Tranovich, M.J. & Wright, V.J. (2014) The role of mobility as a protective factor of cognitive functioning in aging adults: a review. *Sports Health*, **6**, 63-69.

ANEXO I



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 II

Title: Lower complexity of astrocytes morphology in mouse dentate gyrus is associated with impaired performance on episodic-like memory tasks

Authors: ^(1,3)Daniel Guerreiro Diniz; ⁽¹⁾Marcus Augusto de Oliveira; ⁽¹⁾Camila Mendes de Lima; ⁽¹⁾César Augusto Raiol Fôro; ⁽¹⁾Marcia Consentino Kronka Sosthenes; ⁽²⁾Pedro Fernando da Costa Vasconcelos; ⁽³⁾Daniel Clive Anthony and ^(1,3)Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Number of pages: 41

Number of figures: 14

Number of tables: 3

Affiliations:

⁽¹⁾Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Rua dos Mundurucus 4487, Guamá, CEP 66.073-000 Belém, Pará, Brasil

⁽²⁾Instituto Evandro Chagas, Departamento de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Ananindeua, Pará, Brasil.

⁽³⁾Laboratory of Experimental Neuropathology at the Department of Pharmacology of the University of Oxford, Oxford, England, UK.

^(*)Corresponding author:

Name: Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Address: Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Morfologia, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Rua Mundurucus 4487, Guamá, CEP 66.073-000 Belém, Pará, Brasil, Phone/Fax 0055(91)3201-6756, e-mail: cwpdiniz@gmail.com

RUNNING TITLE: Dentate gyrus astrocyte morphology and memory

Key words: Environment, aging, brain plasticity, astrocytes morphology and dentate gyrus.

EJN Session: Behavioral Neuroscience

To: Professor Jeffrey W. Dalley, University of Cambridge, UK

ABSTRACT

During our previous study, mice (*Mus musculus*) maintained in an impoverished environment that mimicked a sedentary lifestyle from weaning generally performed worse on spatial memory tasks (the Morris water maze) and did not distinguish between old and recent or between displaced and stationary objects in episodic-like memory tests. In contrast, mice maintained in enriched cages for equal time preserved those abilities. These behavioral outcomes were associated with layer-dependent, numerical astrocytic changes. Using the same serial anatomical sections selectively immunolabeled for glial fibrillary acid protein from the previous study, we tested the hypothesis that environmental impoverishment would reduce the morphological complexity of astrocytes, and that such changes would be associated with learning and memory decline. We used three-dimensional microscopic reconstructions and unbiased systematic and random sampling approaches to select astrocytes from the polymorphic, granular, and molecular layers of the dentate gyrus. Cluster and discriminant analysis of three-dimensional astrocytic morphometric features from each layer and experimental group revealed two main morphological phenotypes. Type I astrocytes were more complex than type II; they exhibited larger tree areas, larger tree volumes, more segments, and more vertices. Integrated analysis with previous behavioral findings from the same animals revealed that the reductions in morphological complexity observed in young mice from impoverished and aged mice from enriched environments were observed in both astrocyte types in all layers of the dentate gyrus. We suggest that long-term environmental impoverishment and aging effects on astrocyte plasticity may represent at least part of the circuitry changes underlying learning and memory decline.

INTRODUCTION

Epidemiological studies have correlated physical and cognitive inactivity with a greater risk of age-related cognitive decline (Erickson *et al.*, 2012; Tyndall *et al.*, 2013). In

contrast, an active lifestyle may help prevent cognitive impairment in old age (Small *et al.*, 2012; Pedrero-Chamizo *et al.*, 2013; Fernández-Mayoralas *et al.*, 2015); for recent reviews see (Mangialasche *et al.*, 2012; Stranahan & Mattson, 2012; Lovden *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). Consistent with this view, the decline in memory that is associated with normal or pathological aging appears to be aggravated after institutionalization (Volkers & Scherder, 2011; Zalik & Zalar, 2013). Institutionalization is associated with an impoverished-like environment with reduced sensory-motor and cognitive stimulation, social interactions, and physical activity, which contribute to a sedentary lifestyle (Volkers & Scherder, 2011; Pedrero-Chamizo *et al.*, 2013; Maseda *et al.*, 2014; Fernández-Mayoralas *et al.*, 2015).

Similarly, it has been demonstrated that aged mice and rats maintained in the impoverished environment of standard laboratory cages perform worse in learning and memory tasks than those living in an enriched environment (Winocur, 1998; Teather & Wurtman, 2005; 2006; Gregory & Szumlinski, 2008; Bell *et al.*, 2009; Diniz *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012; Speisman *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013; Speisman *et al.*, 2013a; Speisman *et al.*, 2013b).

Cellular and molecular analyses of these events demonstrate that the beneficial effects of environmental enrichment with voluntary exercise are associated with a variety of neuronal and neuroimmunological changes in both young and aged individuals (Kempermann *et al.*, 1997; van Praag *et al.*, 2005; Kobilko *et al.*, 2011; Leger *et al.*, 2012; Speisman *et al.*, 2013a; Bureš *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2014; Hosseiny *et al.*, 2014; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014a; Suzuki *et al.*, 2014; Vallès *et al.*, 2014). However, many of the known details of cellular and molecular changes in the dentate gyrus that have been associated with environmental changes are neuronal in scope (Merkley *et al.*, 2014; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2014; Bergami *et al.*, 2015; Donato *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015). Few reports have been dedicated to describing glial numerical changes in correlation with age-related cognitive decline in learning and memory (Soffie *et al.*, 1999; Diniz *et al.*, 2010; Kohman *et al.*, 2012; Sampedro-Piquero *et*

al., 2014b). Regarding astrocytic morphology, even less is known about the influences of environment or age using microscopic three-dimensional reconstruction. We decided to investigate the influences of environment and aging on astrocyte morphology in the dentate gyrus molecular, granular, and polymorphic layers, using three-dimensional (3-D) microscopy, reconstruction, and an unbiased stereological sampling approach.

Reinforcing the appropriateness of that choice, recent studies have shown that when human astroglial progenitor cells were transplanted into mouse forebrains (Han *et al.*, 2013), long-term potentiation and learning improved in mice with transplanted human cells compared with controls. In those chimeric mice, large regions of the CNS, including the hippocampus, consisted of mouse neurons (and oligodendrocytes) surrounded by human astrocytes and progenitor cells (Windrem *et al.*, 2008). These authors subjected both transplanted and control mice to a battery of learning and memory tasks, and found that chimeric mice demonstrated enhanced performance on all tests. Those findings suggested that human astrocytes might contribute significantly (at least in part) to the processes that make human cognition superior to mouse cognition (Franklin & Bussey, 2013; Zhang & Barres, 2013). Coincidentally, human astrocytes are larger and structurally more complex than mouse astrocytes (Oberheim *et al.*, 2006). Compared with mouse astrocytes, human astrocytes have soma diameters 2.6 mm longer, with 10-fold more glial fibrillary acid protein (GFAP)-positive processes and 4-fold faster calcium waves (Oberheim *et al.*, 2009).

Taken together, those findings raised important questions related to astrocytic morphology and cognition. For example, could astroglia in the dentate gyrus with more complex morphologies be associated with stronger performance in object identity tasks? If so, do these morphological and behavioral correlations apply to all layers of the dentate gyrus? Here, we integrated our previous stereological laminar analysis of dentate gyrus astrocytes and behavior with new morphological findings from the same mice to investigate these questions.

METHODS

Animals and experimental groups

Detailed experimental procedures have been previously described elsewhere (Diniz *et al.*, 2010). Here, we report only essential information for text clarity. Seventy-one albino Swiss female young adult (6 months) and aged (20 months) mice were housed from weaning in enriched conditions (n=42) or impoverished conditions (n=29). These formed four experimental groups: enriched environment, young adults (EY, n=12); impoverished environment, young adults (IY n=13); enriched environment, aged adults (EA, n=30); and impoverished environment, aged adults (IA n=16). Enriched conditions comprised 2-level wire cages (100×50×100 cm) equipped with ropes, rod bridges, tunnels, running wheels, and toys. Toys were made of different forms of plastic, wood, and metal of different colors, and were changed periodically. Each enriched cage housed 12-15 young and aged mice. Water and food were delivered to the top and bottom levels, respectively. This obliged mice to move from one compartment to another for drinking and eating. Impoverished conditions comprised plastic cages (32×39×100 cm) without equipment or toys. Each impoverished cage housed 12-13 young and aged mice. All mice had free access to water and food. In addition, 12-h dark and light cycles were maintained. Behavioral tests were administered during the light cycle. The results from episodic-like and water maze tasks are published elsewhere (Diniz *et al.*, 2010).

Perfusion and histological procedures

At the end of the water behavioral tests, 5 to 9 animals from each experimental group were weighed and sacrificed with an overdose of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) (Konig Laboratories). They were then perfused transcardially with heparinized saline for 10 min, followed by an aldehyde fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2-7.4) for 30 min. All other chemicals were purchased from Sigma (São Paulo, Brazil). After perfusion and

craniotomy, the brains were removed and cut on a vibratome (70 μ m thickness). One of each 5 sections was used to detect GFAP by free-floating immunohistochemistry. Free-floating sections were rinsed once in 0.1 M phosphate buffer, transferred to 0.2 M boric acid pH 9.0, heated to 65-70°C for 1 h, and then washed 3 \times 5 min in 5% PBST. The sections were incubated under constant shaking in a 1% hydrogen peroxide solution in methanol for 10 min, then rinsed 2 \times 2 min in 0.1 M PBS. The sections were blocked with immunoglobulin for 1 h using the Mouse-on-Mouse Immunodetection kit (M.O.M. kit, Vector Laboratories, USA) according to the manufacturer's instructions. Blocking was followed by washing for 3 \times 2 min in PBS. Sections were incubated in a working solution of protein concentrate for 5 min, then incubated with monoclonal mouse anti-GFAP primary antibody (MAB360, CHEMICON Int., USA), diluted in protein concentrate solution (M.O.M. kit), at 4°C for 3 days with continuous, gentle agitation. Next, the sections were washed 3 \times 2 min in PBS and incubated for 20 h with biotinylated horse anti-mouse secondary antibody (M.O.M. kit), diluted 1:100 in PBS. After washing 3 \times 2 min in PBS, sections were transferred to an avidin-biotin-peroxidase complex solution (ABC, Vector Laboratories, USA, 1:200) for 1.5 h, washed 3 \times 2 min in 0.1 M PBS, and processed with the glucose oxidase-DAB-nickel method and peroxidase histochemistry (Shu, Ju, & Fan, 1988).

The reaction was interrupted after fine astrocytic branches were detected under the microscope. Sections were rinsed 4 \times 5 min in 0.1 M PBS, mounted on gelatinized slides, dehydrated in alcohol and xylene, and coverslipped with Enthelan (Merck). Five animals from each group with complete GFAP immunohistochemistry slide collections that contained conspicuous morphological details of astrocytes were used for 3-D reconstruction and morphometric analysis.

3-D astrocyte reconstruction and quantitative morphology

We selected five brains from each experimental group for GFAP immunolabeling and 3-D reconstruction. To analyze brain sections, we used a NIKON Eclipse 80i microscope (Nikon, Japan) equipped with a motorized stage (MAC6000, Ludl Electronic Products,

Hawthorne, NY, USA). Astrocytes from different layers of interest were analyzed under oil immersion, with a high-resolution, 100× oil immersion, plan fluoride objective (Nikon, NA 1.3, DF = 0.19 μm). Images were acquired with NeuroLucida and analyzed with NeuroLucida explorer software (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, USA). Although shrinkage in the z-axis is not a linear event, the software used in the present study corrected the shrinkage in the z-axis, based on previous evidence of 75% shrinkage (Carlo & Stevens, 2011). Without correction, this shrinkage would significantly distort the length measurements along this axis. Only cells with processes that were unequivocally complete were included for 3-D analysis; cells were discarded when branches appeared artificially cut or not fully immunolabeled. Terminal branches were typically thin.

Morphometric analysis and statistics

To accomplish the analysis we used 15 animals, five from each experimental group (IY, n = 5; EY, n = 5; EA, n = 5). Because only two aged animals from the impoverished group featured complete GFAP immunohistochemistry of the brain sections, we removed this group from the morphometric analysis. Therefore, the morphological analysis of astrocytes was limited to IY, EY, and EA.

From these three groups, we digitally reconstructed 688 astrocytes in 3-D: 229 from the polymorphic layer (EY = 78, IY = 78, EA = 73), 230 from the granular layer (EY = 75, IY = 77, EA = 78), and 229 from the molecular layer (EY = 78, IY = 72, EA = 79) of the dentate gyrus. Astrocytes were selected from each layer in an unbiased, randomized, and systematic way (Fig. 1). We used architectonic differences in the neuropil region, readily visible in immunolabeled sections, to define the limits of the dentate gyrus layers of the hippocampus. Systematic and random samples were taken from a series of sections containing dorsal and ventral dentate gyrus to guarantee that all regions had the same probability of being included among the analyzed samples. Each box inside the outlined dentate gyrus layers indicates a site

from which we selected a single astrocyte for 3-D reconstruction (Fig. 1). Selected cells were reconstructed from dentate gyrus sections where we were able to unambiguously recognize the layer limits.

We first investigated the presence of morphological features shared by the astrocytes observed in each layer of interest in our sample, inside each experimental group. We subjected all morphometric quantitative variables of each group separately to an initial cluster analysis (Ward's hierarchical clustering method), which included all animals from each group. This method is most appropriate for quantitative variables, and not binary variables. Cluster analysis encompasses a number of different classification algorithms applied to a wide variety of research problems (Steele & Weller, 1995; Schweitzer & Renehan, 1997; Gomes-Leal *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2007); they are mostly used when one does not have an *a priori* hypothesis about which objects belong to a specific cluster group. We applied this multivariate statistical procedure to our sample of astrocytes in order to search for potential astroglial morphological classes inside each layer of each experimental group. The classification of astrocytes suggested by cluster analysis was assessed using a forward stepwise discriminant function analysis performed with Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, OK). Discriminant function analysis was used to determine which variables discriminate between two or more naturally occurring groups. The idea underlying this procedure is to determine whether groups differ with regard to the mean of a variable, and then to use that variable to predict group membership. In the present study, we used this software to perform comparisons between matrices of total variances and co-variances. These matrices were compared using multivariate F tests to determine whether there were any significant between-group differences (with regard to all variables). In the step-forward discriminant function analysis, the program builds a model of discrimination step-by-step. In this model, at each step, all variables are reviewed and evaluated to determine which variable contributes most to the discrimination between groups. We applied this procedure to determine morphometric

variables that provided the best separation between the astroglial classes suggested by the cluster analysis. In addition, we calculated the arithmetic mean and standard deviation for the variables chosen as the best predictors for the astroglial groups. Parametric statistical analyses with *t*-tests were applied to compare groups of astrocytes inside each experimental group and to detect possible morphological differences between average astrocytes from the layers of each experimental group. In the selected sections, the margins of the polymorphic, granular, and molecular layers were clearly distinguished with Nissl counterstaining.

We performed a cluster analysis (Ward's method) based on the measurement of 30 morphometric features of astrocytes, 10 related to the soma and 20 to the branches, as follows: 1. Soma area (μm^2); 2. Soma perimeter; 3. Ferret minimum diameter; 4. Ferret maximum diameter (maximum diameter in a shape); 5. Compactness; 6. Form factor; 7. Solidity; 8. Roundness; 9. Aspect ratio; 10. Convexity; 11. Branch length (μm); 12. Total tree length (μm); 13. Surface area (μm^2); 14. Branch volume (μm^3); 15. Segments/mm; 16. Tortuosity; 17. Fractal dimensions (k-dim); 18. Base diameter of the primary branch (μm); 19. Total number of segments; 20. Number of varicosities; 21. Planar angle; 22. Number of trees; 23. Complexity; 24. Convex hull volume; 25. Convex hull surface; 26. Convex hull area; 27. Convex hull perimeter; 28. Vertex Va; 29. Vertex Vb; 30. Vertex Vc. Table I contains descriptions of all morphometric variables used.

Please insert Table I here

All microglia from each area or lamina of interest were measured multiple times, and dedicated software (Neurolucida explorer, MicroBright Field Inc.) was used to process data obtained with Neurolucida. We search for environmental influences in the morphology of astrocytes from young mice, comparing IY and EY, and compared the findings from EY and EA to search for age-related influences on astrocytes' morphological features.

RESULTS

Laminar analysis of astrocyte morphology in the mouse dentate gyrus

We used microscopic 3-D reconstructions and an unbiased, systematic, randomized sampling approach to select astrocytes from the polymorphic, granular, and molecular layers of the dentate gyrus. While astrocytes from the polymorphic layer of IY mice possessed three morphological phenotypes, all other layers from all experimental groups possessed two main astrocyte morphology types. Figures 2-10 depict cluster and discriminant analysis to illustrate these findings, together with 3-D reconstructions of astrocytes with morphological features close to the “mean astrocyte” of each cluster of the granular (Figs. 2-4), polymorphic (Figs. 5-7), and molecular (Figs. 8-10) layers of the dentate gyrus from all experimental groups.

The cluster analysis of the morphological features of astrocytes from EY (Figs. 2, 5, and 8), and EA (Figs. 4, 7, and 10) mice, regardless of layer, revealed two main types of astrocytes that we designated type I and type II. On average, and among all three layers of the dentate gyrus, the type I morphological phenotype featured larger tree areas; higher K-dim and complexity values; longer total branch lengths; more segments; greater tree volumes; more vertices (Va, Vb, and Vc); and larger convex-hull perimeters, areas, surfaces, and volumes than the type II phenotype. On average, type III astrocytes from the IY polymorphic layer were less tortuous, with smaller total branch lengths and greater density of segments/mm, than type I and type II astrocytes (Fig. 6).

Influences of environment and age on the morphological complexity of astrocytes in the dentate gyrus

Complexity has been defined previously (Pillai *et al.*, 2012) using the following equation:

Complexity = [Sum of the terminal orders + Number of terminals] × [Total branch length / Number of primary branches].

See <http://www.mbfbioscience.com/help/nx11/Default.htm#Analyses/BranchedStructure/neuronSumm.htm> for details.

From that equation, we promptly recognize that higher values of complexity imply more ramified and longer astrocytes. We categorized astrocytes into two groups with respect to complexity, and designated as type I the astrocytes that exhibited significantly higher values of complexity in comparison with type II. Next, we compared astrocytes from IY mice with those from EY mice, and astrocytes from EY mice with those from EA mice. In both comparisons, astrocytes from all layers of the dentate gyrus of EY mice exhibited higher values of complexity, on average, than their counterparts in IY and EA mice (Table 2).

Please insert Table 2 around here

Figures 11-13 and table 3 illustrate the mean of selected morphological features of astrocytes from each layer under the influences of environmental changes and age. The selection was based on morphological features that were significantly influenced by environment and age in all layers of the dentate gyrus. Astrocytes from the dentate gyrus of EY mice featured significantly longer total branch lengths, more segments, larger surface areas, greater complexity, and more vertices (Va, Vb, and Vc), on average, than their counterparts in IY mice. However, as mice raised in an enriched environment became older (EA), their astrocytic trees shrunk compared with those of EY mice. They also assumed a lower level of morphological complexity, with reductions of total branch length, number of segments, surface area, and number of vertices (Va, Vb, and Vc) (Table 1).

Please insert Table 3 and Figures 11, 12, and 13

DISCUSSION

Morphological analysis of astrocytes and unbiased stereological sampling

The sampling that takes place at all levels of an experimental design must be random if the estimate is to be unbiased in a statistical sense (West, 2012). To detect and quantify morphological details along a continuum of astrocytes' morphological possibilities in every layer of the dentate gyrus, we used stereological random and systematic sampling (West, 1999), combined with 3-D reconstruction of astrocytes. To our knowledge, there are no previous findings that result from applying an unbiased sample approach with 3-D microscopic reconstruction to the assessment of astrocytes' morphological phenotypes in the mouse dentate gyrus. This approach was chosen to guarantee that all regions from the area of interest would have the same probability of inclusion in the (systematic and randomized) sample, and that fine anatomical details (from 3-D reconstructed astrocytes) could be quantified in all experimental groups using unbiased methods. From this sampling approach, associated with cluster and discriminant analysis of the morphometric features, we have found that, with the exception of the polymorphic layer of the dentate gyrus of IE adult mice (with three morphological phenotypes), two main types of morphological phenotypes occupy all astrocyte layers of the dentate gyrus in adult and aged female albino Swiss mice. We also learned that a few morphological parameters are enough to distinguish morphological changes in the astrocytes that are associated with the influences of the environment and age in our sample, including total length, mean branch length, number of segments, tree surface area, complexity, and analysis of vertices (Va, Vb and Vc). Because complexity was by far the morphological feature that most contributed to cluster formation, enabling the discernment of the influences of the environment and age on astrocytic morphology in all dentate gyrus layers, we will discuss it as a basis for astrocytes' morphological classification, as well as possible functional implications.

Astrocytes' morphological complexity and episodic-like memory performance

Episodic-like memory enables the unambiguous distinction between new and familiar objects; see (Eichenbaum *et al.*, 2012; Pause *et al.*, 2013) for recent reviews. To cope with memory tasks, the brain must accentuate the differences between old and new experiences before coding occurs (Schmidt *et al.*, 2012). For that purpose, medial and lateral perforant pathways transmit spatial and non-spatial information to the dentate gyrus, which is necessary for recognizing object placement (Where?), identity (What?), and timing (When?). Lateral portions of the entorhinal cortex project to the caudal levels of the dentate gyrus and hippocampus, and medial portions of the entorhinal cortex project to the rostral levels (Witter *et al.*, 1989; Witter and Amaral, 1991). We have learned from earlier experiments that only young adult and aged mice from the enriched environment were able to integrate object recognition into a spatial-temporal context. Mice from impoverished environments were unable to make the appropriate distinctions. In the spatial memory component of episodic-like memory (Where?), young and aged animals housed in enriched conditions spent significantly more time in the displaced than stationary objects. In the identity and temporal memory components (What? and When?), young and aged animals housed in enriched conditions spent significantly more time in the old than recent objects (Fig. 14). Coherently, subsequent analysis of the behavior of aged mice found similar results in tasks that engaged episodic-like memory (Tronche *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2013) and working and recognition memories (Da Silva Costa-Aze *et al.*, 2011).

The pathophysiological foundations for these memory impairments have not yet been completely elucidated, although the impact of enriched environment on glial cells has been described previously (Altman & Das, 1964). In this sense, the novelty of the present report is related to the dentate gyrus laminar analysis of the morphological changes of astrocytes associated with age and environmental changes, using a combination of an unbiased stereological systematic sampling approach and 3-D reconstruction.

During our previous stereological analysis of the dentate gyrus of IE aged mice, we observed hyperplasia of astrocytes in the molecular layer compared with equivalent sections from young adults raised in the same conditions. Interestingly, EA but not IA mice exhibited the ability to form integrated memories in the spatial-temporal context. However, environment and aging affected the molecular layer of the dentate gyrus in an additive way; thus, we speculated that astrocytosis induced by environmental enrichment might have a different functional role from that induced by aging. Paradoxically, our preliminary morphometric analysis in the molecular layer of the dentate gyrus, using a random but not systematic sampling approach, (Diniz *et al.*, 2012) confirmed earlier suggestions in the hippocampus of old rats (Soffie *et al.*, 1999) that hippocampal astrocytes from aged mice maintained in an enriched environment were smaller than those from aged mice maintained in an impoverished environment. Taken together, the results suggest that, compared with young mice from equivalent environments, aged mice from enriched conditions present more and smaller astrocytes than aged mice raised in impoverished conditions (Diniz *et al.*, 2010; Diniz *et al.*, 2012).

Here, we confirmed our preliminary results and expanded them to the polymorphic and granular layers. We demonstrate that environmental impoverishment and aging reduce morphological complexity and shrink astrocytic processes. Although the molecular basis of those changes remains to be investigated, it is important to discuss possible implications associated with the influences of aging and the environment on the morphology of astrocytes in the dentate gyrus.

Possible physiological implications of an increase in astrocytic complexity

In the rodent brain, a single astrocyte can traverse hundreds of thousands of synapses (Halassa *et al.*, 2007; Halassa *et al.*, 2009; Halassa & Haydon, 2010). This ramified complex morphological substrate provides the structural basis for functional interactions with neurons, other glial cell processes, and blood vessels (Reichenbach *et al.*, 2010). Studies of neuronal

stimulation and astrocyte morphology have taught us that astrocytes react to neuronal stimulation by changing their morphology, and ultrastructural analysis of targeted projections from the stimulated region have demonstrated that neural stimulation causes a significant increase in the astrocytic envelopment of excitatory synapses on dendritic spines (Genoud *et al.*, 2006).

Because environmental enrichment is associated with a greater degree of long-term somatosensory/motor and visuospatial stimulation, and in the present report we observed improved performance of an episodic-like memory task in mice with more complex astrocytes from the enriched environment, we suggest that at least part of this improvement might be associated with astrocytic plasticity. The longer and more ramified astrocytic processes observed in mice raised in an enriched environment may traverse more synapses and may participate in more astrocyte/neuronal interactions than astrocytes from mice raised in an impoverished environment, and these changes occurred in all layers of the dentate gyrus. However, because we did not use ultrastructure stereological analysis to quantify the number of synapses ensheathed by astrocytes, this hypothesis remains to be investigated.

Age-related cognitive decline, environmental impoverishment, and astrocytic complexity

Emerging evidence indicates that the number of cells that express biomarkers of cellular senescence increases with aging and astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. Indeed, aged astrocytes exhibit increased intermediate GFAP- and vimentin-positive filaments, increased expression of several cytokines (TNF α , IL-1 β , and IL-6) in the rat brain (Campuzano *et al.*, 2009), and increased accumulation of proteotoxic aggregates (Salminen *et al.*, 2011). How these changes affect astrocytic glutamate exocytosis at the entorhinal-to-dentate granular cells (perforant pathway) is an important question to be investigated, because through this mechanism, astrocytes participate in synaptic tuning in circuits involved in cognitive processing and the control of mossy fiber-to-CA3 synaptic input (Jourdain *et al.*, 2007). In addition, even in the

absence of neurological disease, a more reactive astrocyte phenotype is expressed during aging as part of an increased and maintained pro-inflammatory profile that may be associated with cognitive dysfunction (Godbout & Johnson, 2009). A decrease in the ability of aged rats to sustain long-term potentiation in the perforant pathway of the dentate gyrus also appears to be associated with microglial activation (Lynch, 2010). Taking these observations together, it is reasonable to suggest that the number of astrocytes with senescence-associated secretory phenotype may be increased in animals raised in impoverished conditions (reducing astrocytic complexity) compared with aged mice housed in enriched conditions (Lynch, 2010).

Limitations of the experimental design and technical approaches

One limitation of the present analysis is related to the lack of 3-D reconstructions of astrocytes from IA mice. Although we had preliminary data from two animals, the small sample size precluded the ability to compare the impact of aging and impoverishment on astrocyte morphology in IA animals. Therefore, our analysis of aging effects is limited to EA mice.

Another important limitation is that apart from aging and environment, sexual hormones may change the number and morphology of glial cells in the hippocampus and dentate gyrus (Lei *et al.*, 2003; L  m & Leran  th, 2003). In fact, aged C57Bl6J female mice presented 35% more astrocytes than age-matched males (Mouton *et al.*, 2002). An increase in GFAP immunoreactivity has also been demonstrated in aged mice treated with estradiol (Saravia *et al.*, 2007). In the present report, aged females may have been depleted of estrogenic protection; thus, we reasoned that at least some of the morphological changes might be related to estropause. In support of this reasoning, ovariectomized female mice given an estrogenic replacement exhibited fewer astrocytes in the dentate gyrus than an ovariectomized placebo group (Lei *et al.*, 2003).

Corticosteroids, which inhibit astrocytic activation, may also affect astrocytic plasticity (Liu *et al.*, 2008). In the present report, it could be argued that manipulation-

induced stress during the behavioral tests might have altered plasma corticosteroid levels, which in turn affected astrocytic plasticity. We did not measure plasma corticosteroid levels; therefore, we cannot exclude the possibility that different levels of corticosteroids might explain the results. However, behavioral tests were applied to all animals of all experimental groups; thus, we can exclude the possibility that manipulation-induced stress might explain the results.

Finally, the influences of environmental enrichment and age on astrocytes' morphological changes and memory have been investigated previously in mice and rats using different approaches, models, and techniques (Soffie *et al.*, 1999; Diniz *et al.*, 2010; Diniz *et al.*, 2010; Williamson *et al.*, 2012; Sampedro-Piquero *et al.*, 2014b); findings were sometimes contradictory. These contradictions may result from differences in estimation methods, different animal lineages, variations in histological procedures, different stereological protocols, and ambiguities in the definition of the objects and areas of interest. To reduce these possible sources of error when comparing animal groups in the present report, all samples were obtained with the same tissue processing protocols (perfusion, immunoreaction, dehydration, counterstaining, and clearing) and all data were collected and analyzed with the same unbiased sampling approach, software, and hardware. To detect possible variations in the criteria for identifying morphometric features of the objects of interest, we confirmed the results by having different investigators reconstruct the same cells, using the same monoclonal anti-GFAP antibody as a selective marker for astrocytes. We hope that possible variations associated with non-biological sources were reduced to acceptable levels in the present report as a result (Mouton *et al.*, 2002; Slomianka & West, 2005). However, the accuracy of the morphometric measurements may be another limitation of this study. Microscopic, 3-D reconstructions might be affected by mechanical factors associated with vibratome sectioning and the dehydration procedure, which can induce non-uniform shrinkage in the z-axis of sections (Hosseini-Sharifabad & Nyengaard, 2007). Thus, estimates of

modifications in the x/y dimension during tissue processing cannot be linearly extrapolated to the z-axis. These methodological constraints imposed limitations that must be considered during interpretation of the present study results. It was recently demonstrated that sections shrank to approximately 25% of the cut thickness along the z-axis (perpendicular to the cutting surface) after dehydration and clearing (Carlo & Stevens, 2011). Based on those findings, we implemented corrections on all astrocyte reconstructions, assuming 75% shrinkage of thickness along the z-axis. No corrections were applied to the x/y dimension, because the tissue size did not change along those axes after histological dehydration and clearing.

Although we performed no stereological procedures to estimate the total number of each type of astrocyte in the areas of interest, the criteria for selecting astrocytes for 3-D reconstruction were systematically blind and random in all animals. In addition, we used a large number of astrocytes for reconstruction (688 astrocytes, 229 from the polymorphic layer, 230 from the granular layer, and 229 from the molecular layer of the dentate gyrus). Therefore, it is reasonable to suppose that no *a priori* sample bias was introduced by our choice of which astrocytes to use for reconstruction among animals.

In conclusion, our previous stereological and present morphometric analysis of astrocytes revealed significant changes in the distribution and morphology of astrocytes in the dentate gyrus in response to environmental conditions and aging in adult female albino Swiss mice. The presence of astroglial plasticity associated with learning and memory changes in these animals suggest that an increase in astrocytic complexity might contribute foundationally to the circuitry associated with improvements in the performance of hippocampus-dependent tasks in both young and aged brain.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding: This study received financial support from CNPq (Grant Number: 300203/2010-1); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; Brazilian Research Council (CNPq Grant Number 471077/2007-0) for CWPD.

ABBREVIATIONS

EA, enriched aged mice; EY, enriched young mice; GFAP, glial fibrillary acid protein; GrDG, granular layer of the dentate gyrus; IA, impoverished aged mice; IY, impoverished young mice; MolDG, molecular layer of the dentate gyrus; PolDG, polymorphic layer of the dentate gyrus; 3-D, three-dimensional

REFERENCES

- Altman, J. & Das, G.D. (1964) Autoradiographic Examination of the Effects of Enriched Environment on the Rate of Glial Multiplication in the Adult Rat Brain. *Nature*, **204**, 1161-1163.
- Bell, J.A., Livesey, P.J. & Meyer, J.F. (2009) Environmental enrichment influences survival rate and enhances exploration and learning but produces variable responses to the radial maze in old rats. *Dev Psychobiol*, **51**, 564-578.
- Bergami, M., Masserdotti, G., Temprana, S.G., Motori, E., Eriksson, T.M., Göbel, J., Yang, S.M., Conzelmann, K.K., Schinder, A.F., Götz, M. & Berninger, B. (2015) A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. *Neuron*, **85**, 710-717.
- Bureš, Z., Bartošová, J., Lindovský, J., Chumak, T., Popelář, J. & Syka, J. (2014) Acoustical enrichment during early postnatal development changes response properties of inferior colliculus neurons in rats. *Eur J Neurosci*, **40**, 3674-3683.
- Campuzano, O., Castillo-Ruiz, M.M., Acarin, L., Castellano, B. & Gonzalez, B. (2009) Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *Journal of neuroscience research*, **87**, 2484-2497.
- Carlo, C.N. & Stevens, C.F. (2011) Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. *J Comp Neurol*, **519**, 2803-2810.
- Cheng, L., Wang, S.H., Jia, N., Xie, M. & Liao, X.M. (2014) Environmental stimulation influence the cognition of developing mice by inducing changes in oxidative and apoptosis status. *Brain Dev*, **36**, 51-56.
- Da Silva Costa-Aze, V., Dauphin, F. & Boulouard, M. (2011) Serotonin 5-HT6 receptor blockade reverses the age-related deficits of recognition memory and working memory in mice. *Behav Brain Res*, **222**, 134-140.
- Davis, K.E., Eacott, M.J., Easton, A. & Gigg, J. (2013) Episodic-like memory is sensitive to both Alzheimer's-like pathological accumulation and normal ageing processes in mice. *Behav Brain Res*, **254**, 73-82.
- Dere, E., Huston, J.P. & De Souza Silva, M.A. (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, **31**, 673-704.
- Diniz, D., Foro, C., Bento-Torres, J., Vasconcelos, P. & CW, P.-D. (2012) Aging, environmental enrichment, object recognition and astrocyte plasticity in dentate gyrus. In Gonzalez-Perez, O. (ed) *Astrocytes: Structure, Functions and Role in Disease*. Nova Science Publisher Inc, New York, pp. in press.
- Diniz, D.G., Foro, C.A., Rego, C.M., Gloria, D.A., de Oliveira, F.R., Paes, J.M., de Sousa, A.A., Tokuhashi, T.P., Trindade, L.S., Turiel, M.C., Vasconcelos, E.G., Torres, J.B., Cunningham, C., Perry, V.H.,

- Vasconcelos, P.F. & Diniz, C.W. (2010) Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *Eur J Neurosci*, **32**, 509-519.
- Donato, F., Chowdhury, A., Lahr, M. & Caroni, P. (2015) Early- and late-born parvalbumin basket cell subpopulations exhibiting distinct regulation and roles in learning. *Neuron*, **85**, 770-786.
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R. & Lipton, P. (2012) Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. *Neurosci Biobehav Rev*, **36**, 1597-1608.
- Erickson, K.I., Weinstein, A.M. & Lopez, O.L. (2012) Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer's disease. *Arch Med Res*, **43**, 615-621.
- Fernández-Mayoralas, G., Rojo-Pérez, F., Martínez-Martín, P., Prieto-Flores, M.E., Rodríguez-Blázquez, C., Martín-García, S., Rojo-Abuín, J.M. & Forjaz, M.J. (2015) Active ageing and quality of life: factors associated with participation in leisure activities among institutionalized older adults, with and without dementia. *Ageing Ment Health*, 1-11.
- Franklin, R.J. & Bussey, T.J. (2013) Do your glial cells make you clever? *Cell Stem Cell*, **12**, 265-266.
- Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E. & Knott, G.W. (2006) Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biol*, **4**, e343.
- Godbout, J.P. & Johnson, R.W. (2009) Age and Neuroinflammation: A Lifetime of Psychoneuroimmune Consequences. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, **29**, 321-337.
- Gomes-Leal, W., Silva, G.J., Oliveira, R.B. & Picanco-Diniz, C.W. (2002) Computer-assisted morphometric analysis of intrinsic axon terminals in the supragranular layers of cat striate cortex. *Anat Embryol (Berl)*, **205**, 291-300.
- Gregory, M.L. & Szumlanski, K.K. (2008) Impoverished rearing impairs working memory and metabotropic glutamate receptor 5 expression. *Neuroreport*, **19**, 239-243.
- Halassa, M.M., Fellin, T. & Haydon, P.G. (2009) Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology*, **57**, 343-346.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.H. & Haydon, P.G. (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*, **27**, 6473-6477.
- Halassa, M.M. & Haydon, P.G. (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*, **72**, 335-355.

- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., Xu, Q., Oberheim, N.A., Bekar, L., Betstadt, S., Silva, A.J., Takano, T., Goldman, S.A. & Nedergaard, M. (2013) Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, **12**, 342-353.
- Hosseini-Sharifabad, M. & Nyengaard, J.R. (2007) Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *J Neurosci Methods*, **162**, 206-214.
- Hosseiny, S., Pietri, M., Petit-Paitel, A., Zarif, H., Heurteaux, C., Chabry, J. & Guyon, A. (2014) Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. *Brain Struct Funct*.
- Huang, W., Ming, G.L. & Song, H. (2015) Experience matters: enrichment remodels synaptic inputs to adult-born neurons. *Neuron*, **85**, 659-661.
- Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V. & Volterra, A. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nature neuroscience*, **10**, 331-339.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, **386**, 493-495.
- Kobilo, T., Liu, Q.R., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y. & van Praag, H. (2011) Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*, **18**, 605-609.
- Kohman, R.A., DeYoung, E.K., Bhattacharya, T.K., Peterson, L.N. & Rhodes, J.S. (2012) Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain Behav Immun*, **26**, 803-810.
- Kumar, A., Rani, A., Tchigranova, O., Lee, W.H. & Foster, T.C. (2012) Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiol Aging*, **33**, 828.e821-817.
- Leger, M., Quiedeville, A., Paizanis, E., Natkunarajah, S., Freret, T., Boulouard, M. & Schumann-Bard, P. (2012) Environmental enrichment enhances episodic-like memory in association with a modified neuronal activation profile in adult mice. *PLoS One*, **7**, e48043.
- Lei, D.L., Long, J.M., Hengemihle, J., O'Neill, J., Manaye, K.F., Ingram, D.K. & Mouton, P.R. (2003) Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. *Neuroscience*, **121**, 659-666.
- Liu, W.L., Lee, Y.H., Tsai, S.Y., Hsu, C.Y., Sun, Y.Y., Yang, L.Y., Tsai, S.H. & Yang, W.C. (2008) Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia*, **56**, 1390-1400.

- Lovden, M., Xu, W. & Wang, H.X. (2013) Lifestyle change and the prevention of cognitive decline and dementia: what is the evidence? *Current opinion in psychiatry*, **26**, 239-243.
- Lynch, M.A. (2010) Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function. *Frontiers in aging neuroscience*, **1**, 6.
- Lâm, T.T. & Leranth, C. (2003) Gonadal hormones act extrinsic to the hippocampus to influence the density of hippocampal astroglial processes. *Neuroscience*, **116**, 491-498.
- Mangialasche, F., Kivipelto, M., Solomon, A. & Fratiglioni, L. (2012) Dementia prevention: current epidemiological evidence and future perspective. *Alzheimers Res Ther*, **4**, 6.
- Maseda, A., Balo, A., Lorenzo-López, L., Lodeiro-Fernández, L., Rodríguez-Villamil, J.L. & Millán-Calenti, J.C. (2014) Cognitive and affective assessment in day care versus institutionalized elderly patients: a 1-year longitudinal study. *Clin Interv Aging*, **9**, 887-894.
- Mendes, F.e.C., de Almeida, M.N., Felício, A.P., Fadel, A.C., Silva, D.e.J., Borralho, T.G., da Silva, R.P., Bento-Torres, J., Vasconcelos, P.F., Perry, V.H., Ramos, E.M., Picanço-Diniz, C.W. & Sosthenes, M.C. (2013) Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. *BMC Neurosci*, **14**, 63.
- Merkley, C.M., Jian, C., Mosa, A., Tan, Y.F. & Wojtowicz, J.M. (2014) Homeostatic regulation of adult hippocampal neurogenesis in aging rats: long-term effects of early exercise. *Front Neurosci*, **8**, 174.
- Mouton, P.R., Long, J.M., Lei, D.L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M.E. & Ingram, D.K. (2002) Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*, **956**, 30-35.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A. & Nedergaard, M. (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*, **29**, 3276-3287.
- Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S. & Nedergaard, M. (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*, **29**, 547-553.
- Pause, B.M., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Pietrowsky, R. & Dere, E. (2013) Perspectives on episodic-like and episodic memory. *Front Behav Neurosci*, **7**, 33.
- Pedrero-Chamizo, R., Albers, U., Tobaruela, J.L., Meléndez, A., Castillo, M.J. & González-Gross, M. (2013) Physical strength is associated with Mini-Mental State Examination scores in Spanish institutionalized elderly. *Geriatr Gerontol Int*, **13**, 1026-1034.
- Pillai, A.G., de Jong, D., Kanatsou, S., Krugers, H., Knapman, A., Heinzmann, J.M., Holsboer, F., Landgraf, R., Joëls, M. & Touma, C. (2012) Dendritic morphology of hippocampal and

amygdalar neurons in adolescent mice is resilient to genetic differences in stress reactivity. *PLoS One*, **7**, e38971.

Ramírez-Rodríguez, G., Ocaña-Fernández, M.A., Vega-Rivera, N.M., Torres-Pérez, O.M., Gómez-Sánchez, A., Estrada-Camarena, E. & Ortiz-López, L. (2014) Environmental enrichment induces neuroplastic changes in middle age female Balb/c mice and increases the hippocampal levels of BDNF, p-Akt and p-MAPK1/2. *Neuroscience*, **260**, 158-170.

Reichenbach, A., Derouiche, A. & Kirchhoff, F. (2010) Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res Rev*, **63**, 11-25.

Rocha, E.G., Santiago, L.F., Freire, M.A.M., Gomes-Leal, W., Dias, I.A., Lent, R., Houzel, J.C., Franca, J.G., Pereira, A. & Picanco-Diniz, C.W. (2007) Callosal axon arbors in the limb representations of the somatosensory cortex (SI) in the agouti (*Dasyprocta prymnolopha*). *Journal of Comparative Neurology*, **500**, 255-266.

Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M. & Soininen, H. (2011) Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci*, **34**, 3-11.

Sampedro-Piquero, P., Begega, A. & Arias, J.L. (2014a) Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: relations to spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors. *Physiol Behav*, **129**, 118-129.

Sampedro-Piquero, P., De Bartolo, P., Petrosini, L., Zancada-Menendez, C., Arias, J.L. & Begega, A. (2014b) Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats. *Neurobiol Learn Mem*, **114**, 16-25.

Saravia, F., Beauquis, J., Pietranera, L. & De Nicola, A.F. (2007) Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology*, **32**, 480-492.

Schweitzer, L. & Renehan, W.E. (1997) The use of cluster analysis for cell typing. *Brain Res Brain Res Protoc*, **1**, 100-108.

Small, B.J., Dixon, R.A., McArdle, J.J. & Grimm, K.J. (2012) Do changes in lifestyle engagement moderate cognitive decline in normal aging? Evidence from the Victoria Longitudinal Study. *Neuropsychology*, **26**, 144-155.

Soffie, M., Hahn, K., Terao, E. & Eclancher, F. (1999) Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. *Behav Brain Res*, **101**, 37-49.

Speisman, R.B., Kumar, A., Rani, A., Foster, T.C. & Ormerod, B.K. (2013a) Daily exercise improves memory, stimulates hippocampal neurogenesis and modulates immune and neuroimmune cytokines in aging rats. *Brain Behav Immun*, **28**, 25-43.

- Speisman, R.B., Kumar, A., Rani, A., Pastoriza, J.M., Severance, J.E., Foster, T.C. & Ormerod, B.K. (2012) Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol Aging*.
- Speisman, R.B., Kumar, A., Rani, A., Pastoriza, J.M., Severance, J.E., Foster, T.C. & Ormerod, B.K. (2013b) Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol Aging*, **34**, 263-274.
- Steele, G.E. & Weller, R.E. (1995) Qualitative and quantitative features of axons projecting from caudal to rostral inferior temporal cortex of squirrel monkeys. *Vis Neurosci*, **12**, 701-722.
- Stranahan, A.M. & Mattson, M.P. (2012) Metabolic reserve as a determinant of cognitive aging. *J Alzheimers Dis*, **30 Suppl 2**, S5-13.
- Suzuki, H., Kanagawa, D., Nakazawa, H., Tawara-Hirata, Y., Kogure, Y., Shimizu-Okabe, C., Takayama, C., Ishikawa, Y. & Shiosaka, S. (2014) Role of neuropsin in parvalbumin immunoreactivity changes in hippocampal basket terminals of mice reared in various environments. *Front Cell Neurosci*, **8**, 420.
- Teather, L.A. & Wurtman, R.J. (2005) Dietary CDP-choline supplementation prevents memory impairment caused by impoverished environmental conditions in rats. *Learn Mem*, **12**, 39-43.
- Teather, L.A. & Wurtman, R.J. (2006) Chronic administration of UMP ameliorates the impairment of hippocampal-dependent memory in impoverished rats. *J Nutr*, **136**, 2834-2837.
- Tronche, C., Lestage, P., Louis, C., Carrie, I. & Béracochéa, D. (2010) Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice. *Behav Brain Res*, **215**, 255-260.
- Tyndall, A.V., Davenport, M.H., Wilson, B.J., Burek, G.M., Arsenault-Lapierre, G., Haley, E., Eskes, G.A., Friedenreich, C.M., Hill, M.D., Hogan, D.B., Longman, R.S., Anderson, T.J., Leigh, R., Smith, E.E. & Poulin, M.J. (2013) The brain-in-motion study: effect of a 6-month aerobic exercise intervention on cerebrovascular regulation and cognitive function in older adults. *BMC Geriatr*, **13**, 21.
- Vallès, A., Granic, I., De Weerd, P. & Martens, G.J. (2014) Molecular correlates of cortical network modulation by long-term sensory experience in the adult rat barrel cortex. *Learn Mem*, **21**, 305-310.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C. & Gage, F.H. (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*, **25**, 8680-8685.
- Volkers, K.M. & Scherder, E.J. (2011) Impoverished environment, cognition, aging and dementia. *Rev Neurosci*, **22**, 259-266.
- West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci*, **22**, 51-61.

- West, M.J. (2012) Systematic versus random sampling in stereological studies. *Cold Spring Harb Protoc*, **2012**.
- Williamson, L.L., Chao, A. & Bilbo, S.D. (2012) Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain Behav Immun*, **26**, 500-510.
- Windrem, M.S., Schanz, S.J., Guo, M., Tian, G.F., Washco, V., Stanwood, N., Rasband, M., Roy, N.S., Nedergaard, M., Havton, L.A., Wang, S. & Goldman, S.A. (2008) Neonatal chimerization with human glial progenitor cells can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse. *Cell Stem Cell*, **2**, 553-565.
- Winocur, G. (1998) Environmental influences on cognitive decline in aged rats. *Neurobiol Aging*, **19**, 589-597.
- Yuan, Z., Wang, M., Yan, B., Gu, P., Jiang, X., Yang, X. & Cui, D. (2012) An enriched environment improves cognitive performance in mice from the senescence-accelerated prone mouse 8 strain: Role of upregulated neurotrophic factor expression in the hippocampus. *Neural Regen Res*, **7**, 1797-1804.
- Zalik, E. & Zalar, B. (2013) Differences in mood between elderly persons living in different residential environments in Slovenia. *Psychiatria Danubina*, **25**, 40-48.
- Zhang, Y. & Barres, B.A. (2013) A smarter mouse with human astrocytes. *Bioessays*.
- Zhao, E., Tranovich, M.J. & Wright, V.J. (2014) The role of mobility as a protective factor of cognitive functioning in aging adults: a review. *Sports Health*, **6**, 63-69.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Low-power photomicrograph of mouse dentate gyrus from a section immunolabeled with anti-GFAP antibody to reveal the laminar distribution of astrocytes and to define the layers and limits of the dentate gyrus. Note the boundaries of the granular layer (Gr, pink) are demarcated by adjacent molecular (Mol, blue) and polymorphic (Pol, green) layers. Reduced GFAP immunostaining in the CA3 pyramidal layer (CA3Py) clearly delineates the boundary between the polymorphic layer and the pyramidal layer. The grid (straight green lines parallel to the x- and y-axes) establishes the intervals between the orange square boxes and illustrates the random and systematic sampling approach. The number of boxes in each section is proportional to the area covered by the dentate gyrus. A single astrocyte located inside every box was selected for three-dimensional reconstruction. Using this sampling strategy, 720 astrocytes (240 from each group, 80 from each layer) were selected for three-dimensional reconstruction. Scale bar 250 μ m.

Figure 2. Morphological phenotypes of astrocytes in the granular layer of the dentate gyrus (GrDG) of young adult mice raised in an enriched environment (EY mice). Cluster discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of GrDG astrocytes from five EY mice. Top: Dendrogram groupings of 75 dentate gyrus astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). Bottom center: A graphic representation of the discriminant analysis. The variables that contributed most to cluster formation were convex-hull volume ($p < 0.0003$), vertex Vb ($p < 0.0346$), number of segments ($p < 0.017$), and tortuosity ($p < 0.021$). Both type I (orange dots) and type II astrocytes (green dots) had dispersed distributions around the x and y axes. Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features of 30 astrocytes. Bottom left, right: Three-dimensional reconstructions of type II (left) and type I (right) astrocytes from the GrDG with

corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of other astrocytes within the EY experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with larger tree surface areas and more segments and vertices. Scale bars 10 μ m.

Figure 3. Morphological phenotypes of astrocytes in the granular layer of the dentate gyrus (GrDG) of young adult mice raised in an impoverished environment (IY mice). Cluster discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of GrDG astrocytes from five IY mice. Top: Dendrogram groupings of 77 dentate gyrus astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). Bottom center: A graphic representation of the discriminant analysis. The variables that contributed most to cluster formation were complexity ($p < 1 \times 10^{-6}$), vertex V_c ($p < 0.05$), and tree surface area ($p < 0.06$). Type II astrocytes (green dots) exhibited more compact distribution than type I astrocytes (orange dots). Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features of 30 astrocytes. Bottom left, right: Three-dimensional reconstructions of type I (left) and type II (right) astrocytes from the GrDG with corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of other astrocytes within the IY experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I

astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with larger tree surface areas and more segments and vertices. Scale bars 10 μ m.

Figure 4. Morphological phenotypes of astrocytes in the granular layer of the dentate gyrus (GrDG) of aged adult mice raised in an enriched environment (EA mice). Cluster discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of GrDG astrocytes from five EA mice. Top: Dendrogram groupings of 78 dentate gyrus astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). Bottom center: A graphic representation of the discriminant analysis. The variables that contributed most to cluster formation were complexity ($p < 0.0071$), total length ($p < 0.000001$), convex-hull area ($p < 0.0255$), number of trees ($p < 0.0118$), and fractal dimension (K-dim, $p < 0.0372$). Both type I (orange dots) and type II (green dots) astrocytes exhibited dispersed distributions around the x and y axes. Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features of 30 reconstructed astrocytes. Bottom left, right: Three-dimensional reconstructions of type I (left) and type II (right) astrocytes from the GrDG with corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of other astrocytes within the EA experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with larger tree surface areas and more segments and vertices. Scale bars 10 μ m.

Figure 5. Morphological phenotypes of astrocytes in the polymorphic layer of the dentate gyrus (PoIDG) of young adult mice raised in an enriched environment (EY mice). Cluster

discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of PoIDG astrocytes from five EY mice. Top: Dendrogram groupings of 78 dentate gyrus astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). Bottom center: A graphic representation of the discriminant analysis. Cluster formation is based mostly on morphological complexity ($p < 1 \times 10^{-6}$), with a very small contribution from mean branch length ($p < 0.08$). Type II astrocytes (green dots) exhibited more compact distribution than type I astrocytes (orange dots). Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features of 30 astrocytes. Bottom left, right: Three-dimensional reconstructions of type I (left) and type II (right) astrocytes from the PoIDG with corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of other astrocytes within the EY experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with larger tree surface areas and more segments and vertices. Scale bars 10 μ m.

Figure 6. Morphological phenotypes of astrocytes in the polymorphic layer of the dentate gyrus (PoIDG) of young adult mice raised in an impoverished environment (IY mice). Cluster discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of PoIDG astrocytes from five IY mice. Top: Dendrogram groupings of 78 dentate gyrus astrocytes indicated three main astrocytes morphological phenotypes designated types I, II, and III. Bottom right: A graphic representation of the discriminant analysis. Type I astrocytes (orange dots) exhibited a more dispersed distribution than type II (green dots) or type III (red dots) astrocytes. The variables that contributed most to cluster formation were complexity ($p < 1 \times$

10^{-6}), convex-hull volume ($p < 0.01891$), mean branch length ($p < 0.000174$), convex-hull surface ($p < 0.03$), total branch length (0.000252), number of segments ($p < 0.01373$), and fractal dimension (K-dim, $p < 0.023$). Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features of 30 astrocytes. Bottom left: Three-dimensional reconstructions of astrocytes from the PoIDG with corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of other astrocytes within the IY experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with thicker primary branches, larger tree surface areas, and more segments and vertices. Compared with type I and type II astrocytes, type III astrocytes from the IY PoIDG were less tortuous, on average, with smaller convex-hull volumes, areas, and perimeters. Scale bars $10\mu\text{m}$.

Figure 7. Morphological phenotypes of astrocytes in the polymorphic layer of the dentate gyrus (PoIDG) of aged mice raised in an enriched environment (EA mice). Cluster discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of PoIDG astrocytes from five EA mice. Top: Dendrogram groupings of 73 dentate gyrus astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). Bottom center: A graphic representation of the discriminant analysis. The variables that contributed most to cluster formation were complexity (1×10^{-6}), convex-hull volume ($p < 0.000025$), and mean branch length ($p < 0.0355$). Type II astrocytes (green dots) exhibited a more compact distribution than type I astrocytes (orange dots). Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features

of 30 astrocytes. Bottom left, right: Three-dimensional reconstructions of astrocytes from the MoIDG with corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of other astrocytes within the EA experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with larger tree surface areas and more segments and vertices. Scale bars 10 μ m.

Figure 8. Morphological phenotypes of astrocytes in the molecular layer of the dentate gyrus (MoIDG) of young adult mice raised in an enriched environment (EY mice). Cluster discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of MoIDG astrocytes from five EY mice. Top: Dendrogram groupings of 78 dentate gyrus astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). Bottom center: A graphic representation of the discriminant analysis. The variables that contributed most to cluster formation were complexity ($p < 1 \times 10^{-6}$), convex-hull surface ($p < 0.000001$), number of segments ($p < 0.0001$), number of trees ($p < 0.003$), number of segments/mm ($p < 0.0067$), and mean branch length ($p < 0.0282$). Type II astrocytes (green dots) exhibited a more compact distribution pattern than type I astrocytes (orange dots). Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features of 30 astrocytes. Bottom left, right: Three-dimensional reconstructions of type I (left) and type II (right) astrocytes from the MoIDG with corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of

other astrocytes within the EY experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with larger tree surface areas and more segments and vertices. Scale bars 10 μ m.

Figure 9. Morphological phenotypes of astrocytes in the molecular layer of the dentate gyrus (MoIDG) of young adult mice raised in an impoverished environment (IY mice). Cluster discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of MoIDG astrocytes from five IY mice. Top: Dendrogram groupings of 72 dentate gyrus astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). Bottom center: A graphic representation of the discriminant analysis. The variables that contributed most to cluster formation were convex-hull volume ($p < 0.00041$), complexity ($p < 0.00066$), tree volume ($p < 0.0106$), segments/mm ($p < 0.004$), surface area ($p < 0.0189$), and solidity ($p < 0.0182$). Type I (orange dots) and type II (green dots) astrocytes exhibited similar degrees of dispersion around the x and y axes. Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features of 30 astrocytes. Bottom left, right: Three-dimensional reconstructions of type I (left) and type II (right) astrocytes from the MoIDG with corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of other astrocytes within the IY experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with larger tree surface areas and more segments and vertices. Scale bars 10 μ m.

Figure 10. Morphological phenotypes of astrocytes in the molecular layer of the dentate gyrus (MoIDG) of aged mice raised in an enriched environment (EA mice). Cluster discriminant analysis (Ward's method) and three-dimensional reconstructions of MoIDG astrocytes from five EA mice. Top: Dendrogram groupings of 79 dentate gyrus astrocytes indicated two main morphological phenotypes (type I and type II). Bottom center: A graphic representation of the discriminant analysis. Convex-hull volume ($p < 1 \times 10^{-6}$) and complexity ($p < 0.012$) contributed most to cluster formation. Type II astrocytes (green dots) exhibited a more compact distribution pattern than type I astrocytes (orange dots). Astrocytes were reconstructed from both rostral and caudal regions of the dentate gyrus; cluster analysis was based on the morphometric features of 30 astrocytes. Bottom left, right: Three-dimensional reconstructions of type I (left) and type II (right) astrocytes from the MoIDG with corresponding linear dendrograms of each astrocyte arbor. The length of each branch segment is displayed to scale as vertical lines; sister branches are horizontally displaced. The depicted astrocytes exhibit morphometric features representative of the mean morphological features of other astrocytes within the EA experimental group. The dendrogram was plotted and analyzed using Neuroexplorer (MicroBrightField). Branches of the same parental (primary branch) trunk are shown in one color. Note that the type I astrocyte is more complex than the type II astrocyte, with larger tree surface areas and more segments and vertices. Scale bars 10 μ m.

Figure 11. Environment and aging influence the morphology of astrocytes in the granular layer of the dentate gyrus (GrDG). Graphic representations of three-dimensional morphometry of GrDG astrocytes from young adult mice raised in impoverished (IY) and enriched (EY) environments, and from aged mice raised in an enriched environment (EA). Note that aging and environmental impoverishment are associated with significant shrinkage of the astrocyte tree total length (A); number of segments (C); tree surface area (D);

complexity (E); and vertices Va, Vb, and Vc (F-H). Segment analysis demonstrated that an impoverished environment reduces the length, area, and volumes of segments (D, F, and H). (*) indicates statistically significant differences between IY and EY mice; (#) indicates significant differences between EY and EA mice. Scale bars 10 μ m.

Figure 12. Environment and aging influence the morphology of astrocytes in the polymorphic layer of the dentate gyrus (PoIDG). Graphic representations of three-dimensional morphometry of PoIDG astrocytes from young adult mice raised in impoverished (IY) and enriched (EY) environments, and from aged mice raised in an enriched environment (EA). Note that aging and environmental impoverishment are associated with significant shrinkage of the astrocyte tree total length (A); number of segments (C); tree surface area (D); complexity (E); and vertices Va, Vb, and Vc (F-H). Segment analysis demonstrated that an impoverished environment reduces the length, area, and volumes of segments (D, F, and H). (*) indicates statistically significant differences between IY and EY mice; (#) indicates significant differences between EY and EA mice. Scale bars 10 μ m.

Figure 13. Environment and aging influence the morphology of astrocytes in the dentate gyrus molecular layer (MoIDG). Graphic representations of three-dimensional morphometry of MoIDG astrocytes from young adult mice raised in impoverished (IY) and enriched (EY) environments, and from aged mice raised in an enriched environment (EA). Note that aging and environmental impoverishment are associated with significant shrinkage of the astrocyte tree total length (A); number of segments (C); tree surface area (D); complexity (E); and vertices Va, Vb, and Vc (F-H). Segment analysis demonstrated that an impoverished environment reduces the length, area and volumes of segments (D, F, and H). (*) indicates

statistically significant differences between IY and EY mice; (#) indicates significant differences between EY and EA mice. Scale bars 10 μ m.

Figure 14. Episodic-like memory tests and results. A. Diagram of the experimental designs for object recognition integrated tests (episodic-like memory) based on (Dere *et al.*, 2007). B. C. D. E. Bars indicate average values \pm s.e.m for the indicated groups. Black and white filled bars represent differences between objects (displaced vs. stationary, old vs. recent). *Two-tailed *t*-test for dependent samples; $p < 0.05$. IA, impoverished aged; EA, enriched aged; IY, impoverished young; EY, enriched young. Adapted from (Diniz *et al.*, 2010).