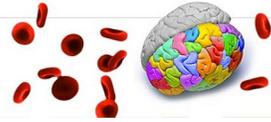




PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROCIÊNCIAS E  
BIOLOGIA CELULAR



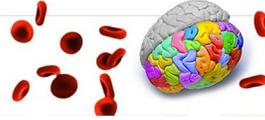
**MEMÓRIA ESPACIAL E MORFOMETRIA TRIDIMENSIONAL DA MICRÓGLIA  
DE CA1 E DO GIRO DENTEADO DO *Cebus apella*.**

**CARLOS SANTOS FILHO**

Belém  
2013



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROCIÊNCIAS E  
BIOLOGIA CELULAR



**CARLOS SANTOS FILHO**

**MEMÓRIA ESPACIAL E MORFOMETRIA TRIDIMENSIONAL DA MICRÓGLIA DE CA1 E DO GIRO DENTEADO DO *Cebus apella*.**

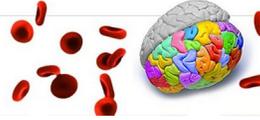
Tese de Doutorado a ser apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.  
Área de concentração em Neurociências

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

Belém  
2013



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROCIÊNCIAS E  
BIOLOGIA CELULAR



## **MEMÓRIA ESPACIAL E MORFOMETRIA TRIDIMENSIONAL DA MICRÓGLIA DE CA1 E DO GIRO DENTEADO DO *Cebus apella*.**

Carlos Santos Filho. Belém, Pará, UFPA/ICB, 2013.

Tese de Doutorado a ser apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração Neurociências), Universidade Federal do Pará, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:

Presidente:

**Professor Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz - Orientador**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Membros:

**Professora Dra. Márcia Consentino Kronka**

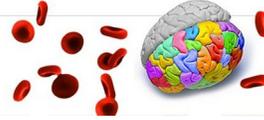
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Professora Dra. Lucília Fonseca Santiago**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Professor Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior**

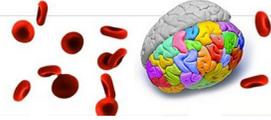
Instituto Evandro Chagas, IEC



## RESUMO

O presente trabalho tem o intuito de Investigar possíveis correlações entre a morfologia da micróglia do hipocampo e giro denteado e o desempenho cognitivo individual em teste de memória espacial no *Cebus apella*. Devido ao bom desempenho do *Cebus apella* em tarefas cognitivas hipocampo-dependentes, utilizou-se testes selecionados da Bateria Cambridge de Testes Neuropsicológicos (CANTAB) utilizada previamente com sucesso tanto em primatas do Velho Mundo quanto em humanos. Empregou-se o teste motor de adaptação a tela para checar a adaptação dos indivíduos à tela sensível ao toque e o teste de aprendizado pareado (TAP) para avaliar aprendizado e memória espacial. Para o estudo da correlação entre o desempenho individual no TAP da bateria CANTAB e a morfologia da micróglia, foi necessário reconstruir e analisar parâmetros morfométricos selecionados a partir de micróglias reconstruídas dos terços médio e externo da camada molecular do giro denteado e do lacunosum molecular de CA1, empregando microscopia tridimensional. A definição dos limites da formação hipocampal foi feita empregando-se critérios arquitetônicos previamente definidos. Para imunomarcagem seletiva de micróglias foi utilizado o anticorpo policlonal (anti-Iba1) dirigido contra a proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado Iba-1. A partir de procedimentos de estatística multivariada identificou-se a ocorrência de agrupamentos microgliais baseados em parâmetros morfométricos que permitiram a distinção de pelo menos dois grandes grupos microgliais em todos os indivíduos. Os resultados comportamentais expressos em taxa de aprendizado e alguns dos parâmetros morfométricos da micróglia dos terços externo e médio da camada molecular do giro denteado revelaram significativas correlações, lineares e não lineares. Em contraste, nenhuma correlação dessa natureza foi encontrada no lacunosum molecular de CA1. Nós sugerimos baseado no presente e em trabalhos anteriores que a correlação entre desempenho cognitivo e a complexidade estrutural da glia não é um atributo exclusivo dos astrócitos e que a morfologia da micróglia da camada molecular do giro denteado pode estar associada ainda que de forma indireta ao desempenho individual em testes de memória espacial.

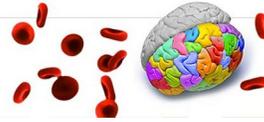
Palavras Chave: microglia, morfometria tridimensional, aprendizado e memória espacial, hipocampo, giro denteado, *Cebus apella*.



## ABSTRACT

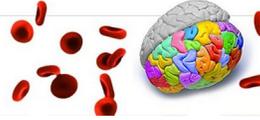
This study aims to investigate possible correlations between the morphology of microglia in the hippocampus and dentate gyrus and cognitive performances in individual tests of learning and spatial memory in *Cebus apella*. Due to the good performance of *Cebus apella* in hippocampal-dependent cognitive tasks, we used selected tests of Cantab battery successfully used in Old World non-human primates and man. To adapt individuals to the touch screen and to assess spatial learning and memory, Motor Screening Test (MOT) and Paired Associated Learning Test (PAL) were used respectively. To detect possible correlations between microglial morphology and individual performances in the spatial learning and memory tasks, it was necessary to reconstruct and analyze microglial morphological details from the middle and outer one-thirds of the dentate gyrus molecular layer and from the lacunosum molecular layer of CA1, employing three dimensional microscopy. The definition of the boundaries and layers of CA1 and dentate gyrus employed architectural criteria previously defined. For selective microglia immunostaining, it was used polyclonal antibody against the adapter binding ionized calcium Iba -1 protein (anti- Iba1). The occurrence of clusters after multivariate statistical analysis based on microglial morphometric parameters allowed the distinction of at least two major morphological groups of microglia in all individuals. The spatial learning rate and some of the morphometric parameters of microglia from dentate gyrus revealed significant linear and non-linear correlations. In contrast, CA1 did not show any correlation between microglial morphology and behavior. Based on the present and previous studies we suggest that the correlation between cognitive performances and complexity of morphological glial features is not an exclusive attribute of astrocytes and that microglial morphology of the molecular layer of dentate gyrus may be indirectly associated to the performance of individual tests of spatial memory.

Key words: microglia, morphometry three-dimensional, spatial learning and memory, hippocampus, dentate gyrus, *Cebus apella*.

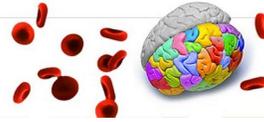


## SUMÁRIO

Sumário .....	6
1 - Introdução .....	8
1.1 - O Giro Denteado, CA1 e Memória Espacial .....	9
1.1.1 - A Contribuição do Giro Denteado .....	13
1.1.2 - A Contribuição de CA1 .....	16
1.2 - Morfologia das Células da Glia e Desempenho Cognitivo.....	18
1.3 - O Papel da Micróglia em Condições Homeostáticas .....	20
1.4 - A Bateria Cambridge de Testes Neuropsicológicos – CANTAB .....	23
1.5 - O Modelo Experimental e a Delimitação das Áreas Hipocampais de Interesse para Reconstrução Tridimensional da Micróglia .....	25
2 - OBJETIVOS .....	30
2.1 - Geral .....	30
2.2 - Específicos .....	30
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1 - Animais.....	31
3.2 - Condições em Cativeiro.....	31
3.3 - Sistema de Testes Comportamentais.....	32
3.4 - Modelagem.....	33
3.5 - Testes Comportamentais e Indicadores de Desempenho .....	35
3.5.1 - Triagem Motora (MOT) e Teste de Reversão de Regra (TRR).....	35
3.5.2 - Teste de Aprendizagem Pareada (TAP) .....	36
3.6 - Perfusão e Corte.....	40
3.7 - Imunohistoquímica para marcação de Micróglia.....	40
3.8 - Morfometria Baseada em Reconstrução Tridimensional .....	43
3.9 - Análise Estatística .....	49
3.10 - Fotomicrografias e Pós-Processamento de Imagens .....	50
4 - RESULTADOS .....	50
4.1 - Ensaio Comportamentais.....	50
4.2 - Morfometria da Micróglia no Lacunosum Molecular de CA1 .....	51
4.3 - Morfometria da Micróglia nos Terços Externo e Médio da Camada Molecular do Giro Denteado .....	53
4.4 - Análise de Correlação entre Desempenho no Teste de Aprendizado Associado Pareado – TAP e Morfologia da Micróglia .....	56



4.5 - Análise de Agrupamentos e Discriminante da Morfologia da Micróglia dos Terços Externo e Médio da Camada Molecular do Giro Denteado.....	56
5 - DISCUSSÃO .....	70
5.1 - Memória Espacial no <i>Cebus apella</i> .....	71
5.2 - A Contribuição do Giro Denteado para Melhorar a Resolução da Memória Espacial (Separação de Padrões Ambíguos) .....	72
5.3 - Plasticidade Sináptica e Micróglia na Camada Molecular do Giro Denteado: Implicações funcionais de morfologias especializadas .....	76
5.4 - Limitações Técnicas .....	79
6 - CONCLUSÕES .....	82
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83



## 1 - INTRODUÇÃO

A partir das observações de Brenda Milner e Scoville acerca das funções mnemônicas do paciente H.M. que sofreu profunda amnésia após ressecção cirúrgica bi-lateral da porção medial dos lobos temporais, foi possível reconhecer que a memória é uma capacidade cerebral separada de outras funções cognitivas como a percepção, a inteligência, a personalidade ou a motivação; que as memórias de curto e longo prazo são entidades funcionais distintas; e que o substrato anatômico para manutenção da memória de longo prazo não é o lobo temporal medial (Clark e Squire, 2013).

Desde então uma busca sistemática tem sido feita para encontrar as bases neurais (celulares e moleculares) da memória tentando reproduzir em primatas as mesmas lesões do paciente H.M. (Correll e Scoville, 1965). Dos ensaios iniciais em primatas tornou-se aparente que humanos e animais experimentais desenvolvem estratégias diferentes para resolver tarefas comportamentais em função da existência de múltiplos sistemas de memória. Por exemplo, macacos aprendem tarefas de discriminação visual complexas após muitas tentativas, o que tem sido referido como aprendizado de habituação e que parece incluir os núcleos da base (Teng *et al.*, 2000), enquanto em humanos essas tarefas são aprendidas memorizando diretamente o material utilizado para estimulação e essa estratégia de aprendizado parece envolver apenas os lobos temporais mediais.

Assim, a escolha de testes comportamentais hipocampo-dependentes em espécies não humanas é uma tarefa que exige cuidado para que o teste selecionado para avaliação seja equivalente ao mesmo tipo de memória que é comprometida em humanos após o dano no lobo temporal medial (Clark e Squire, 2013). Um bom exemplo dessa escolha que mimetiza a amnésia do lobo temporal humana é a tarefa de reconhecimento de objetos não pareados, com retardo e de uma única tentativa (do inglês “Delayed Non-Matched to Sample” – DNMS) (Zola-Morgan, Squire e Mishkin, 1982). Nesse teste o animal é treinado para selecionar um objeto que não foi apresentado previamente durante a fase de exposição baseado no fato de que a familiaridade com um dos objetos é suficiente para guiar



a escolha do objeto novo. Macacos que são submetidos à lesões semelhantes a do paciente H.M. apresentam déficits de reconhecimento que são diretamente proporcionais ao tempo de retardo entre a fase de exposição e de teste propriamente dito, tendo sido essa tarefa posteriormente adaptada para investigar a função do hipocampo e do giro denteado em roedores com igual sucesso (Clark *et al.*, 2001).

Em estudos prévios utilizando teste de memória espacial de uma única tentativa em macacos, foram encontrados déficits mais severos para localização espacial de objetos após a ablação da região parahipocampal posterior (Malkova e Mishkin, 2003) do que os encontrados após o dano ao córtex perirrinal. Coerentemente o dano ao córtex perirrinal comprometeu a performance na tarefa de reconhecimento do objeto no teste do DNMS mais do que o fez a lesão do córtex parahipocampal. Essa separação de processamento de forma e localização espacial parece ser mantida no córtex entorrinal, de tal forma que o córtex entorrinal lateral é peça essencial para processamento de forma enquanto que o medial para o processamento de informação espacial (Clark e Squire, 2013).

### **1.1 - O Giro Denteado, CA1 e Memória Espacial**

Dados de numerosos ensaios experimentais consolidaram a noção de que a integridade do hipocampo é essencial para a formação de memória episódica (em humanos) ou similar à episódica (em outros animais) (Eichenbaum *et al.*, 2012). Essas memórias respondem basicamente a três perguntas acerca do objeto que se examina: O que é? Onde está? e Quando? possibilitando a distinção inambígua entre objetos novos e familiares. Para dar conta dessa tarefa o cérebro precisa acentuar as diferenças entre as experiências antigas e novas antes que a codificação ocorra, de modo a poder distingui-las (Schmidt, Marrone e Markus, 2012).



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

Em mamíferos, o hipocampo contém uma rede de neurônios que se comunicam através de um circuito trissináptico bem definido funcionalmente e classificado como do tipo “feed-forward”. A chegada de informações sensoriais converge para o córtex entorrinal que projeta, via circuito perfurante, para o giro denteado. Do giro denteado saem projeções, via fibras musgosas, para a região de CA3, de onde, através das fibras colaterais de Schaeffer, projetam-se ipsilateralmente e contralateralmente para a região de CA1 de onde saem fibras para o subículo e daí para fora do hipocampo; para revisão recente ver (Aggleton, 2012). A Figura 1 é um diagrama esquemático das principais interconexões dentro do lobo temporal medial do primata, aí contidos o subículo e o giro denteado.

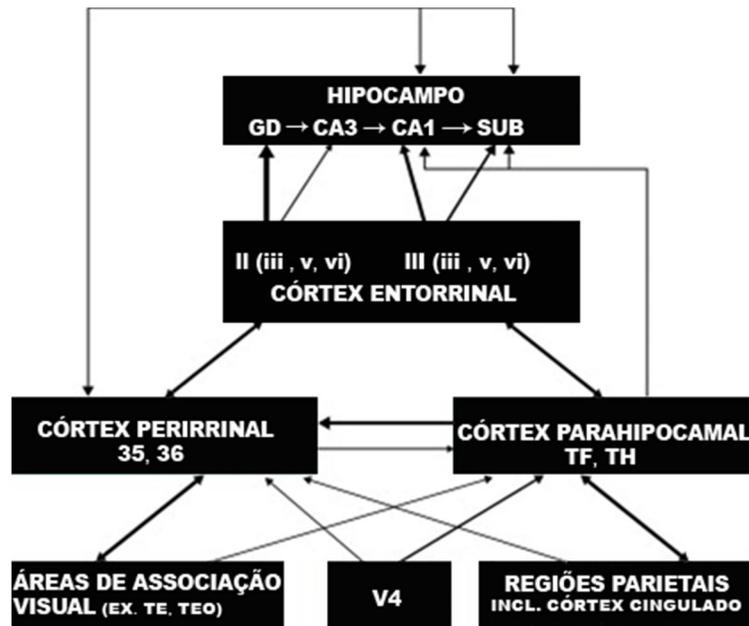
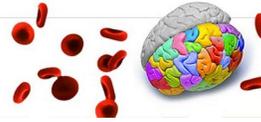


Figura 01. Diagrama esquemático das principais interconexões do lobo temporal medial do primata, incluindo o giro denteado (GD) e o subículo (SUB). Os alvos das projeções das camadas II e III do córtex entorrinal do hipocampo são também indicadas. A espessura das setas reflete a densidade das projeções (Aggleton, 2012).

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

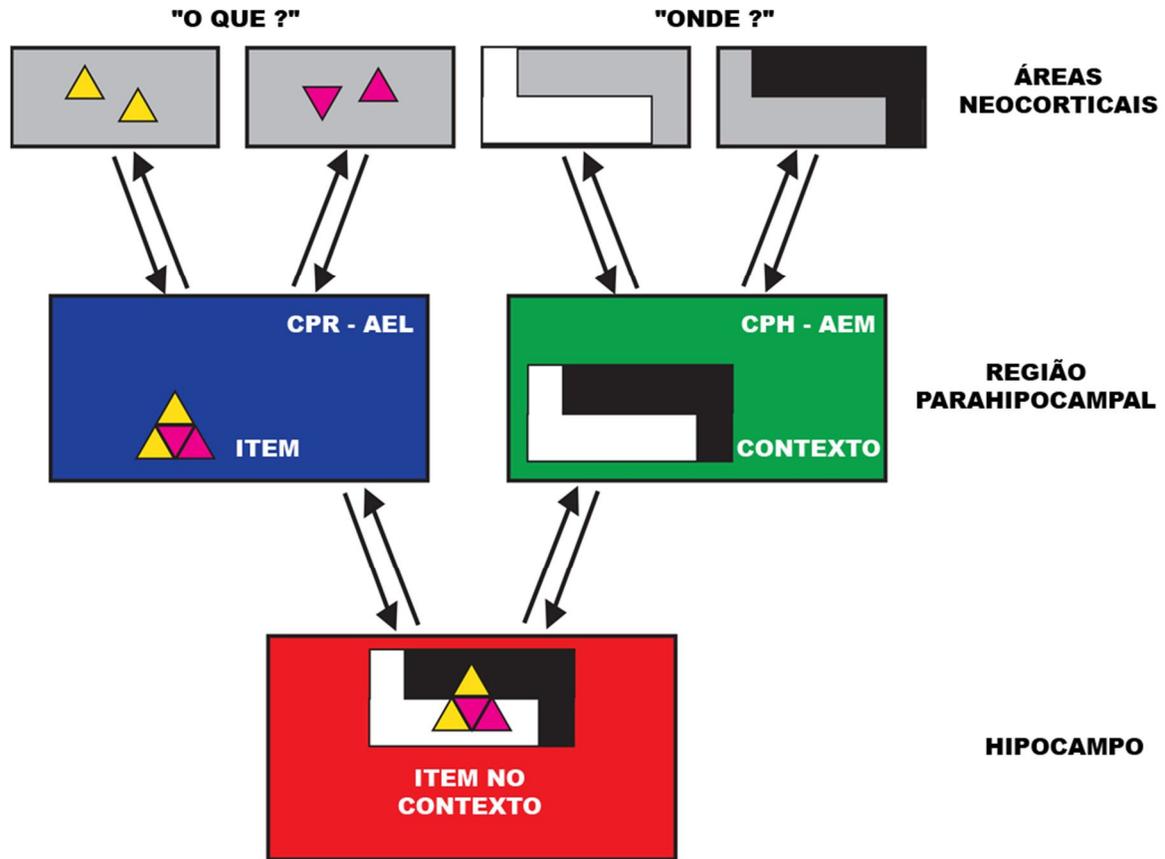
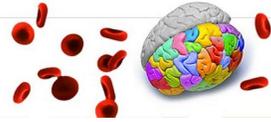
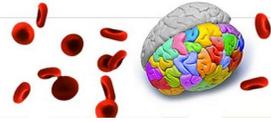


Figura 02. Diagrama esquemático das áreas envolvidas com o reconhecimento da identidade de objetos (O quê?) e de sua localização espacial (Onde?). As projeções associadas a respostas à primeira pergunta envolvem áreas neocorticais que se projetam para o córtex perirrinal (CPR) e o córtex entorrinal lateral (AEL) enquanto que aquelas associadas à pergunta acerca da localização espacial se projetam para o córtex parahipocampal (CPH) e para o córtex entorrinal medial (AEM). Enquanto que as projeções para as áreas CPR-AEL representam objetos individuais, as projeções para as áreas CPH-AEM representam informações contextuais (localização espacial). A partir dessas áreas novas projeções convergem para o hipocampo onde os objetos são agora representados de forma integrada (contextualizada) possibilitando responder de forma simultânea o que é? e onde está? Do hipocampo partem projeções de feedback que retornam às áreas parahipocampais de onde partem novas projeções para as áreas neocorticais de origem (Eichenbaum *et al.*, 2012).

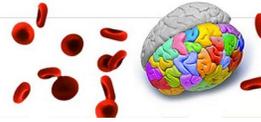


### 1.1.1 - A Contribuição do Giro Denteado

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

Na formação hipocampal dos mamíferos o giro denteado é caracterizado por enviar projeções unidirecionais poderosas para as células piramidais de CA3 através das fibras musgosas. Essas fibras formam um tipo único de sinapse rica em zinco que parece oferecer uma duplicata da informação que as células piramidais de CA3 já haviam recebido dos neurônios da camada II do córtex entorrinal e que projetam tanto para a camada molecular do giro denteado quanto para CA3. Essa duplicata parece preencher os requisitos necessários para lidar com o problema de ter que acentuar as diferenças entre os eventos antes de codificá-los, para poder distinguir o novo do velho, e essa tarefa é a previamente denominada separação de padrões (Leutgeb e Moser, 2007).

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



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

A memória de reconhecimento de objeto pode ser subdividida em duas categorias: o reconhecimento do objeto em si mesmo e o reconhecimento associativo. O reconhecimento do objeto está relacionado ao item sob observação identificando quando se trata de um objeto novo ou familiar enquanto que o reconhecimento associativo permite identificar se um grupo de elementos familiares foi ou não espacialmente reconfigurado (Aggleton, Brown e Albasser, 2012).

Empregando genes de expressão rápida que não requerem síntese proteica prévia para serem ativados, foi possível correlacionar o padrão de sua ativação com as tarefas comportamentais de interesse (Barbosa *et al.*, 2013). Genes de expressão rápida podem ser classificados em dois grupos: fatores reguladores de transcrição que influenciam a função celular através da ativação de outros genes que eles regulam e os genes denominados de fatores efetores que controlam diretamente a função celular de maneira específica. Os genes C-Fos e zif268 são fatores reguladores de transcrição e desempenham papéis na plasticidade de longo prazo (Guzowski, 2002). A expressão transitória desses genes após estimulação de diferentes naturezas precede a de outros genes, daí a sua denominação “de expressão rápida” (Herrera e Robertson, 1996).

As regiões que tiveram suas células ativas mapeadas através de genes de expressão rápida durante a estimulação, revelaram diferenças chave nos dois componentes da memória de reconhecimento de objeto indicando que a novidade do objeto é consistentemente associada à ativação em apenas duas regiões, o córtex perirrinal e a área visual associativa adjacente a área Temporal 2, enquanto que o reconhecimento associativo ativou C-Fos no hipocampo mas não no córtex perirrinal (Aggleton, Brown e Albasser, 2012). A falta da expressão de C-Fos no córtex perirrinal na tarefa de reconhecimento associativo foi interpretado como refletindo o fato de que o(s) item(s) sob observação permanece(m) familiar(es)

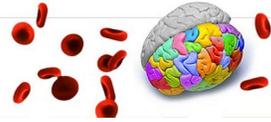


ainda que apresentado(s) sob uma nova combinação. Por outro lado quando o reconhecimento foi associado com atividade C-Fos no hipocampo, havia sempre a exploração ativa do objeto novo envolvendo estimulação e processamento multissensorial e ativação das vias de projeção do córtex entorrinal para o hipocampo incluindo a via perfurante para o giro denteado e a projeção de CA3 previamente mencionada. Assim o giro denteado parece essencial para a tarefa de reconhecimento associativo.

Finalmente é importante ressaltar a contribuição do giro denteado para a neurogênese, função sem a qual o aprendizado espacial novo e as novas memórias espacial e de reconhecimento de objeto são dificultadas (Gil-Mohapel *et al.*, 2013); ver (Vukovic *et al.*, 2011) para revisão. A atividade de neurogênese na camada subgranular do giro denteado parece estreitamente relacionada à atividade sináptica normalmente aumentada pelo exercício voluntário e a estimulação nova multissensorial e cognitiva (Li *et al.*, 2010; Kobilov *et al.*, 2011).

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

Seis horas após o treinamento para aprendizado e memória espacial, já é evidente o remodelamento das sinapses da camada molecular do giro denteado do hipocampo dorsal de ratos adultos com aumento de sua densidade no terço médio, e isso parece ser a expressão morfológica neuronal da consolidação desse aprendizado (Scully *et al.*, 2012). Tendo em conta que a micróglia tem papel ativo nesse processo (Wake, H., Moorhouse, A. J. e Nabekura, J., 2011; Miyamoto *et al.*, 2013) escolhemos reconstruí-la a partir dessa camada específica buscando possível correlação de seus parâmetros morfométricos modificados pelo processo de aprendizado com o desempenho cognitivo individual no teste de memória espacial correspondente.



### 1.1.2 - A Contribuição de CA1

As células piramidais de CA1 são a origem das eferências primárias do circuito hipocampal e o alvo de dois inputs excitatórios principais: uma projeção menos densa da camada 3 do córtex entorrinal (EC3) que termina no terço externo dos dendritos das células piramidais e um mais denso que se origina de CA3 e que termina nos terços proximais dos dendritos apicais (Carr e Frank, 2012). A Figura 3 ilustra um diagrama esquemático de tais conexões.

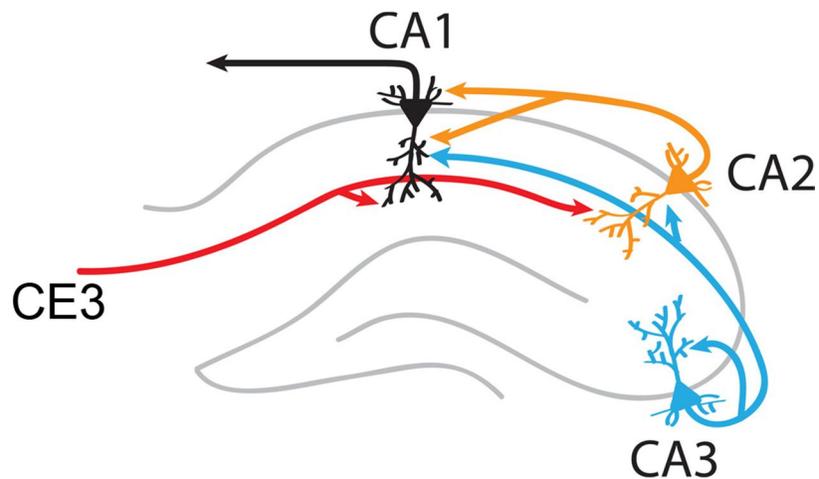
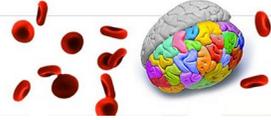


Figura 03. Aferências excitatórias para CA1. A informação acerca do ambiente atinge CA1 diretamente através da via têmporo-amônica com origem na camada 3 do córtex entorrinal (em vermelho). Essa via faz sinapse na região distal do dendrito apical das células piramidais de CA1 no stratum lacunosum molecular. Essa via também faz sinapse com CA2 e a partir das células piramidais de CA2 (laranja) conecta o dendrito apical das células piramidais de CA1 em seus terços proximal e médio, assim como os dendritos basais no stratum radiatum e oriens respectivamente. As projeções mais densas com ramos colaterais recorrentes (projeções excitatórias fazendo sinapse com os mesmos neurônios que as originaram) provem de CA3 (azul). Estas últimas estabelecem associações e se projetam densamente para o stratum radiatum de CA1 (Carr e Frank, 2012).



A codificação de informação espacial nova dentro do hipocampo parece dependente do desenvolvimento de novas representações durante a exploração do ambiente onde o animal está. De fato quando um animal se move pela primeira vez em um novo ambiente cerca de 50% dos neurônios piramidais de CA1 tornam-se ativos e cada neurônio ativo é ativado em uma área restrita do ambiente referida como “o campo local” (do inglês “place field”) (Karlsson e Frank, 2008). Esses campos receptores que detectam a localização espacial relativa respondendo de forma seletiva à posição do animal em áreas espaciais definidas, se desenvolvem a partir da exploração do novo ambiente e isso é consistente com a importância do hipocampo para a codificação da novidade espacial (Carr e Frank, 2012; Spiers *et al.*, 2013). Por outro lado evidências recentes revelam que os neurônios hipocampais podem codificar várias tarefas cognitivas relacionadas permitindo correlacionar a posição relativa do animal e a informação associada ao comportamento corrente (Allen *et al.*, 2012). A consolidação subsequente desses eventos se dá tanto durante o sono quanto em estado de alerta e esse evento parece estar relacionado ao ritmo elétrico hipocampal SWR (do inglês “sharp-wave ripple”) que aparentemente tem papéis diferentes nos estados de sono e de alerta. No primeiro caso ele parece codificar e consolidar a nova experiência espacial hipocampo-dependente e no segundo caso ele parece estar associado a mecanismos de recuperação da informação espacial estocada de forma contextualizada (“replay”) (Carr e Frank, 2012).

Por conta do fato de que a integridade da projeção têmporo-amônica é essencial para a consolidação da memória espacial (Remondes e Schuman, 2004) e as sinapses dessa projeção que se destina aos dendritos distais das células piramidais na camada lacunosum molecular de CA1 exibem plasticidade sináptica associada ao aprendizado espacial (Remondes e Schuman, 2002; 2003), escolhemos reconstruir a micróglia dessa camada em busca de possíveis correlações de sua morfologia com o aprendizado espacial.



## 1.2 - Morfologia das Células da Glia e Desempenho Cognitivo

A circuitaria do cérebro humano, de longe a de maior desempenho cognitivo, é composta por um trilhão de neurônios ( $10^{12}$ ) e um quadrilhão ( $10^{15}$ ) de sinapses que estão subjacentes a todas as atividades mentais que precedem e acompanham percepção, emoção, pensamento e comportamento (Ho, Lee e Martin, 2011).

Em todas as espécies até então estudadas, com variação nos números, na extensão e natureza do repertório de funções hierárquicas de alta ordem e suas consequências comportamentais, o substrato anatômico que lhes dá suporte é definido geneticamente. A contribuição genética se dá através de circuitos cerebrais que se modificam durante o desenvolvimento em resposta a uma variedade de estímulos externos e internos. Essa propriedade que permite que os circuitos sejam esculpidos e reorganizados em função da experiência tem sido denominada plasticidade cerebral, sendo o aprendizado, a memória e a modificação associada dos circuitos da formação hipocampal, peças essenciais para influenciar e/ou controlar o repertório comportamental (McDonald e Hong, 2013).

Nossas memórias parecem estar organizadas no cérebro dos mamíferos em um grupo de sistemas neurais envolvendo o hipocampo, o córtex rinal, a amígdala e o estriado dorsal e seus respectivos subsistemas funcionais (White e McDonald, 2002). Esses sistemas de memória distintos interagem, cooperando ou competindo entre si e com outros circuitos neurais para controlar comportamentos em situações específicas de aprendizado (Gruber e McDonald, 2012).

O hipocampo, parte importante desses sistemas de memória, contribui com especificidade contextual ao mesmo tempo em que provê rica informação para direcionar o comportamento, permitindo o reconhecimento da identidade dos elementos, sua localização e momento em que estiveram reunidos caracterizando um episódio, permitindo a discriminação entre elementos em contextos ambíguos (Gruber e McDonald, 2012).



Independente do circuito ou subsistema envolvido, o denominador comum aparente nesses eventos neurais é a plasticidade sináptica que foi classificada em função de sua duração, como sendo de curto prazo que pode durar minutos a horas, ou de longo prazo permanecendo por dias, meses ou anos, também chamada de consolidação sináptica (Clopath, 2012). Além disso, tem sido descrito em sobreposição às plasticidades de curto e longo prazo, a plasticidade intrínseca, que repousa na regulação (do número, da distribuição ou da atividade) de canais iônicos e que se limita a regular o limiar de excitação neuronal facilitando ou dificultando o disparo de impulsos nervosos, adicionando-se aos conceitos pré-existentes, o de metaplasticidade (Sehgal *et al.*, 2013). Todos esses mecanismos estão disponíveis em todas as espécies estudadas até então, de modo que não conseguimos ainda identificar as razões que nos tornam cognitivamente melhores do que as outras espécies (Zhang e Barres, 2013).

De forma surpreendente evidências recentes revelaram que células progenitoras dos astrócitos humanos quando transplantadas para camundongos, sobrevivem, migram e dão origem a astrócitos humanos em cérebros de camundongos que passam a aprender e lembrar de forma mais eficiente do que aqueles com seus próprios astrócitos e esse aprendizado melhor foi associado à amplificação do fenômeno de potenciação de longo prazo (Zhang e Barres, 2013).

Esses achados parecem sugerir que os astrócitos da espécie humana podem ter contribuição decisiva no processo que torna os humanos cognitivamente melhores do que outras espécies (Han *et al.*, 2013). Coincidentemente os astrócitos humanos são maiores e estruturalmente mais complexos do que os de roedores (Oberheim *et al.*, 2006) com diâmetros de somas 2,6 vezes maiores, apresentando cerca de 10 vezes mais processos primários GFAP positivos, produzindo ondas de cálcio 4 vezes mais rápidas do que os dos roedores (Oberheim *et al.*, 2009).

As questões que se levantam como consequência desses achados são: seriam as células da glia nas diferentes espécies com desempenhos cognitivos diferentes, distintas do ponto de vista morfofuncional? e se assim for será que sua maior complexidade estrutural e funcional contribui para melhores performances



cognitivas? Por outro lado será que esses achados de correlação entre o desempenho cognitivo e a complexidade morfofuncional da glia são um atributo exclusivo dos astrócitos ou eles também se aplicam à micróglia e aos oligodendrócitos?

É relevante lembrar que entre roedores e primatas há uma variação grande de desempenhos cognitivos entre espécies da mesma classe ou entre espécies de classes diferentes e o estudo comparativo de células da glia nessas espécies pode ser útil para testar em maior escala o modelo da complexidade morfofuncional glial associado a melhor desempenho cognitivo.

### **1.3 - O Papel da Micróglia em Condições Homeostáticas**

As células microgliais já são reconhecidas como o 4<sup>o</sup> elemento da sinapse, atuando como sensores sinápticos durante o desenvolvimento e no cérebro adulto, sendo capazes de responder à mudanças na atividade neural e à liberação de neurotransmissores (Schafer, Lehrman e Stevens, 2012). Durante o desenvolvimento as células microgliais parecem influir em eventos associados à proliferação e diferenciação neuronais, vascularização, sinaptogênese e mielinização, assim como participam da remoção de neurônios em apoptose, de debris celulares e de conexões sinápticas (Wake, H., Moorhouse, A. J. e Nabekura, J., 2011; Bitzer-Quintero e González-Burgos, 2012; Schafer, Lehrman e Stevens, 2013; Wake *et al.*, 2013).

Coerente com essas descrições, já é amplamente reconhecido que as células microgliais modulam a neurogênese, controlam o turnover de neurotransmissores e dão suporte ao metabolismo neuronal participando da regulação da angiogênese e do fluxo sanguíneo cerebral (Tremblay *et al.*, 2011; Blank e Prinz, 2012). Mais recentemente as células microgliais têm sido implicadas na restauração de circuitos sinápticos lesionados, além de modular a faixa de operação sináptica através do assim chamado “synaptic scalling”. O monitoramento constante dos contatos sinápticos e parte de sua regulação

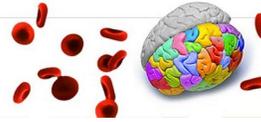


extrasináptica através da matriz extracelular realizada pelas micróglia, revela bem o seu potencial no controle do desenvolvimento, estabilização e função de redes neurais (Kettenmann *et al.*, 2011; Kettenmann, Kirchhoff e Verkhratsky, 2013).

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

Em estudo anterior em nosso laboratório (Guerreiro-Diniz, 2013) investigamos a morfologia tridimensional da micróglia hipocampal comparando sua morfologia em duas espécies de maçaricos (*Calidris pusilla* e *Actitis macularia*), com as da micróglia do rato da variedade Wistar e do macaco prego (*Cebus apella*). Esse estudo comparativo da morfologia microglial das duas espécies de aves com a dos mamíferos revelou diferenças morfológicas significantes que indicam que as micróglia das aves mostram em média, menor complexidade de ramificações, tem diâmetros e perímetros de soma menores e possuem ramos mais finos do que aquelas do rato e do macaco. Da mesma forma a micróglia do giro denteado do *Cebus apella* revelou-se em média maior em perímetros e diâmetros somáticos e com ramos de maior volume e maior número de segmentos do que a do *Rattus norvegicus* (Guerreiro-Diniz, 2013).

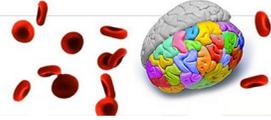
A micróglia eleita para esses estudos comparativos foi a micróglia ramificada, que ocorre em condições homeostáticas, quando o seu papel é voltado para monitoramento e modulação da atividade sináptica e reorganização de circuitos sinápticos (Wake, H., Moorhouse, A. J. e Nabekura, J., 2011; Miyamoto *et*



*al.*, 2013; Wake *et al.*, 2013). A micróglia nessas circunstâncias no cérebro saudável é constituída por células móveis que estendem e retraem seus processos à medida que monitoram o microambiente no sistema nervoso central (Nimmerjahn, Kirchhoff e Helmchen, 2005; Raivich, 2005; Tremblay *et al.*, 2011). A micróglia sob essas condições libera substâncias neurotróficas solúveis que aumentam e estendem a proliferação de células progenitoras (Choi *et al.*, 2008). Nesse sentido, de particular interesse é o fato de que a estimulação da neurogênese e da proliferação microglial pelo enriquecimento ambiental com o subsequente aumento na performance em testes de memória espacial são reduzidas em animais imunodeficientes (Ziv *et al.*, 2006; Ziv e Schwartz, 2008). Além disso, a micróglia derivada de animais exercitados induz um aumento do número de células progenitoras em culturas de neurônios de hipocampo de animais sedentários (Vukovic *et al.*, 2012). Esses achados, portanto, parecem sugerir que a micróglia ramificada (ou não ativada), está implicada na neurogênese do adulto, na integração dos novos neurônios nos circuitos e na remodelação daqueles, e que essa contribuição para a plasticidade neural é essencial para aprender e lembrar (Wake *et al.*, 2013).

Se de um lado parece haver evidências de correlações entre desempenho cognitivo e morfologia de células da glia entre diferentes espécies, também há evidências de correlações entre alterações gliais morfofuncionais e desempenho cognitivo entre indivíduos da mesma espécie submetidos a diferentes estilos de vida (Diniz *et al.*, 2012; Kohman *et al.*, 2012; Viana *et al.*, 2013).

Buscando possíveis correlações entre desempenho cognitivo e morfologia microglial investigamos em exemplares do *Cebus apella*, mantidos no mesmo ambiente, possível correlação entre suas performances em teste de memória espacial da bateria CAMBRIDGE de testes neuropsicológicos e morfologias da micróglia do giro denteado e CA1, regiões essas que parecem essenciais para consolidação de memória espacial (Eichenbaum *et al.*, 2012; Kesner, 2013).



#### 1.4 - A Bateria Cambridge de Testes Neuropsicológicos – CANTAB

Uma grande variedade de testes neuropsicológicos tem sido desenvolvida e utilizada para examinar aspectos particulares das funções cognitivas em humanos e primatas não humanos permitindo avaliar um amplo espectro de habilidades e déficits cognitivos. Escolhemos dentre aqueles a bateria CAMBRIDGE de testes neuropsicológicos automatizados (CANTAB – Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery). A bateria CANTAB foi originalmente escrita e desenvolvida na Universidade de Cambridge por Barbara Sahakian, Trevor Robbins e colaboradores em 1986 (Sahakian e Owen, 1992). Ela consiste atualmente de uma série de testes não verbais inter-relacionados para memória, atenção e funções executivas, que emprega nove testes visuoespaciais (CANTAB eclipse versão 2.0, <http://www.cantab.com/cantab-tests.asp>). Está desenhada para permitir ao indivíduo submetido à bateria de testes uma adaptação preliminar a cada um deles, sem que seus erros ou acertos sejam registrados para cômputo do desempenho.

Testes automáticos empregando plataformas computacionais apresentam muitas vantagens quando comparados aos testes tradicionais que empregam papel e caneta incluindo maior precisão, velocidade e confiabilidade. Por exemplo, é possível medir respostas de latência com boa acuidade (na escala do milissegundo), dimensão essa necessária aos estudos de tempo de reação. Por outro lado, o processamento dos dados de forma rápida e automatizada garante realimentação sistemática e objetiva ao experimentador a cada teste aplicado, permitindo avaliar diferentes aspectos das funções cognitivas, levantando rapidamente os perfis cognitivos dos grupos experimentais sob investigação.

A bateria CANTAB avalia o status cognitivo empregando estímulos não verbais com tecnologia de tela sensível ao toque, sendo, portanto, adequada para estudos em primatas não humanos e humanos. Com estímulos visualmente atraentes e respostas igualmente não verbais, a bateria CANTAB permite, quando apropriado, reduzir ou ampliar o grau de dificuldade de uma determinada tarefa



adaptando o teste a uma grande variedade de performances cognitivas, mantendo o interesse durante sua realização (Sahakian e Owen, 1992). Essa bateria foi originalmente desenhada para adaptar os paradigmas aplicados aos modelos animais para uso em humanos utilizando plataformas computacionais (Robbins *et al.*, 1994; Robbins *et al.*, 1998).

Baterias de testes automatizadas permitem ao experimentador aplicar os testes requeridos sem muita interferência do experimentador na coleta de dados, diminuindo as chances de viés potencialmente presentes, quando da interação entre o indivíduo testado e o experimentador. Além disso, permitem pronta comparação interespecífica, intra- e intergrupos, em estudos transversais e longitudinais, empregando o mesmo equipamento e a mesma maneira de colher as informações de interesse (Sahakian e Owen, 1992).

A bateria CANTAB consiste de três baterias de testes separadas que medem memória visual, atenção e capacidade de planejamento. Esses testes foram aplicados previamente com sucesso a uma variedade de condições clínicas demonstrando sensibilidade na detecção do declínio cognitivo a elas associado (Beats, Sahakian e Levy, 1996; Gibbie *et al.*, 2006).

Essa bateria de testes tem sido utilizada para investigar aprendizado e memória em uma variedade de primatas não humanos incluindo, cercopitecíneos, cebídeos e calitricídeos (Crofts *et al.*, 1999; Weed *et al.*, 1999; Taffe *et al.*, 2002; Spinelli *et al.*, 2004; Broglio *et al.*, 2005; Nagahara, Bernot e Tuszynski, 2010; Taffe e Taffe, 2011) assim como em associação à investigação de possíveis mecanismos moleculares relacionados a essas funções (Taffe *et al.*, 2002; Spinelli *et al.*, 2005) tanto em condições normais, quanto alteradas (Pearce *et al.*, 1999; Taffe, Weed e Gold, 1999; Golub, 2002; Weed *et al.*, 2004; Spinelli *et al.*, 2006; Nakako *et al.*, 2013).

No presente trabalho empregamos o teste de aprendizado associado pareado (Paired Associated Learning - PAL). No aprendizado visuoespacial associativo pareado (PAL) são avaliadas a capacidade de aprendizado e memória visuoespaciais. Resultados de estudos de correlação entre performances no teste de aprendizado visuoespacial associativo pareado e ressonância magnética



funcional revelaram déficits nas taxas de fluxo sanguíneo na formação hipocampal em pacientes com desempenho comprometido no PAL tanto na fase de aquisição (aprendizado) quanto de evocação (memória) da localização espacial dos estímulos empregados no teste (De Rover *et al.*, 2011).

Até o presente há um único trabalho publicado em primata do Novo Mundo utilizando a bateria CANTAB que empregou o sagui comum (*Callithrix jachus*) investigando o desempenho no estágio simples do PAL onde o teste consiste em uma tarefa de pareamento com retardo (Spinelli *et al.*, 2004). No presente trabalho pretendemos estender tais investigações com o PAL ao *Cebus apella* correlacionando as performances individuais à morfologia da micróglia do giro denteado e de CA1.

### **1.5 - O Modelo Experimental e a Delimitação das Áreas Hipocampais de Interesse para Reconstrução Tridimensional da Micróglia**

Muito do trabalho dedicado ao hipocampo do macaco em primatas não humanos foi feito em macacos do Velho Mundo e o macaco Rhesus (*Macaca mulata*) tem sido a espécie de escolha para muitos dos estudos experimentais porque ele partilha muitos dos aspectos neuroanatômicos e das funções cognitivas com os humanos (Squire, Stark e Clark, 2004; Amaral e Lavenex, 2007; Murray, Bussey e Saksida, 2007). Nos macacos do Novo Mundo esse cenário é muito limitado sendo de interesse investiga-los em estudos comparativos particularmente quando se tem como foco as células da glia em sua possível correlação com tarefas hipocampo-dependentes, onde não há notícia até então de um único trabalho publicado. Com o intuito de contribuir para reduzir essa lacuna, escolhemos estudar a memória espacial do macaco prego (*Cebus apella*) em correlação com a morfologia microglial do giro denteado e de CA1.

O macaco prego (*Cebus apella*) pertence à família *Cebidae*, subfamília *Cebinae* e ao gênero *Cebus* com várias linhagens definidas a partir de variados marcadores moleculares incluindo o *Cebus apella*, *C. olivaceus*, *C. albifrons*, *C.*



*apella robustus*, o *C. apella paraguayanus*, o *Cebus xanthosternos* e o *Cebus nigritus* (Amaral *et al.*, 2008; Wildman *et al.*, 2009; Casado *et al.*, 2010; Bi *et al.*, 2012; Ruiz-García *et al.*, 2012). Esse gênero habita florestas tropicais úmidas e secas e tem sido observado procurando por alimento tanto em florestas primárias como em secundárias (Fedigan, 1990). No presente trabalho adotamos o *Cebus apella apella* (Ruiz-García *et al.*, 2012).

Para muitos investigadores as notáveis capacidades cognitivas do *Cebus apella* constituem evidência de que a despeito da sua grande separação filogenética dos cercopitecíneos e dos grandes macacos do Velho Mundo, suas habilidades comportamentais se sobrepõem amplamente com as daqueles primatas (Visalberghi, Fragaszy e Savage-Rumbaugh, 1995; Visalberghi, 1997). Como um bom exemplo desse fato tem sido descrito que os macacos do gênero *Cebus* desenvolveram todas as capacidades cognitivas requeridas para o uso de ferramentas na busca de alimento, sendo essa habilidade análoga ao que fora proposto para o reconhecimento evolutivo ancestral do desenvolvimento de tecnologias pelos humanos ao longo do processo evolutivo (Westergaard e Suomi, 1997; Cleveland *et al.*, 2004; De Resende, Ottoni e Fragaszy, 2008). De fato para exibir comportamento associado ao uso de ferramentas, além das habilidades manipulatórias, requer-se intenso interesse em novos objetos e tendência natural para explorar novos ambientes (Visalberghi, 1990). Além disso, o reconhecimento daquilo que é novidade em sua distinção com o que é familiar associado a tais tarefas parece envolver atividade funcional no hipocampo e no giro denteado (Hunsaker, Rosenberg e Kesner, 2008; Manns e Eichenbaum, 2009; Rolls, 2010). Para avaliar esses comportamentos baseados no paradigma da novidade, várias tarefas dependentes da formação hipocampal usando reconhecimento da identidade e da localização espacial de objetos, foram aplicadas com sucesso no *Cebus apella* (Janson, 1998; De Lillo, Spinozzi e Truppa, 2007; Poti *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011) e *Macaca mulata* (Rolls, Xiang e Franco, 2005; Bachevalier e Nemanic, 2008; Pascalis *et al.*, 2009) confirmando que em ambas as espécies estão presentes todas as exigências cognitivas para o uso de ferramentas ainda que em diferentes proporções.



Por conta da estreita correlação entre muitas dessas habilidades cognitivas e a integridade da formação hipocampal, escolhemos estudar a micróglia do giro denteado e de CA1. Para identificar essas regiões da formação hipocampal nos aproveitamos do fato já bem conhecido de que a formação hipocampal parece mostrar um padrão evolutivo em sua morfologia bastante conservado (Manns e Eichenbaum, 2006; Amaral e Lavenex, 2007).

No *Cebus apella* estudo prévio em nosso laboratório (Guerreiro-Diniz et al., 2010) descreveu a organização estrutural e estereológica do hipocampo e do giro denteado encontrando resultados semelhantes aos encontrados no macaco Rhesus (Amaral e Lavenex, 2007; Amaral, Scharfman e Lavenex, 2007) com diferentes contribuições relativas das sub-regiões do hipocampo para as estimativas estereológicas do número de neurônios. Tal como nos platirrinos (Amaral e Lavenex, 2007), após coloração de Nissl ou imunomarcação para NeuN, um padrão arquitetônico allocortical trilaminar típico torna-se aparente no hipocampo do *Cebus apella* (Guerreiro-Diniz, C. et al., 2010); ver Figura 4 colunas à esquerda e ao centro. Naquele padrão, a camada principal de neurônios, correspondente à camada piramidal é distinguida facilmente da neurópila em CA1, CA2 e CA3. A camada piramidal de CA3 parece menos organizada na distribuição dos somas piramidais quando comparada àquelas de CA1 e CA2. Na borda com a região do prosubiculum, CA1 se distingue daquele no ponto onde a camada piramidal de CA1 deixa sua aparência condensada em CA1 tornando-se bastante alargada e menos densa no prosubiculum (Guerreiro-Diniz, C. et al., 2010).

Por outro lado o giro denteado distingue-se facilmente de CA1 e CA3 pela presença da fissura hipocampal suprajacente à camada molecular do giro denteado e pela camada granular que aparece intensamente corada e altamente compactada distinguindo-se claramente da camada polimórfica subjacente de baixa densidade celular (Guerreiro-Diniz et al., 2010).

A utilização da histoquímica para revelar a presença da lectina *Wisteria floribunda* ligada a sítios de proteoglicanos da matriz extracelular (Figura 4 coluna à direita) revelou-se excelente marcador para os limites arquitetônicos das sub-regiões do hipocampo do *Cebus apella* (Guerreiro-Diniz et al., 2010). De fato a



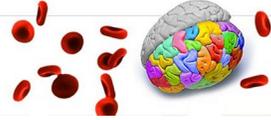
histoquímica para *Wisteria floribunda* marca seletivamente sítios de ligação de n-acetil-galactosamina de formas químicas especializadas da matriz extracelular incluindo as redes perineuronais situadas no interior da matriz (Murakami *et al.*, 1999), definindo de forma conspícua os limites arquitetônicos das sub-regiões hipocâmpais CA3/CA2/CA1 (Bruckner *et al.*, 2003; Ajmo *et al.*, 2008).

No que concerne à identificação seletiva da micróglia para reconstrução tridimensional, empregamos imunomarcação com anticorpo anti-IBA1 que revela em detalhes a morfologia dessas células no SNC dos mamíferos de forma generalizada e com resultados sistemáticos (Imai *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1998). Com o intuito de investigar possíveis associações entre o desempenho comportamental no teste de memória espacial com a morfologia da micróglia do hipocampo e do giro denteado adotamos para caracterizar as áreas e as camadas de interesse o mesmo esquema de parcelamento hipocâmpal utilizado por Guerreiro-Diniz e colaboradores em 2010 (Guerreiro-Diniz, Cristovam *et al.*, 2010), investigando de forma seletiva a morfologia da micróglia dos terços externo e médio da camada molecular do giro denteado e do stratum lacunosum molecular de CA1 do *Cebus apella*.

Uma vez que no extenso grupo de primatas do Novo Mundo não há, com exceção do presente trabalho, nenhum outro disponível que descreva a morfologia da micróglia do hipocampo e do giro denteado muito menos sua possível associação com o desempenho cognitivo em teste de aprendizado e memória espacial, o esforço aqui realizado se justifica plenamente.



Figura 04. Fotomicrografias em baixo aumento de uma série de fatias coronais do hipocampo e giro denteado do *Cebus apella* imunomarcadas para NeuN (colunas a esquerda e ao centro) e histoquimicamente reagidas para a lectina *Wisteria floribunda* (à direita) para ilustrar os neurônios piramidais do hipocampo e os granulares do giro denteado e os limites arquitetônicos entre as sub-regiões do hipocampo (CA1, CA2 e CA3). As cabeças de setas pretas nas colunas da esquerda e do centro indicam o término da camada de células piramidais do hipocampo e os limites regionais do hipocampo na coluna da direita. As fatias da coluna à direita foram contracoradas com Nissl para ilustrar a distribuição laminar das redes perineuronais. Note a maior densidade de componentes da matriz extracelular em CA2, no prosubiculum e subiculum quando comparados a CA1 e CA3. Escala = 500 $\mu$ m (Figura adaptada de Guerreiro-Diniz et al., 2010).



## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Geral

Investigar possíveis correlações entre a morfologia da micróglia do hipocampo e giro denteado e o desempenho cognitivo individual em teste de memória espacial no *Cebus apella*.

### 2.2 - Específicos

1) Avaliar o desempenho em aprendizado e memória espacial no teste de aprendizado associativo pareado (TAP) da bateria CAMBRIDGE de testes neuropsicológicos (CANTAB).

2) Reconstruir e descrever empregando microscopia tridimensional a morfologia da micróglia dos terços médio e externo da camada molecular do giro denteado e do lacunosum molecular de CA1.

3) Identificar a partir de procedimentos de estatística multivariada a ocorrência de possíveis agrupamentos microgliais baseados em parâmetros morfométricos que permitam sua distinção, identificando em análise discriminante quais variáveis contribuem de forma significativa para os agrupamentos.

4) Investigar a ocorrência de possíveis correlações entre parâmetros morfométricos selecionados a partir das famílias de micróglia reconstruídas e o desempenho individual correspondente no TAP da bateria CANTAB.



### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Animais

Utilizamos nos estudos comportamentais e na reconstrução tridimensional da micróglia, 04 exemplares da espécie *Cebus apella*, dos quais 02 eram machos (indivíduos “F” e “J” ambos com 5 anos e 4 kg) e 02 fêmeas (indivíduos “M” e “S” de 2 anos e 0,5 kg). Os animais foram obtidos no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e manipulados segundo os “Princípios do cuidado de primatas em laboratório” (Segal, 1989). Tendo em conta que a duração máxima da vida em cativeiro da espécie utilizada é de 46 anos e que a maturidade sexual é alcançada pelas fêmeas aos 4 anos de idade e os machos aos 7 anos de idade (Wirz e Riviello, 2008), todos os animais empregados no presente trabalho podem ser considerados sexualmente imaturos minimizando possível diferença hormonal no desempenho comportamental associada ao ciclo sexual das fêmeas.

O projeto recebeu em 2008 a aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará (protocolo nº 1701/05), por estar de acordo com a resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

#### 3.2 - Condições em Cativeiro

Os macacos foram alojados individualmente em gaiolas de 1,5 x 1 x 1 m (Figura 5). A sala foi equipada com exaustor e condicionador de ar, com controle de temperatura ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (12h:12h). A dieta empregada foi à base de frutas e legumes diversos: mamão, banana, laranja, maçã, tucumã, abóbora, cenoura, macaxeira, castanha do Pará, coco verde e tomate. Além das frutas e legumes, a alimentação foi reforçada com fontes de proteína como carne e ossos de frango, ovo de galinha e ração Nuvital-NUVILAB com a seguinte composição: 22.0% de proteína bruta, extrato etéreo 4.0%, material mineral 10.0%, matéria fibrosa 8.0%, cálcio 1.40% e fósforo 80%. Os animais recebiam periodicamente cuidados veterinários e semanalmente suplementação alimentar



com aminoácidos, vitaminas e minerais. Os animais eram alimentados uma vez por dia após a realização da bateria de testes comportamentais. O acesso água era livre.

Algumas estratégias foram introduzidas para tentar minimizar situações de estresse:

- Estímulos visuais: Exibição de desenhos dos estímulos dos testes comportamentais utilizados neste trabalho, cartazes de propaganda e algumas partes de vegetais como galhos de mangueiras, partes de Açaizeiro e outras plantas de pequeno porte, na intenção de reproduzir um ambiente enriquecido no biotério.

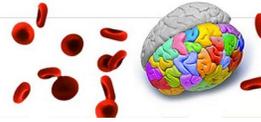
- Estímulos Táteis: Utilização de garrafas pet com alimento em seu interior, tubos de PVC, coco verde, galhos de mangueira localizados na parte interna superior da gaiola para permitir que o animal se exercitasse.

- Interação com os experimentadores: todos os animais foram habituados a interagir com os experimentadores com o objetivo de minimizar as possíveis fontes de estresse para os animais durante os testes comportamentais. Difícil dizer com certeza se esse objetivo (redução do estresse) foi alcançado, mas a pronta adesão dos animais aos testes comportamentais e à recompensa (pastilhas de chocolate) é um indicador de que os sujeitos não estavam sendo submetidos a estímulos aversivos.

### **3.3 - Sistema de Testes Comportamentais**

Cada gaiola de alojamento individual era acoplada a um túnel de comunicação (0,4 m<sup>2</sup>) com a caixa de treinamento. O túnel foi desenhado para evitar o contato entre os animais, evitar situações de estresse e permitir que eles se deslocassem para a realização dos testes sem intervenção do experimentador (Figura 5).

A caixa de treinamento foi construída em mármore (medindo 0,50 x 0,50 x 0,50 m) para facilitar a limpeza, evitar acúmulo de resíduos, dificultar a destruição e aumentar a resistência à umidade. A caixa foi composta por duas aberturas:



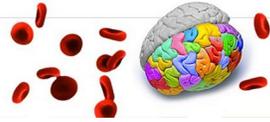
uma para a entrada dos macacos (0,4 x 0,4 m) e outra (0,32 x 0,245m) a qual foi acoplada a tela sensível ao toque (Monitor Touch LCD color 17" Elo/Tyco 1715L, Elo Touch Systems) que é controlada por um computador com o software CANTAB (Cambridge Cognition, Cambridge, UK).

A parte superior da caixa de treinamento foi construída em vidro, permitindo o uso de uma câmera para captura de imagem durante a realização dos testes. Existe ainda uma pequena abertura (0,02 m) na parte lateral da caixa por onde é liberada a recompensa de pastilha de chocolate, através de um dispensador (Med Associates Inc.) como reforço às repostas corretas.

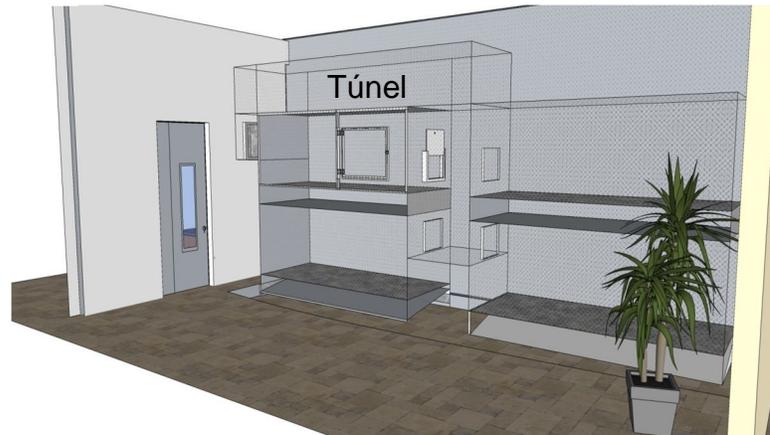
### 3.4 - Modelagem

Os treinos para a modelagem dos animais foram realizados diária e individualmente. Utilizando-se a curiosidade natural do *Cebus apella* que induz a exploração de ambientes e objetos novos foram direcionados a encorajar o acesso à caixa de treinamento através do túnel de comunicação com a gaiola de alojamento, seguido da ambientação à caixa de treinamento e toque adequado na tela na região equivalente ao estímulo exposto. Utilizou-se como reforço positivo para a modelagem do comportamento pretendido a oferta de pastilhas de chocolate.

As etapas mencionadas acima foram desenvolvidas em tarefas progressivas em grau de dificuldade e exigência: diariamente os animais eram liberados no túnel de acesso a caixa de treinamento e de acordo com a aproximação à caixa de treinamento, os animais recebiam o reforço positivo (recompensa). Inicialmente a cada entrada na caixa de treinamento os macacos recebiam a recompensa, após a fase de adaptação ao túnel e à caixa treinamento, os animais recebiam recompensa somente quando houvesse interação com a tela sensível ao toque. A modelagem para o toque na tela foi realizada através da apresentação do teste "Triagem Motora" (MOT – descrição no item 3.5.1) da Bateria Cambridge de Testes Automatizados (CANTAB), tendo sido dividida em 3 etapas:



**A**



**B**



Figura 05. (A) Perspectiva interna do biotério com as gaiolas individuais e túnel de acesso a caixa de treinamento. (B) Perspectiva externa com destaque para caixa de treinamento acoplada à tela sensível ao toque controlada pelo software da bateria CANTAB em computador que gerencia os testes comportamentais.

- Etapa 1: O animal recebia a recompensa ao manter atenção visual ao estímulo durante a sua apresentação.
- Etapa 2: Neste momento, passa a ser exigido atenção e precisão no toque, ou seja, o macaco deveria manter a atenção e tocar corretamente no estímulo para receber a recompensa. Alguns toques na tela não apresentaram



pressão suficiente para que o programa identificasse a resposta como acerto, mas nesta etapa a pressão adequada não foi exigida.

- Etapa 3: Nesta etapa foi modelada a atenção ao estímulo, precisão e pressão adequadas do toque à tela. Após atingirem essas etapas de modelagem da ambientação, atenção e gestos motores adequados, passou-se a verificar o desempenho dos animais no teste de triagem motora.

A modelagem que envolveu o acesso ao túnel, caixa de treinamento e modelagem para o toque na tela durou em média 60 dias.

### **3.5 - Testes Comportamentais e Indicadores de Desempenho**

Devido ao bom desempenho do *Cebus apella* em tarefas cognitivas envolvendo memória espacial que são dependentes do hipocampo e do giro denteado (Janson, 1998; Poti *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011), utilizou-se teste selecionado da bateria CANTAB, com o intuito de verificar o desempenho desses animais em tarefas para avaliação de memória espacial. Os testes utilizados envolveram o de Triagem Motora (MOT) para adaptação à tela, o Teste de Reversão de Regra (TRR) e o Teste de Aprendizagem Pareada (TAP). Em todos os testes foi estabelecida uma linha de base de aprendizado de no mínimo 80% de acertos em três sessões consecutivas.

#### **3.5.1 - Triagem Motora (MOT) e Teste de Reversão de Regra (TRR)**

A triagem motora (Figura 6) é administrada no início de uma bateria de testes, serve como uma introdução simples ao manuseio da tela sensível ao toque. O sujeito que for incapaz de cumprir os requisitos simples deste teste é pouco provável que seja capaz de completar outros testes com sucesso. Esse teste exige atenção visuo-motora, velocidade de resposta e precisão no toque.

Durante a execução do MOT foram apresentados 13 estímulos em forma de “X” em 10 localizações diferentes, onde as 3 primeiras localizações se repetem. Somente um estímulo é apresentado na tela a cada apresentação. Cada estímulo fica exposto por 6 segundos e um reforço sonoro é emitido sinalizando a presença



do estímulo na tela, quando o animal toca corretamente no estímulo um sinal sonoro diferente é emitido e uma recompensa (pastilha de chocolate) é liberada como sinal de reforço ao acerto. Nesse teste quando o animal não toca ou toca na localização errada nenhum sinal de reforço negativo é aplicado. Os resultados extraídos com a ajuda do software permitem medir a média de acertos e erros. Todos os animais realizaram com êxito o MOT numa média de 28 dias de teste.

No TRR (Figura 6) é necessário que o sujeito compreenda uma idéia geral seguida de uma reversão de valores, durante a apresentação simultânea de dois círculos na tela, um maior e outro menor, um ao lado do outro. Em um momento o estímulo tem valor positivo (estímulo correto) e em outro momento o mesmo estímulo passa a ter valor negativo (estímulo incorreto). Os animais aprendem essa tarefa executando o TRR com sucesso em cerca de 90 dias. Embora o indivíduo “M” não tenha atingido a linha de base de aprendizado nessa tarefa ele foi o sujeito de melhor desempenho na tarefa de memória espacial sugerindo que o bom desempenho nessa etapa não é crítico para o bom desempenho no teste de aprendizado e memória espacial (TAP) subsequente.

### **3.5.2 - Teste de Aprendizagem Pareada (TAP)**

No TAP seis caixas brancas são apresentadas e o conteúdo de cada caixa é exibido sequencialmente por 2 segundos e novamente ocultado, e em apenas uma das caixas é exibido um objeto cuja localização espacial precisa ser lembrada a posteriori. Após as apresentações o objeto é exibido no centro da tela, associado a um sinal sonoro que indica o momento em que o sujeito deve escolher uma das caixas onde previamente foi apresentado o objeto. O estímulo permanece na mesma localização durante a sessão e a abertura das caixas é feita de maneira aleatória pelo software. Caso ocorra erro na escolha da caixa que continha o objeto, as caixas são novamente apresentadas e é requerido do sujeito que faça nova escolha. Cada sujeito tem um total de dez tentativas para tocar na localização correta. Se ele acerta em uma dessas tentativas então o teste muda para a fase subsequente que exige que o sujeito reconheça a localização espacial de dois objetos. Se após dez tentativas não existir sucesso em nenhuma das



tentativas o teste é encerrado independente da fase do teste. Nossos resultados foram computados como o número total de tentativas para o sucesso. É esperado que a cada sessão o número de tentativas necessárias para o sucesso diminua revelando um aumento na taxa de aprendizado. A Taxa de Aprendizado foi definida como segue:  $TA = (\text{No. de Tentativas na } 1^{\text{a}} \text{ sessão} - \text{No. de Tentativas na enésima sessão}) / (\text{No. de Tentativas na } 1^{\text{a}} \text{ Sessão} + \text{No. de Tentativas na enésima sessão})$ . Resumidamente  $TA = (T1 - TN) / (T1 + TN)$ . Note que essa razão pode variar de -1 a +1 e que os números positivos representam aumento na taxa de aprendizado enquanto que os números negativos ou nulos indicam a ausência de aprendizado.

Em nosso experimento, quando o sujeito tocava no estímulo no momento da apresentação do objeto contido em uma das caixas brancas era dispensada uma recompensa como reforço por atenção, assim como no momento em que o sujeito acerta a localização correta do objeto, ocorrendo à emissão de um sinal sonoro de acerto como reforço ao evento de escolha correta. Se a localização errada fosse escolhida um sinal sonoro característico era emitido simbolizando erro e a recompensa não era liberada.

Os animais realizaram duas etapas no TAP, cada qual contando com a mesma dinâmica acima explicitada, caso o sujeito fosse bem sucedido na primeira etapa, a segunda era realizada logo em seguida na mesma sessão. Em cada etapa um objeto foi apresentado, ocorrendo somente mudança de cor, forma e localização entre as etapas. Os resultados do presente trabalho mediram o número total de tentativas e erros para o sucesso (Figura 7 e 8).



Figura 06. (A) Teste Triagem Motora (MOT). Administrado no início de uma bateria de testes como introdução simples à tela sensível ao toque. (B) Teste de Reversão de Regra (TRR) aplicado após o MOT.

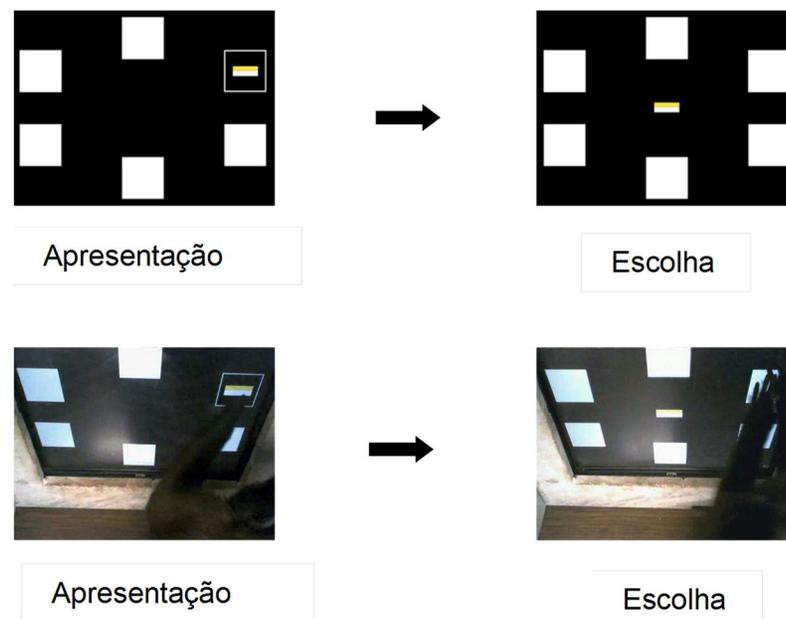
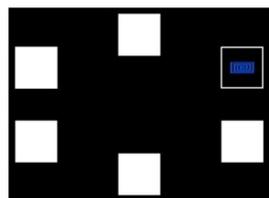
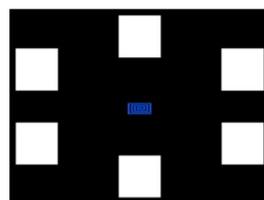


Figura 07. Teste Aprendizagem Pareada (TAP primeira etapa). Primeiramente, ocorre à apresentação do conteúdo das seis caixas brancas, em seguida vem o momento da escolha da localização do objeto. Note a mão esquerda do sujeito sobre o objeto exibido na tela.



Apresentação



Escolha

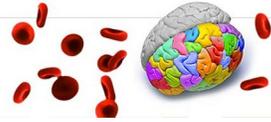


Apresentação



Escolha

Figura 08. Teste Aprendizagem Pareada (TAP segunda etapa). Primeiramente, ocorre à apresentação do conteúdo das seis caixas brancas, em seguida vem momento da escolha da localização do objeto, ocorrendo somente mudança de cor, forma e localização do objeto entre as etapas. Note a mão esquerda do sujeito sobre o local à direita e acima, onde estava o objeto.



### 3.6 - Perfusão e Corte

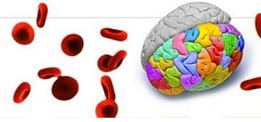
Os animais foram profundamente anestesiados com solução de cetamina (30 mg/kg) e xilazina (0,8 mg/kg) sacrificados por sobredose de anestésico e perfundidos por via transcardíaca com solução salina heparinizada 0.9%, seguida de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato pH 7.2-7.4.

Após craniotomia e ainda com o encéfalo na base do crânio, a cabeça do animal foi colocada no estereotáxico Horsley-Clarke para animais de médio porte. A cabeça dos animais foi imobilizada com barras auriculares, e a mandíbula foi apoiada com pino de fixação colocado entre os dentes incisivos. A área de interesse (lobo temporal) do encéfalo foi cortada no plano coronal, perpendicular ao plano de Frankfurt (plano definido pela linha reta que passa através dos meatos auditivos externos e a borda inferior das órbitas oculares). Seguiu-se a retirada do encéfalo, com as regiões encefálicas de interesse sendo seccionadas em vibrátomo (Vibratome Sectioning System, Pelco 120), em plano coronal em fatias de 100µm de espessura.

### 3.7 - Imunohistoquímica para marcação de Micróglia

A imunomarcação com anticorpo policlonal (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) dirigido contra a proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado Iba-1, um marcador seletivo para microglia/macrófagos (Figura 9) (Ito *et al.*, 1998).

Para imunomarcação as secções foram tratadas para recuperação antigênica fluando livremente em uma solução de ácido bórico 0,2 M pH 9.0, durante 60 minutos à 65-75°C, resfriadas à temperatura ambiente no mesmo tampão e então lavadas em tampão fosfato/salina (PBS) 0,1M pH 7.2 – 7.4 três vezes por 5 minutos. A seguir foram imersas por 1 hora na caseína a 10%, lavadas em PBS e então incubadas no anticorpo primário anti Iba-1 (2µg/ml em PBS), por três dias a 4° C com agitação suave e contínua. Após essa etapa as



secções foram lavadas novamente em PBS e imersas em solução contendo o anticorpo secundário por 12h (cabra anti-coelho 1:250 em PBS, Vector Laboratories). Inativamos a peroxidase endógena imergindo as secções em uma solução a 30% de peróxido de hidrogênio em PBS durante 15 minutos. As secções foram lavadas em PBS três vezes por dois minutos e então transferidas para uma solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC) diluída em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 – 7.4 e após uma hora foram lavadas novamente em PBS por três vezes durante dois minutos e incubadas na solução de glucose-oxidase/DAB/Níquel (0.6 mg/ml diaminobenzidina; 2,5 mg/ml de cloreto de níquel e amônio e 0,1 mg/ml de glucose oxidase (GND) (Shu, Ju e Fan, 1988). A solução de GND foi utilizada para acentuar o contraste entre os sítios de marcação e a coloração de fundo inespecífica através da utilização do níquel, e ao mesmo tempo diminuir a velocidade da reação pela liberação lenta de oxigênio nascente permitindo maior controle dos resultados. A confirmação da especificidade da reação foi feita pela remoção do anticorpo primário, o que resultou na ausência de imunorreatividade nas secções (Saper e Sawchenko, 2003).

A Figura 09 ilustra em baixo aumento o resultado da imunomarcção seletiva para micróglia em uma série anatômica de secções ordenadas no eixo antero-posterior (A-F). As micróglia para reconstrução foram selecionadas de cada secção de modo a garantir que diferentes regiões no eixo AP tivessem a mesma probabilidade de contribuir para a amostra.

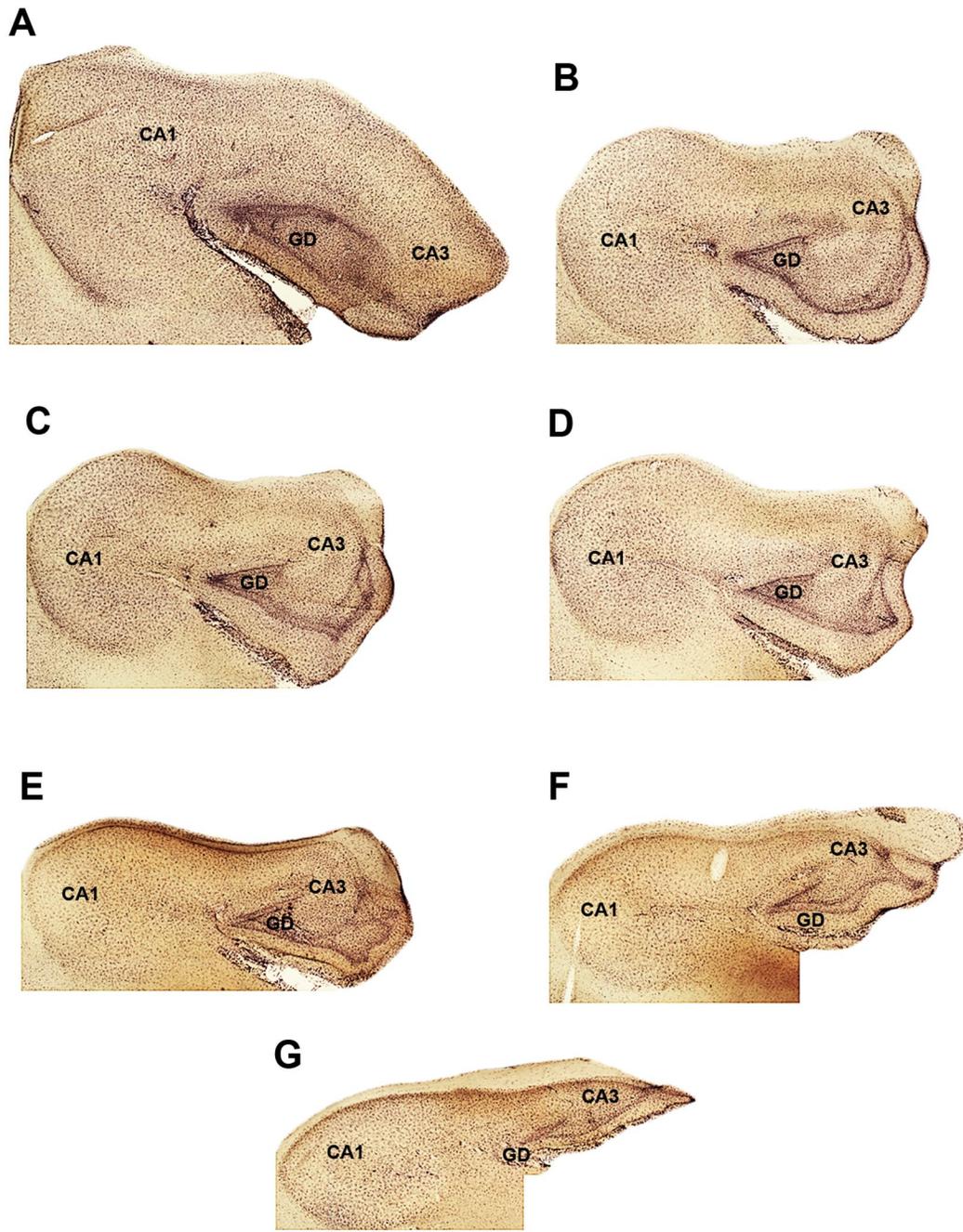


Figura 09. Fotomicrografias do Giro Dentado e Hipocampo do sujeito “M”. Secções coronais imunomarcadas com anticorpo anti-Iba1. As secções rostrais (A-D) e caudais (E-F). GD = Giro Dentado; CA1 e CA3 = Corno de Amon 1 e 3). Escala = 500  $\mu$ m.



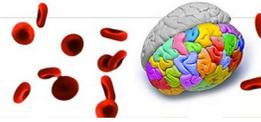
### 3.8 - Morfometria Baseada em Reconstrução Tridimensional

Para a reconstrução tridimensional das micróglias utilizamos o microscópio óptico (Eclipse 80i, NIKON) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC6000 System, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para registro digitalizado da informação relativa às coordenadas espaciais (X, Y, Z) de cada ponto da reconstrução. Esse sistema é acoplado a microprocessador que controla os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (NeuroLucida, MicroBrightfield, Williston, VT, USA) e estoca as coordenadas dos pontos de interesse. No sentido de se evitar ambiguidades na identificação dos objetos de interesse e garantir maior precisão nas reconstruções, a objetiva de 4,0x era substituída por outra PLANFLUOR, 100X (NA 1.3; DF = 0.2  $\mu\text{m}$ ; Nikon, Japan) utilizada para as reconstruções tridimensionais realizadas.

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

Parâmetros de medida para características individuais geralmente podem ser divididos em quatro classes: medidas de tamanho, forma, posição e brilho. Medidas de tamanho como área projetada, perímetro e comprimento são razoavelmente familiares à experiência humana. Ao contrário do tamanho que se pode estimar quantitativamente com certa facilidade, a forma é um conceito mais abstrato onde é necessário muitas vezes utilizar comparações para caracterização dos contornos de um objeto. A maioria das medidas de forma são combinações adimensionais de medidas de tamanho. Um parâmetro de forma que é relativamente familiar à experiência humana é a excentricidade (do inglês: “aspect ratio”), que é calculado como *comprimento*  $\div$  *largura*.

O recíproco deste parâmetro tem sido empregado por muitos anos em trabalhos antropométricos designado como índice cefálico. Outro parâmetro de forma amplamente utilizado em análise de imagens é o fator de forma, calculado



como  $4\pi \times \text{área} \div \text{perímetro}^2$ . O fator de forma para um círculo perfeito é de 1.0. Qualquer outra forma terá maior perímetro para a mesma área e o fator de forma descreve esse aumento.

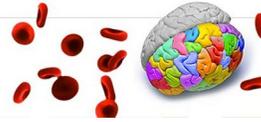
Para um quadrado o fator de forma (do inglês “form factor”) é de 0.785 e para formas mais irregulares ele se torna bem menor. Uma flor com muitas pétalas ou uma secção transversal de microvilosidade intestinal deve ter um fator de forma de 0,05 ou menos.

A esfericidade é muito parecida com o fator de forma (Figura 11). É calculada como  $4\pi \times \text{área} \div \text{diâmetro max}$ . Que mais uma vez é a fórmula da área do círculo onde o valor 1 corresponde a um círculo perfeito. Mas em vez de utilizar o perímetro, a esfericidade usa o maior diâmetro da estrutura, isso torna esta grandeza mais sensível a quão alongada é a estrutura ao invés de o quão irregular é seu perímetro. Não é incomum encontrarmos formas que variam independentemente em sua esfericidade e fator de forma (“form factor”). A esfericidade detecta, portanto a variação no alongamento das estruturas ao mesmo tempo em que é relativamente insensível a angulação. O fator de forma pode discernir estruturas mais anguladas da esquerda das mais curvas da direita e ao mesmo tempo ser insensível ao quanto uma estrutura é alongada (Figura 11).

A compacidade é a medida morfométrica definida da seguinte maneira:

$$\sqrt{4/\pi \times \text{área}} \div \text{diâmetro max}.$$

Outro parâmetro de medida utilizado nesta investigação é a solidez que é a relação entre a área circular projetada (área do círculo que melhor se adapta a figura em análise) dividida pela parte da área da figura que faz intersecção com a área circular projetada; A convexidade é a razão entre perímetro do contorno convexo (contorno que especifica o menor polígono convexo no qual o objeto pode ser colocado) e o perímetro (Russ e Rovner, 1989). O ângulo planar (Figura 12) é definido como o par de ângulos que duas ou mais ramificações fazem com o ramo parental que lhes deu origem. Informação detalhada de cada uma dessas medidas pode ser obtida em: <http://www.mfbioscience.com/neurolucida>

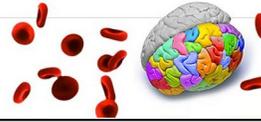


As reconstruções das micróglia foram feitas a partir do giro denteado do *Cebus apella*, mais especificamente da sua camada molecular do giro denteado e do lacunosum molecular de CA1. Foram selecionadas para reconstrução apenas as micróglia que apresentavam terminações completas seguindo ensaio de busca ao acaso dirigida pelo experimentador. Micróglia seccionadas durante o corte foram excluídas. Aplicamos correção para retração induzida pelo processamento histológico nos dados da morfometria de forma linear para todos os grupos experimentais exclusivamente para o eixo z, onde, presumiu-se 75% de retração tal como previamente sugerido (Carlo, C. e Stevens, C., 2011). Foram reconstruídas 580 micróglia no total, distribuídas da seguinte forma: 147 e 145 nos terços externo e médio da camada molecular do giro denteado respectivamente e 188 no lacunosum molecular de CA1. Essas células foram submetidas à análise morfométrica realizada com o programa Neuroexplorer (Microbrightfield, Williston, VT, USA).

Outros itens morfológicos analisados estão expressos na tabela 01. A média aritmética e o desvio padrão foram calculados para cada variável morfológica para todos os grupos experimentais.

Tabela 01 – Definição dos Parâmetros morfométricos analisados.

<b>Área do Soma</b>	Área definida pelo contorno do corpo celular.
<b>Convexidade</b>	Comprimento do envoltório convexo dividido pelo comprimento do perímetro real. O envoltório convexo é um contorno imaginário, no qual o ângulo entre quaisquer dois segmentos de linhas adjacentes é convexo, de tal forma que este contorno imaginário se encaixa no contorno real o mais próximo possível.
<b>Número de Protrusões</b>	Soma do número total de protrusões (processos semelhantes à espinhas) presentes em cada micróglia.
<b>Número de Pontos de Ramificações</b>	Soma total de todos os pontos de ramificação originando dois ou mais segmentos.
<b>Número de Finalizações</b>	Número total de finalizações verdadeiras (que não



	interceptam os planos de corte das secções) de cada micróglia.
<b>Comprimento dos Ramos (segmentos)</b>	Soma dos valores do comprimento de todos os ramos (segmentos) pertencente a cada árvore microglial.
<b>Área de Secção Cruzada dos Ramos (segmentos)</b>	O início e o fim de cada segmento tem como raio o valor determinado pelo tamanho da inserção circular da cruz do cursor usado durante o traçado. Para estimá-la basta multiplicar os valores dos raios pelo comprimento do segmento. $A_s = \pi \times (r_1 + r_2) \times SQRT[(r_1 - r_2) \times (r_1 - r_2) + (L \times L)]$ , onde L = comprimento do segmento; R1 = raio no início do segmento; R2 = raio no fim do segmento.
<b>Volume dos Ramos (segmentos)</b>	É calculado de acordo com a seguinte equação: $V = \frac{1}{3} \times \pi \times L \times [(r_1 \times r_1) + (r_2 \times r_2) + (r_1 \times r_2)]$ , onde: L = comprimento do segmento; R1=raio no início do segmento. R2 = raio no fim do segmento.
<b>Tortuosidade</b>	A tortuosidade da arborização microglial é a razão entre o comprimento de um ramo e a distância entre os seus pontos de finalizações (ver figura 10).
<b>Ângulo Planar</b>	Ângulo entre um a continuação do ramo primário e os ramos secundários (ver figura 12).
<b>Diâmetro da Base do Ramo Primário</b>	O diâmetro do círculo contido na base da forma cilíndrica do primeiro ramo a sair do corpo celular.
<b>Dimensão Fractal</b>	Limite inferior do número de variáveis essenciais necessárias para descrever a dinâmica de um sistema; aqui ela representa o grau de complexidade morfológica da micróglia (ver figura 13).

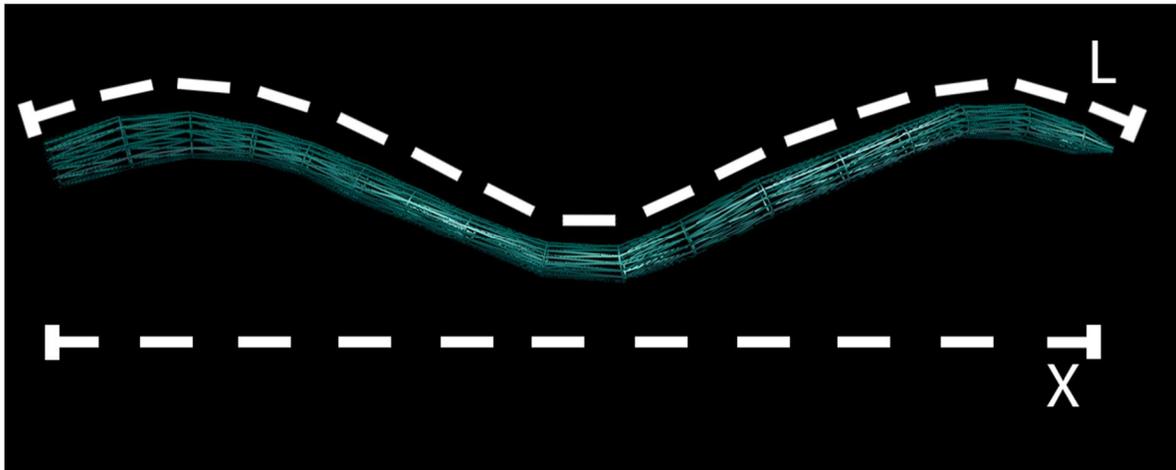


Figura 10. O valor da tortuosidade de um ramo microglial é definido pela razão  $L/X$  onde  $L$  representa o comprimento real do ramo microglial e  $X$  a menor distância entre as extremidades do ramo em questão. Extraída de Guerreiro-Diniz, 2013.

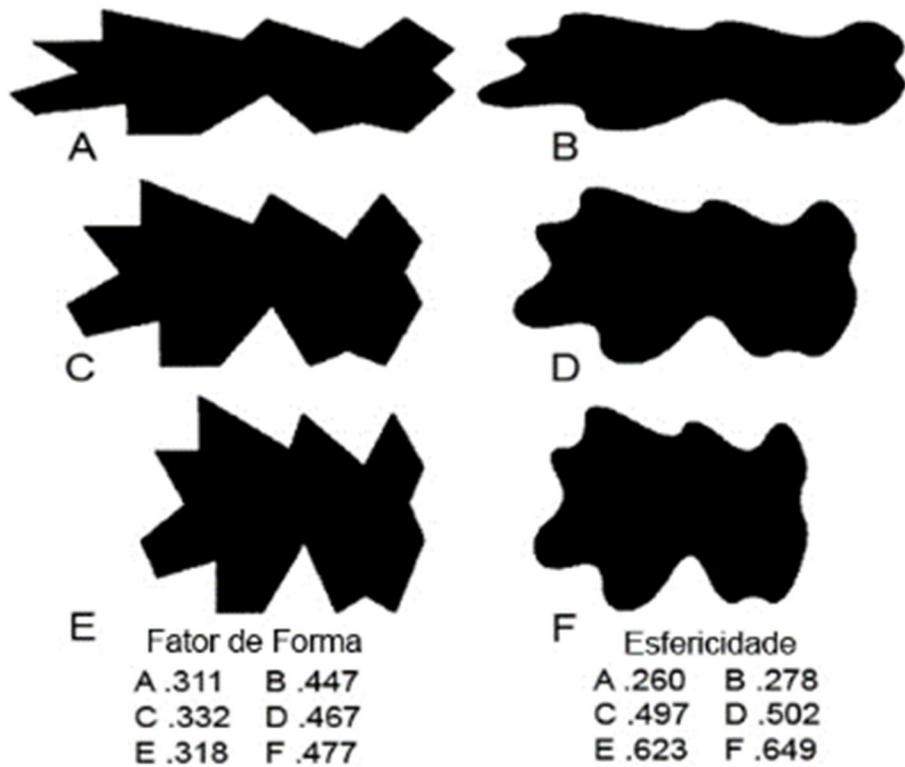


Figura 11. Figuras com variações em suas formas comparadas por seu fator de forma (“form factor”) e esfericidade (“roundness”) (Russ e Rovner, 1989). Extraída de Guerreiro-Diniz 2013

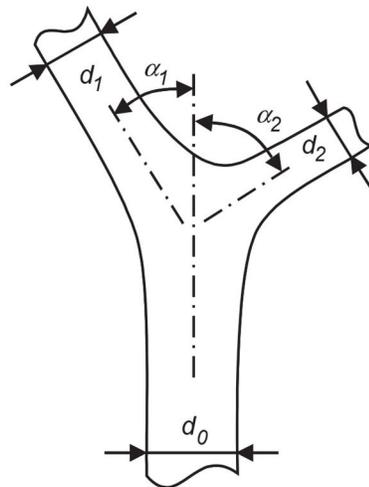


Figura 12. A geometria de um ramo é caracterizada pelo diâmetro dos ramos primários ( $d_0$ ), e dos ramos secundários ( $d_1$ ,  $d_2$ ) e pelos ângulos planares formados entre esses ramos ( $\alpha_1, \alpha_2$ ). Nós medimos esses parâmetros em micróglia de maçaricos, ratos e macacos e comparamos as diferenças interespecíficas (Shefi *et al.*, 2004). Figura extraída de Guerreiro-Diniz, 2013

## Dimensão Fractal

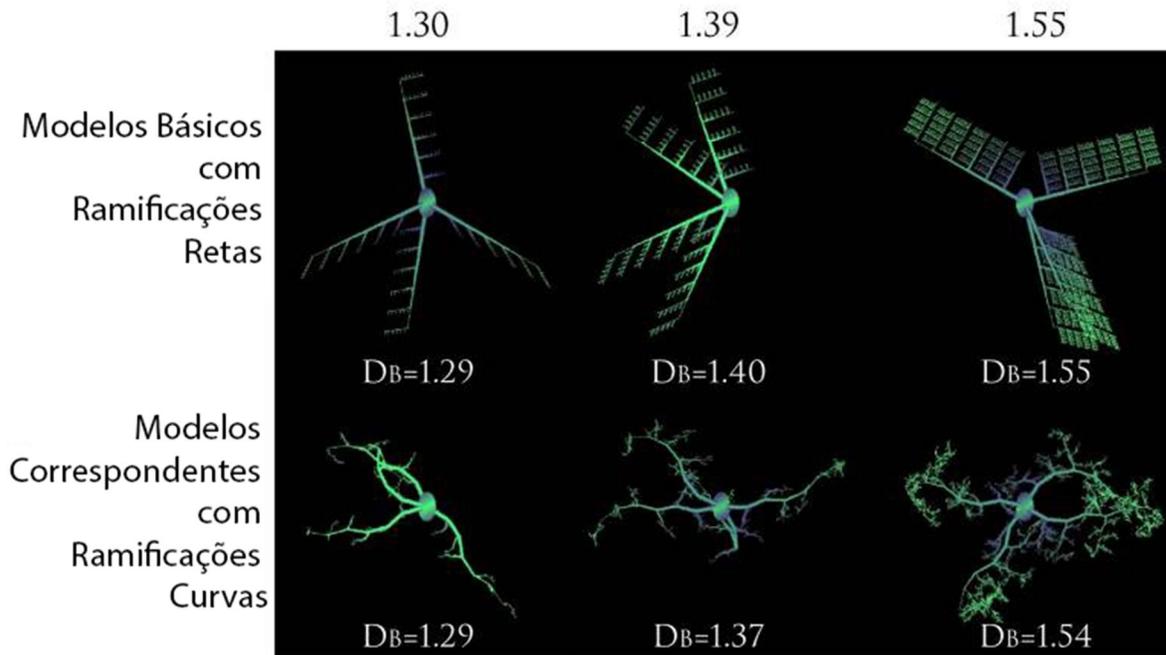
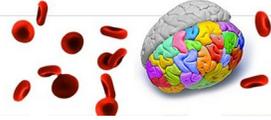


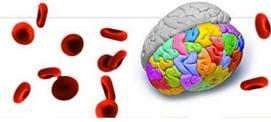
Figura 13. A Dimensão Fractal reflete a complexidade de padrões de ramificação. As estruturas ramificadas foram geradas por modelagem computacional de acordo com regras preestabelecidas. Em cada nova ramificação a relação entre os comprimentos do ramo parental e do novo ramo foram alteradas para mostrar como as propriedades dos ramos influenciam a dimensão fractal e a dimensão de caixa de contagem. Em ambas as séries a direção permitida para o crescimento do ramo foi aleatória. A única diferença entre as duas séries está na curvatura permitida aos processos. Os valores para a dimensão de caixa de contagem são médias para grupos similares e não representam apenas os modelos mostrados na figura. Modelado com o software Micromod Free (Karperien, 1999; Jelinek *et al.*, 2002). Extraída de Guerreiro-Diniz 2013.



### 3.9 - Análise Estatística

Um conjunto crescente de evidências sugere que existe variabilidade biológica substancial entre diferentes indivíduos e isso é verdadeiro tanto para ensaios comportamentais como para achados morfológicos. Essa variabilidade interindividual é expressa pela dispersão da amostra. Para evitar tratamentos baseados em medidas de tendências centrais (incluindo média e desvios) quando da ocorrência de altos níveis de variabilidade emprega-se a análise de aglomerados (também denominada de análise conglomerados ou de aglomerados ou de grupos). Essa análise é um tipo de estatística multivariada que tem sido aplicada a uma ampla variedade de abordagens comportamentais (Casarrubea, Sorbera e Crescimanno, 2009) e em estudos morfológicos incluindo o de reconstruções tridimensionais (Rocha *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2008; Viana *et al.*, 2013) sendo principalmente utilizada quando não há nenhuma hipótese *a priori* acerca da ocorrência de conglomerados ou grupos na amostra (Bitsika, Sharpley e Orapeleng, 2008; Casarrubea, Sorbera e Crescimanno, 2009; Hilborn *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2009). Em linha com essas recomendações detectamos os perfis de dispersão através da análise de conglomerados identificando grupos distintos dentro de nossa amostra selecionada para estudar a morfologia da micróglia. A análise discriminante desses aglomerados permite identificar as variáveis que mais contribuem para a discriminação dos grupos. Para tentar identificar possíveis correlações entre a morfologia da micróglia e o desempenho comportamental aplicou-se o teste de ajuste curvas reunindo associando caso a caso o desempenho comportamental através da taxa de aprendizado a suas respectivas morfologias microgлияis refletidas nas variáveis morfométricas. Para a análise estatística foram utilizados os Programas: BioEstat® 5.0; Statistical for Windows® version 5.0 A; GraphPad Prism 5 for Windows®.

Em raras ocasiões valores extremos foram detectados e excluídos de todas as amostras com base em análises da normalidade. A análise de variância (ANOVA um critério) foi aplicada para estimar possíveis diferenças entre os animais.



### **3.10 - Fotomicrografias e Pós-Processamento de Imagens**

Para obtenção de fotomicrografias utilizamos câmera digital (Microfire, Optronics, CA, USA) acoplada a microscópio Nikon (Eclipse 80i, NIKON) sendo as imagens pós-processadas com auxílio de software especializado (Adobe Photoshop 7.0.1 C.S.2, San José, CA, USA) ajustando brilho e contraste. As imagens das micróglias fotografadas foram selecionadas a partir de reconstruções cujos parâmetros morfométricos mais se aproximaram dos valores médios obtidos para cada animal em particular.

## **4 - RESULTADOS**

### **4.1 - Ensaio Comportamentais**

A Figura 14 expressa os resultados comportamentais em taxa de aprendizado calculado em função do número de tentativas para o sucesso ao longo das sessões de treino. Como se pode ver, os sujeitos “M” e “S” têm desempenhos significativamente melhores do que os indivíduos “J” e “F”. Enquanto os primeiros aprendem e lembram da posição do objeto com desempenhos crescentes expressos pela redução do número de tentativas para o sucesso após 3 e 4 sessões de treino respectivamente, os últimos só atingem valores sustentados de taxa de aprendizado na 13<sup>a</sup> e na 19<sup>a</sup> sessões de treino respectivamente.

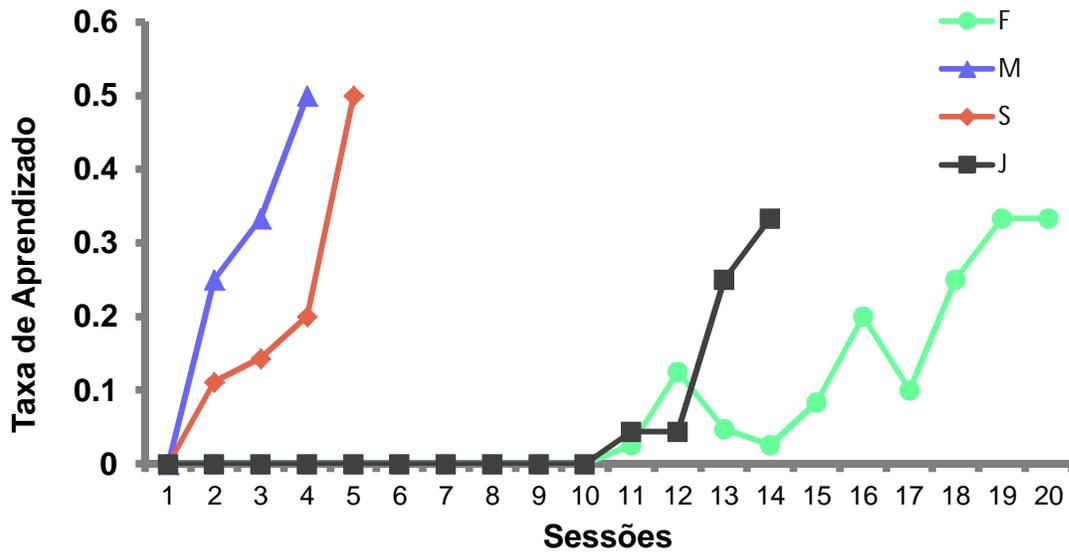
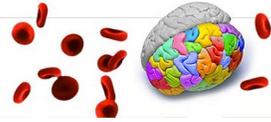


Figura 14. Taxa de aprendizado em função do número de sessões para os indivíduos F, M, S e J.

#### 4.2 - Morfometria da Micróglia no Lacunosum Molecular de CA1

A Figura 15 ilustra em representações gráficas os valores médios, os erros padrão respectivos e as diferenças significativas entre os parâmetros morfométricos das micróglia do lacunosum molecular de CA1 para os diferentes sujeitos estudados. Nenhuma das variáveis morfométricas da micróglia que apresentaram diferenças significativas entre os indivíduos revelaram qualquer correlação com o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial.

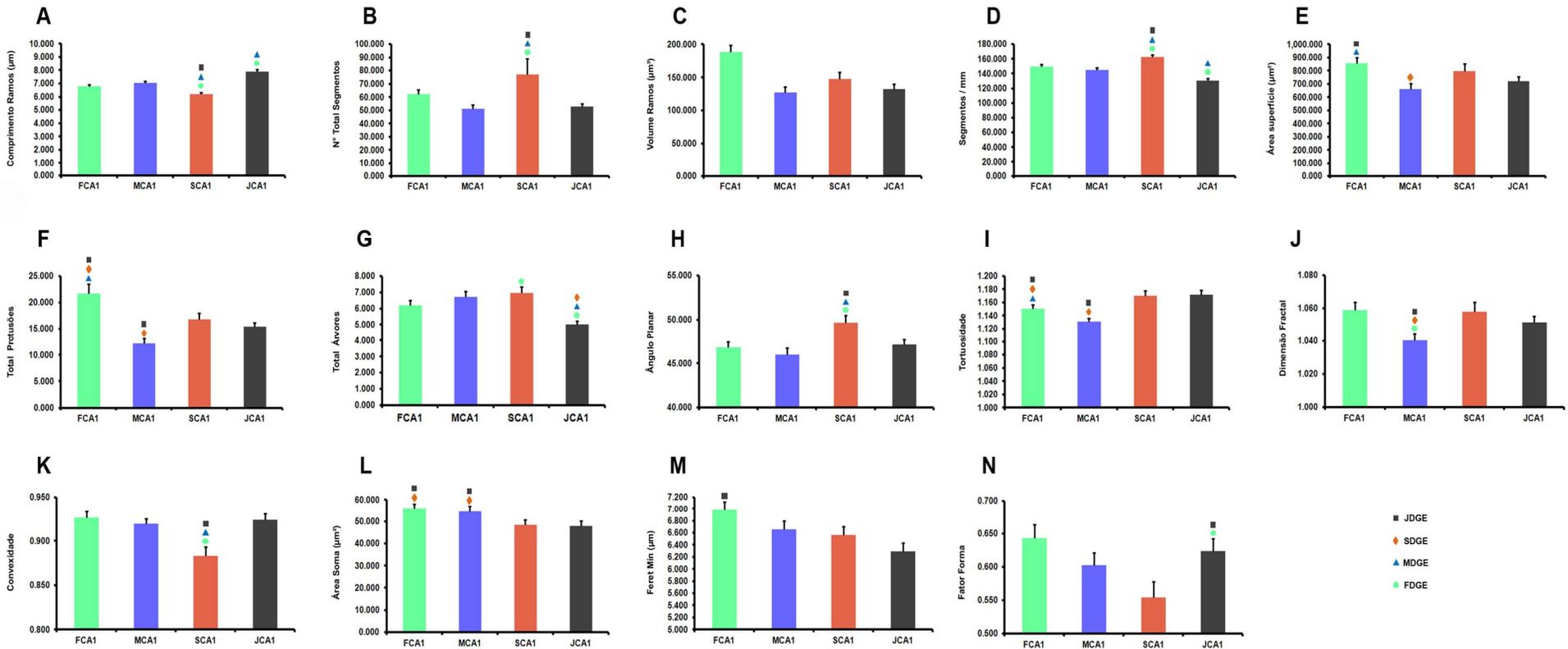
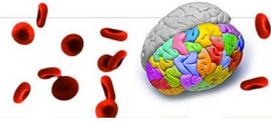


Figura 15. Representações gráficas dos valores médios e respectivos erros padrão de 14 parâmetros morfológicos da micróglia dos sujeitos F, M, S e J que apresentaram diferenças estatísticas significativas em CA1. Dez desses parâmetros se referem às diferenças morfométricas encontradas nas árvores da micróglia (A-J) e outros cinco se referem às diferenças encontradas nas medidas do soma (K-N). As cores distinguem cada um dos espécimens estudados e a posição e as cores dos símbolos sobre as colunas indicam a comparação que gerou a diferença significativa apontada por eles.



### **4.3 - Morfometria da Micróglia nos Terços Externo e Médio da Camada Molecular do Giro Denteado**

As Figuras 16 e 17 ilustram em representações gráficas as diferenças entre as médias de diferentes parâmetros morfométricos da micróglia dos terços externo e médio do giro denteado para os sujeitos F, M, S e J.

No que concerne ao terço externo (Figura 16) as micróglias dos sujeitos F e J apresentaram árvores microgliais com volume de ramos, área de superfície, tortuosidade, ângulo planar, e diâmetro da base do ramo primário significativamente maiores do que os dos sujeitos M e S. Por outro lado os sujeitos M e S apresentaram maior densidade de segmentos (segmentos/mm) do que os sujeitos F e J. Em relação às medidas somáticas, foram igualmente maiores os valores médios dos perímetros, das áreas e do Feret Máximo dos somas microgliais nos indivíduos F e J em comparação aos sujeitos M e S.

Em relação ao terço médio (Figura 17) a micróglia dos sujeitos F e J exibiram comprimento e volume médio dos ramos, número de varicosidades, tortuosidade, área de superfície e dimensão fractal maiores do que os sujeitos M e S. Da mesma forma que no terço externo os valores médios da densidade segmentos foram maiores nos sujeitos M e S do que nos sujeitos F e J. Além disso, as médias das medidas somáticas de perímetro, área e Feret Máximo foram significativamente maiores nos sujeitos F e J do que em M e S.

Para acesso aos números absolutos associados às diferenças estatísticas de cada parâmetro morfométrico da micróglia entre os sujeitos, incluiu-se nos anexos 01, 02 e 03 as tabelas correspondentes aos dados de CA1, terço externo e terço médio do giro denteado respectivamente.

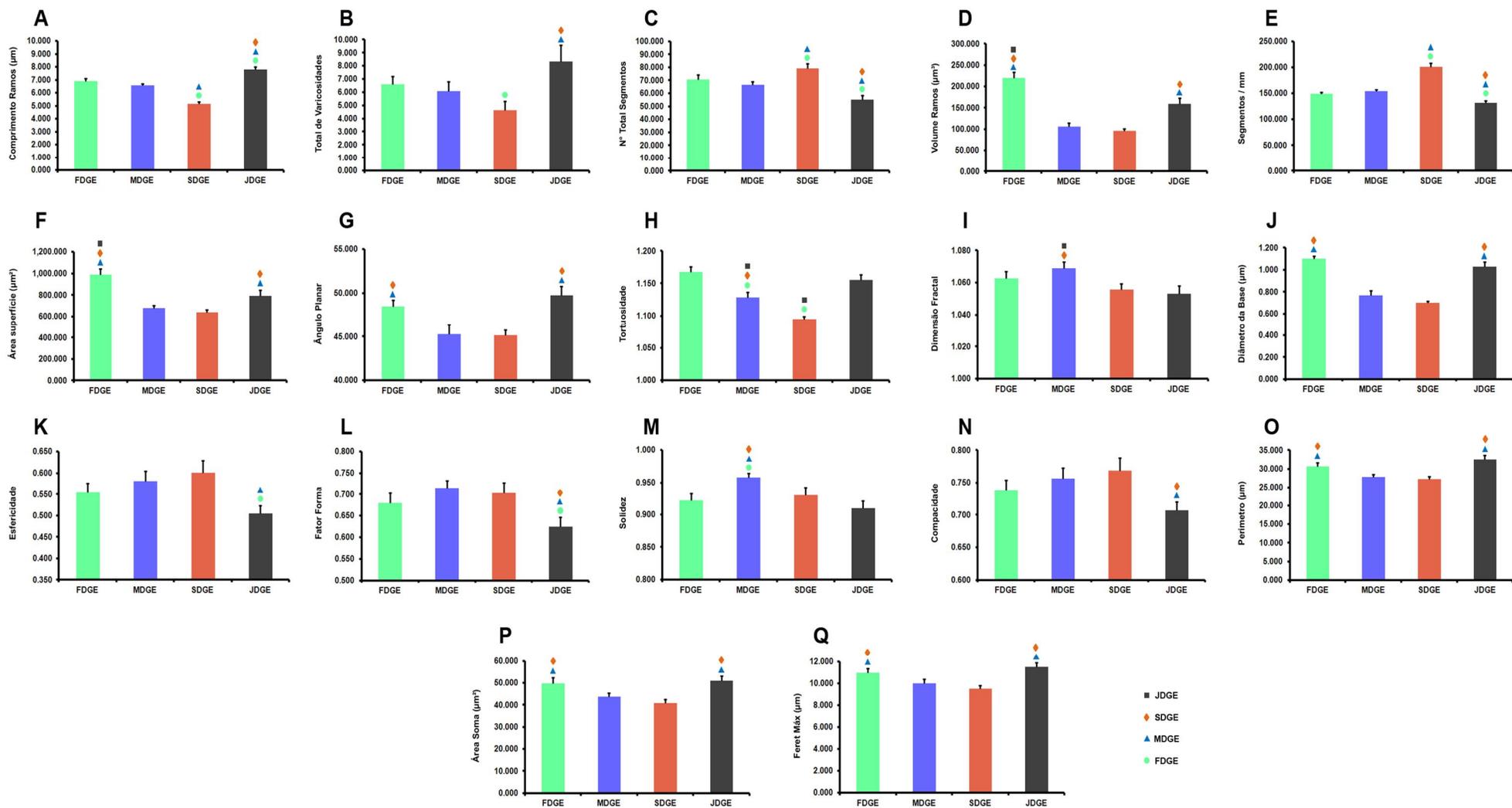


Figura 16: Representações gráficas dos valores médios e respectivos desvios padrão de 15 parâmetros morfológicos dos sujeitos F, M, S e J que apresentaram diferenças estatísticas significativas na micróglia do terço externo da camada molecular do giro denteado. Dez desses parâmetros se referem às diferenças morfométricas encontradas nas árvores da micróglia e outros 5 (A,C,I,O e P) se referem às diferenças encontradas nas medidas do soma. As cores distinguem cada um dos espécimens estudados e a posição e as cores dos símbolos de significância sobre as colunas indicam a comparação que gerou a diferença significativa apontada por eles.

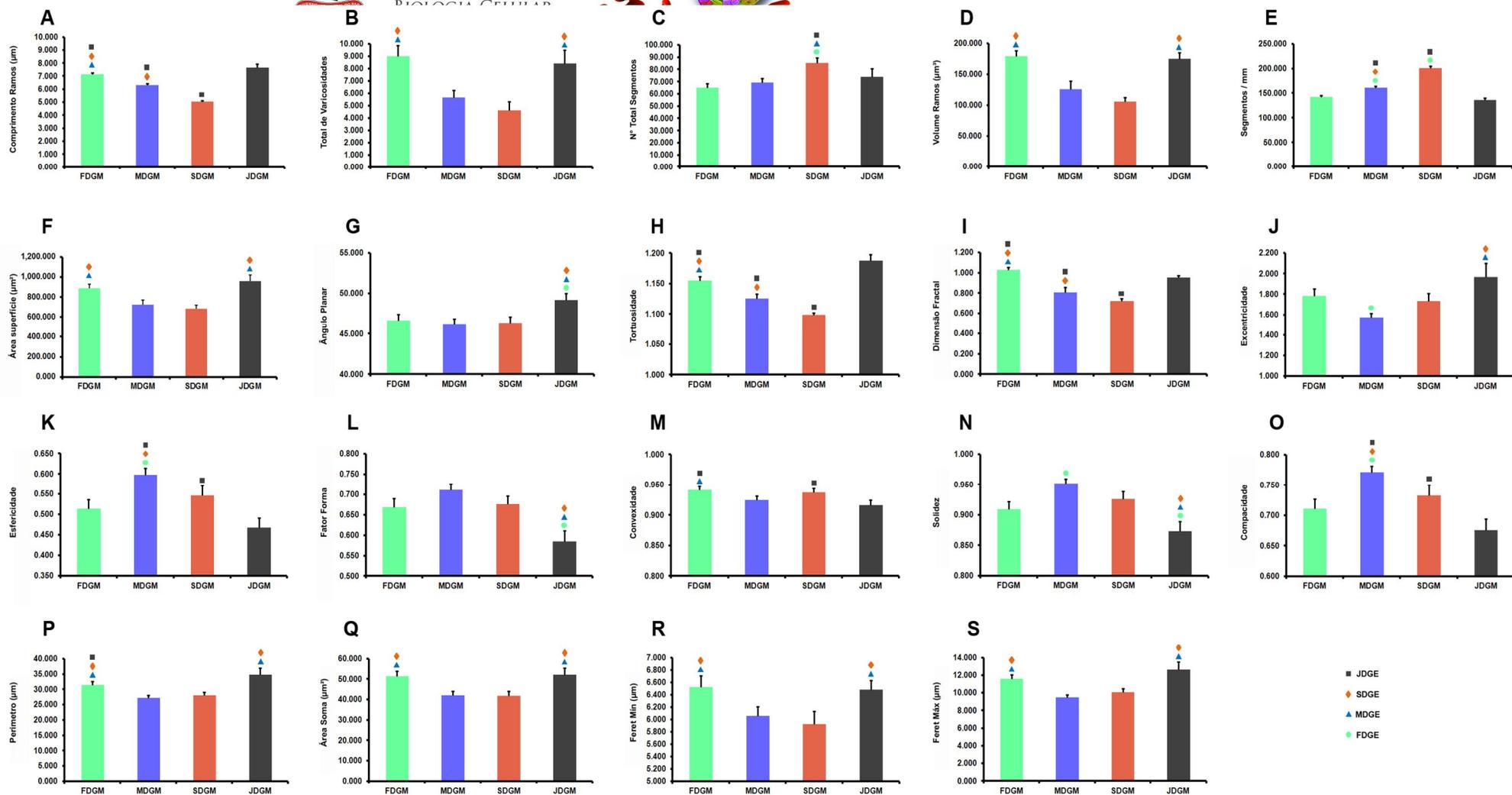
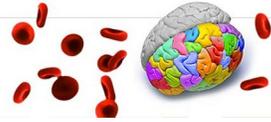


Figura 17: Representações gráficas dos valores médios e respectivos desvios padrão de 20 parâmetros morfológicos dos sujeitos F, M, S e J que apresentaram diferenças estatísticas significativas no terço médio da camada molecular do giro dentado. Onze desses parâmetros se referem às diferenças morfométricas encontradas nas árvores da microglia e outros 9 (F, H, I, J, K, L, M, N e O) se referem às diferenças encontradas nas medidas do soma. As cores distinguem cada um dos espécimens estudados e a posição e cor dos símbolos sobre as colunas indicam a comparação que gerou a diferença significativa apontada por eles.



#### **4.4 - Análise de Correlação entre Desempenho no Teste de Aprendizado Associado Pareado – TAP e Morfologia da Micróglia**

Da comparação entre as micróglia médias dos sujeitos F e J (piores desempenhos cognitivos no TAP) e os dois outros sujeitos M e S (melhores desempenhos), previamente apresentadas, torna-se evidente que a micróglia média tem parâmetros morfométricos muito diferentes entre aqueles e estes.

Quando se buscam possíveis correlações entre esses parâmetros morfométricos com o desempenho no teste TAP encontram-se valores significantes entre vários dos parâmetros das micróglia dos terços externo (volume dos ramos, diâmetro da base do ramo primário, Ferret Min) e médio (volume dos ramos, total de árvores, varicosidades, área do soma, Ferret Min e Ferret Max) do giro denteado mas não com aqueles das micróglia do lacunosum molecular de CA1. As Tabelas 2 e 3 reúnem tais correlações indicando a sua natureza, o valor do coeficiente de determinação e o valor de p para cada parâmetro. Considerou-se como adequada todas as correlações onde o coeficiente de determinação estimado foi  $R^2 \geq 89\%$  e o valor de  $p \leq 0,05$ .

#### **4.5 - Análise de Agrupamentos e Discriminante da Morfologia da Micróglia dos Terços Externo e Médio da Camada Molecular do Giro Denteado**

A Figura 18 ilustra à esquerda reconstruções tridimensionais de micróglia representativas dos terços externo e médio da camada molecular do giro denteado que mais se aproximam dos valores morfométricos médios dos conglomerados identificados nos sujeitos “F” e “M” (pior e melhor desempenhos no teste comportamental respectivamente). À direita são apresentadas fotomicrografias das células reconstruídas em três dimensões em vários planos de foco, separados um do outro por 1 $\mu$ m. As células escolhidas para ilustração são as que mais se aproximam dos valores morfométricos médios de cada grupo definido pela análise conglomerados.

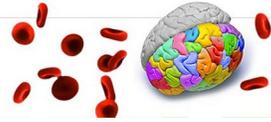
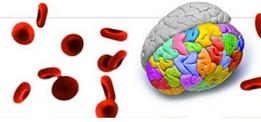


Tabela 2. Correlações entre a morfometria da micróglia do terço externo (GDE) da camada molecular do giro denteado e os desempenhos comportamentais.

	Regressão Linear	Regressão Exponencial	Regressão Logarítmica	Regressão Geométrica
Volume dos Ramos				
(R <sup>2</sup> ) =	ns	ns	ns	91.37%
(p) =	ns	ns	ns	0.0441
Diâmetro da Base do Ramo Primário				
(R <sup>2</sup> ) =	ns	ns	94.43%	92.96%
(p) =	ns	ns	0.0282	0.0358
Ferret Min				
(R <sup>2</sup> ) =	92.79%	93.25%	ns	ns
(p) =	0.0367	0.0343	ns	ns

Tabela 3. Correlações entre a morfometria da micróglia do terço médio (GDM) da camada molecular do giro denteado e os desempenhos comportamentais.

	Regressão Linear	Regressão Exponencial	Regressão Logarítmica	Regressão Geométrica
Volume dos Ramos				
(R <sup>2</sup> ) =	92.79%	93.25%	ns	ns
(p) =	0.0367	0.0343	ns	ns
Número de Árvores				
(R <sup>2</sup> ) =	91.19%	92.41%	93.75%	94.29%
(p) =	0.045	0.0387	0.0317	0.029
Número de Varicosidades				
(R <sup>2</sup> ) =	ns	ns	0.9158	ns
(p) =	ns	ns	0.043	ns
Área do Soma				
(R <sup>2</sup> ) =	94.38%	94.44%	95.06%	95.26%
(p) =	0.0285	0.0282	0.025	0.024
Ferret Min				
(R <sup>2</sup> ) =	ns	ns	92.41%	92.00%
(p) =	ns	ns	0.0387	0.0408
Ferret Max				
(R <sup>2</sup> ) =	ns	89.56%	ns	ns
(p) =	ns	0.0536	ns	ns



As Figuras 19 a 26 ilustram os resultados da análise de conglomerados para cada sujeito (F, M, S, J) empregando as variáveis para as quais se identificou correlações significativas com o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial. Para todos os animais empregou-se o modelo analítico que utiliza a distância euclidiana para medir a separação entre os grupos através de ligações completas na análise.

As Figuras 19 e 20 ilustram os resultados da análise de agrupamentos para as micróglia dos terços externo e médio da camada molecular do giro denteado do sujeito F. Dois conglomerados foram obtidos a partir de análise multivariada dos dados desse indivíduo, adotando-se as seguintes variáveis morfométricas: ângulo planar e volume de ramos para o terço externo e varicosidades, Ferret Min e Max e volume dos ramos para o terço médio. O volume de ramos foi de longe a variável morfométrica da reconstrução tridimensional da micróglia que mais contribuiu para a discriminação dos conglomerados em todos os indivíduos, independente da fração laminar analisada (terço externo ou médio). A micróglia que mais se aproxima do valor médio de cada cluster para o sujeito F é representada na figura como uma reconstrução tridimensional alinhada com o seu respectivo conglomerado.

Seguindo essa mesma estratégia de análise representam-se nas Figuras 21 a 26 os resultados para as micróglia dos terços externo e médio da camada molecular do giro denteado dos sujeitos M (Figuras 21 e 22), S (Figuras 23 e 24) e J (Figuras 25 e 26). Note a formação de dois aglomerados principais em todas as análises e o envolvimento sistemático do volume dos ramos como a variável de maior poder discriminante em todos os casos. As análises discriminantes subsequentes das micróglia dos terços externo e médio estão ilustradas nas Figuras 27 e 28. Para tanto empregou-se as variáveis morfométricas que demonstraram correlação com o comportamento. Da análise do conjunto dos dados representados em cores diferentes para cada sujeito nas Figuras 27 e 28, torna-se aparente que os animais de melhor e pior desempenhos facilmente se distinguem uns dos outros.

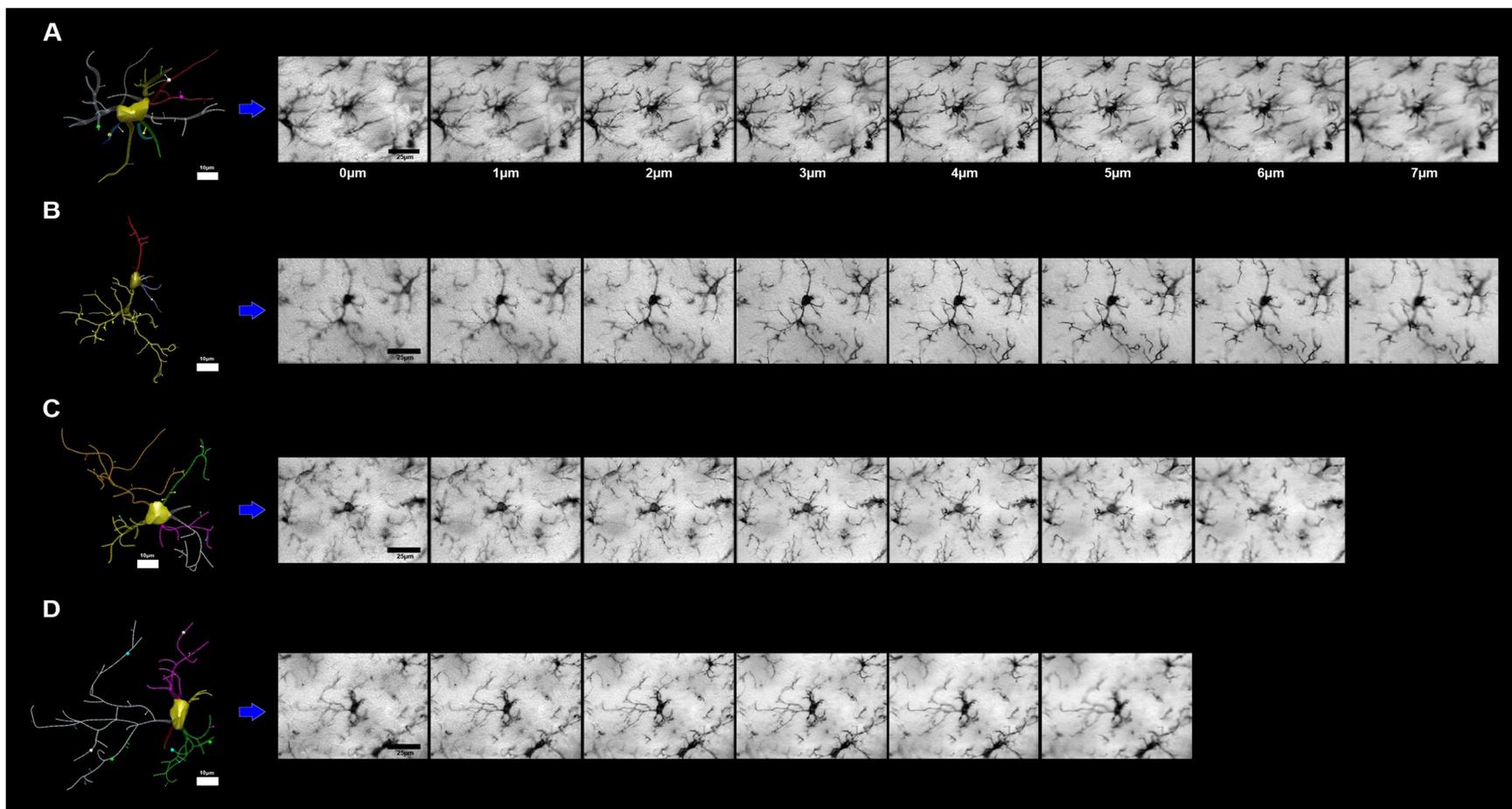


Figura 18. Reconstruções tridimensionais e fotomicrografias de micróglia representativas dos terços externo e médio da camada molecular do giro denteado que mais se aproximam dos valores morfométricos médios dos sujeitos “F” e “M”. A, B: Células médias dos terços externo e médio da camada molecular do sujeito “F”. C, D: Células médias dos terços externo e médio da camada molecular do sujeito “M”. Fotomicrografias obtidas com objetiva de 100x em com intervalo de 1  $\mu\text{m}$  com escala: 25  $\mu\text{m}$  e reconstruções tridimensionais com escala: 10  $\mu\text{m}$ . Escala: 25  $\mu\text{m}$ .

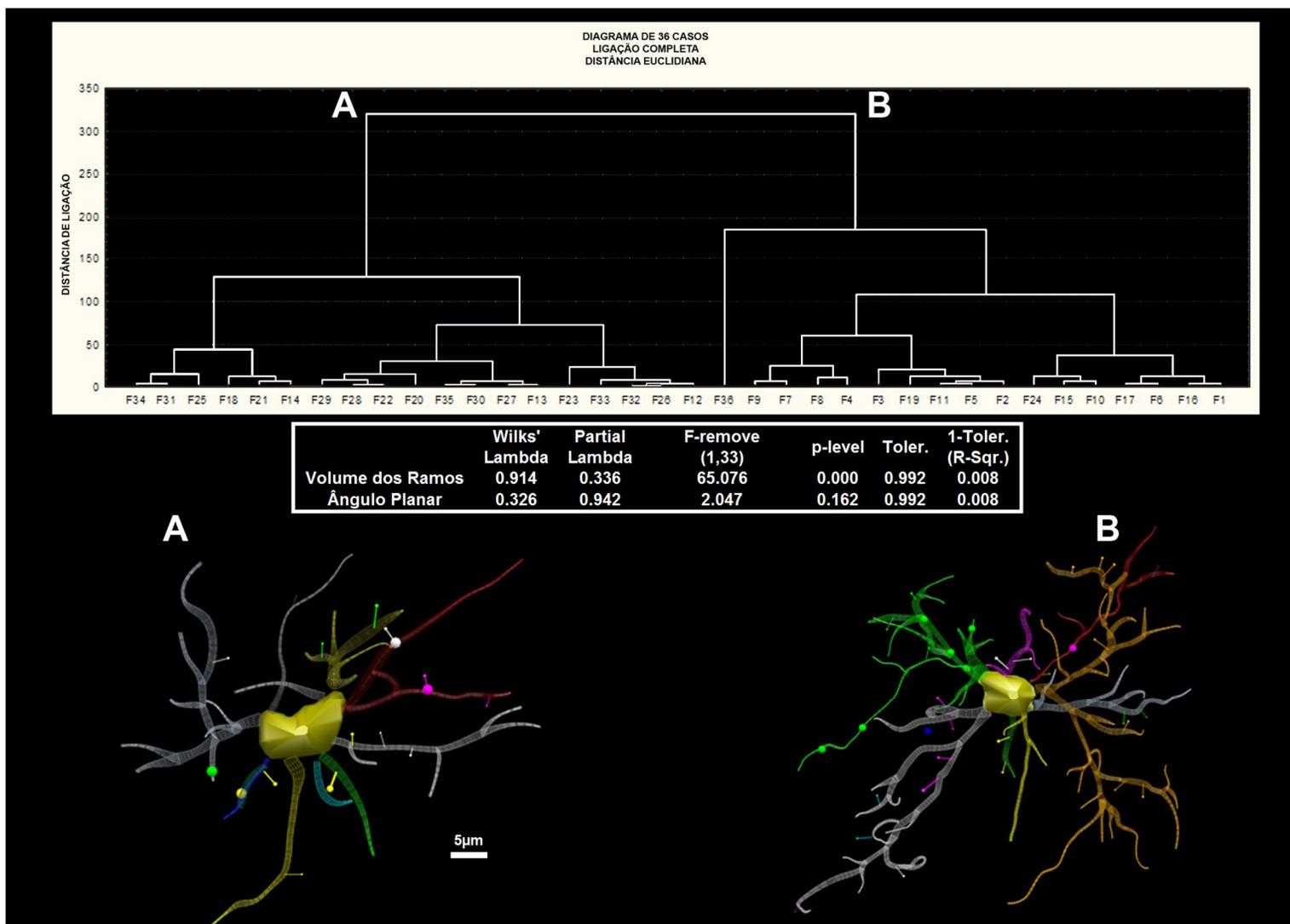


Figura 19. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia do terço externo da camada molecular do giro dentado do sujeito F empregando as variáveis morfométricas com correlação significativa com o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial (ângulo planar e volume de ramos).

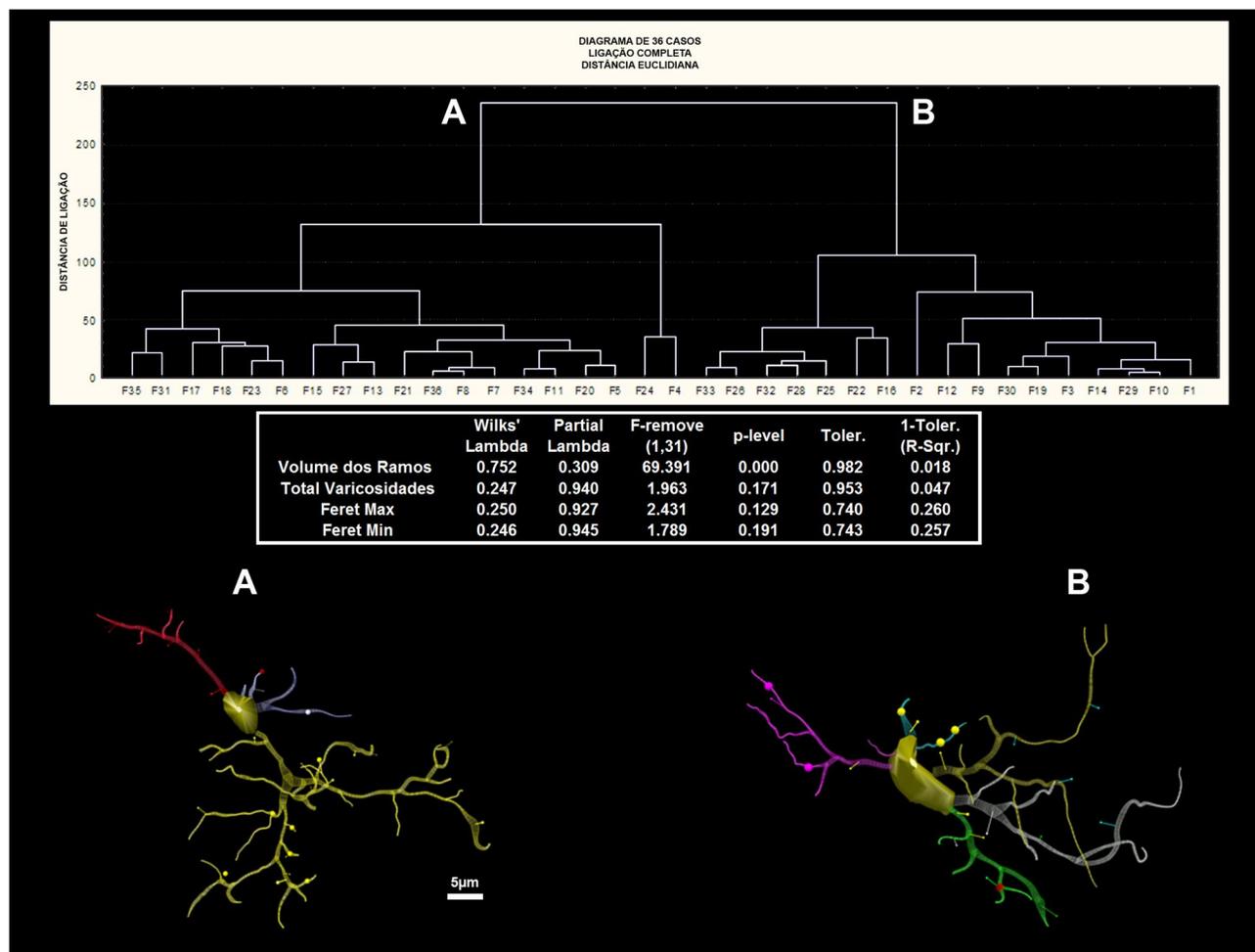


Figura 20. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia do terço médio da camada molecular do giro dentado do sujeito F empregando as variáveis morfométricas com correlação significativa com o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial (varicosidades, Ferret Min e Max e volume dos ramos). A micróglia que mais se aproxima da micróglia média de cada conglomerado para o sujeito F é representada na figura como uma reconstrução tridimensional alinhada com o seu respectivo agrupamento.

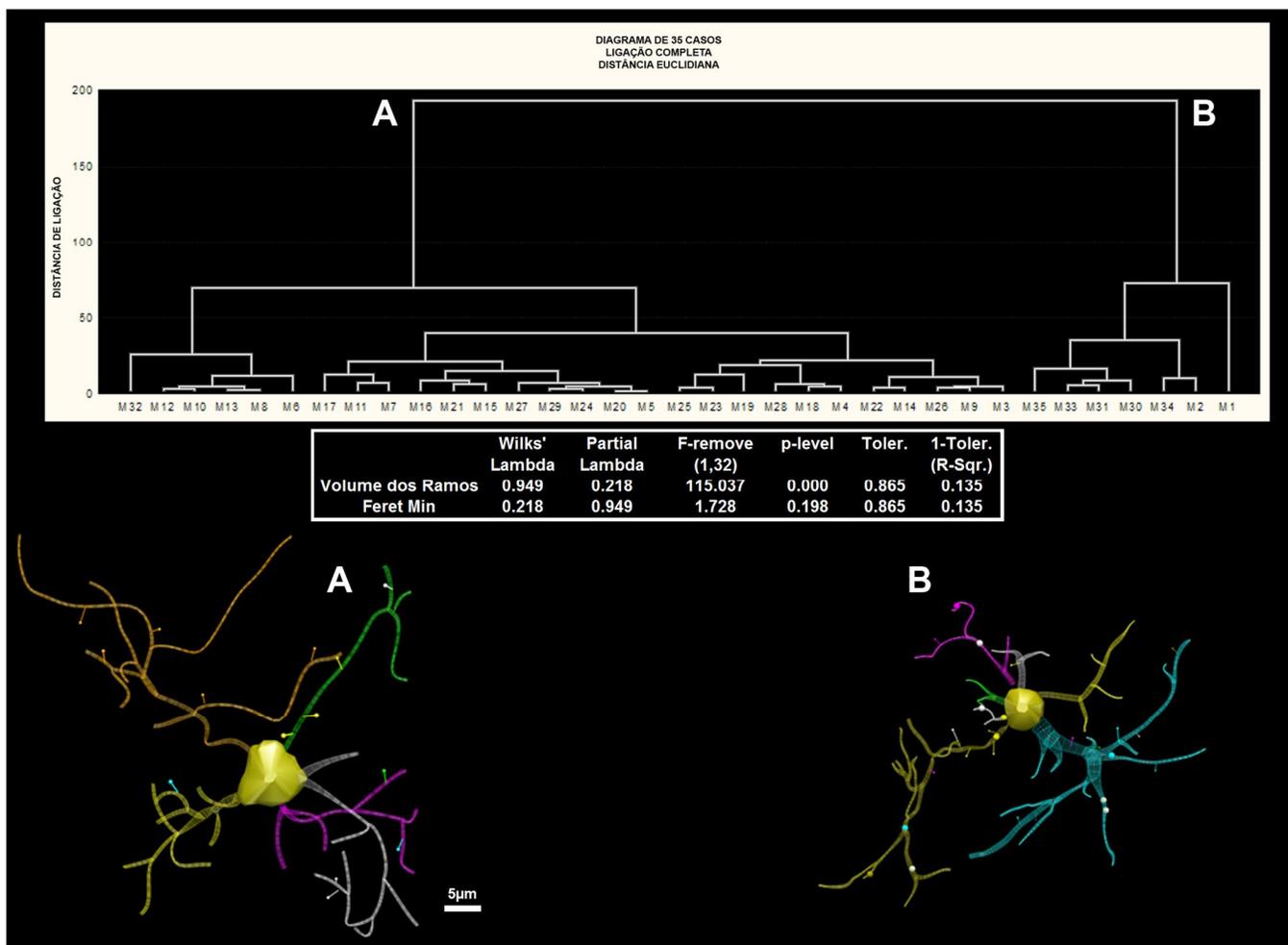


Figura 21. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia do terço externo da camada molecular do giro denteado do sujeito M empregando as variáveis morfométricas com correlação significativa com o desempenho no teste de aprendizagem e memória espacial (Feret mínimo e volume de ramos). A micróglia que mais se aproxima da micróglia média de cada conglomerado para o terço externo da camada molecular do giro denteado do sujeito M é representada na figura como uma reconstrução tridimensional alinhada com o seu respectivo agrupamento.

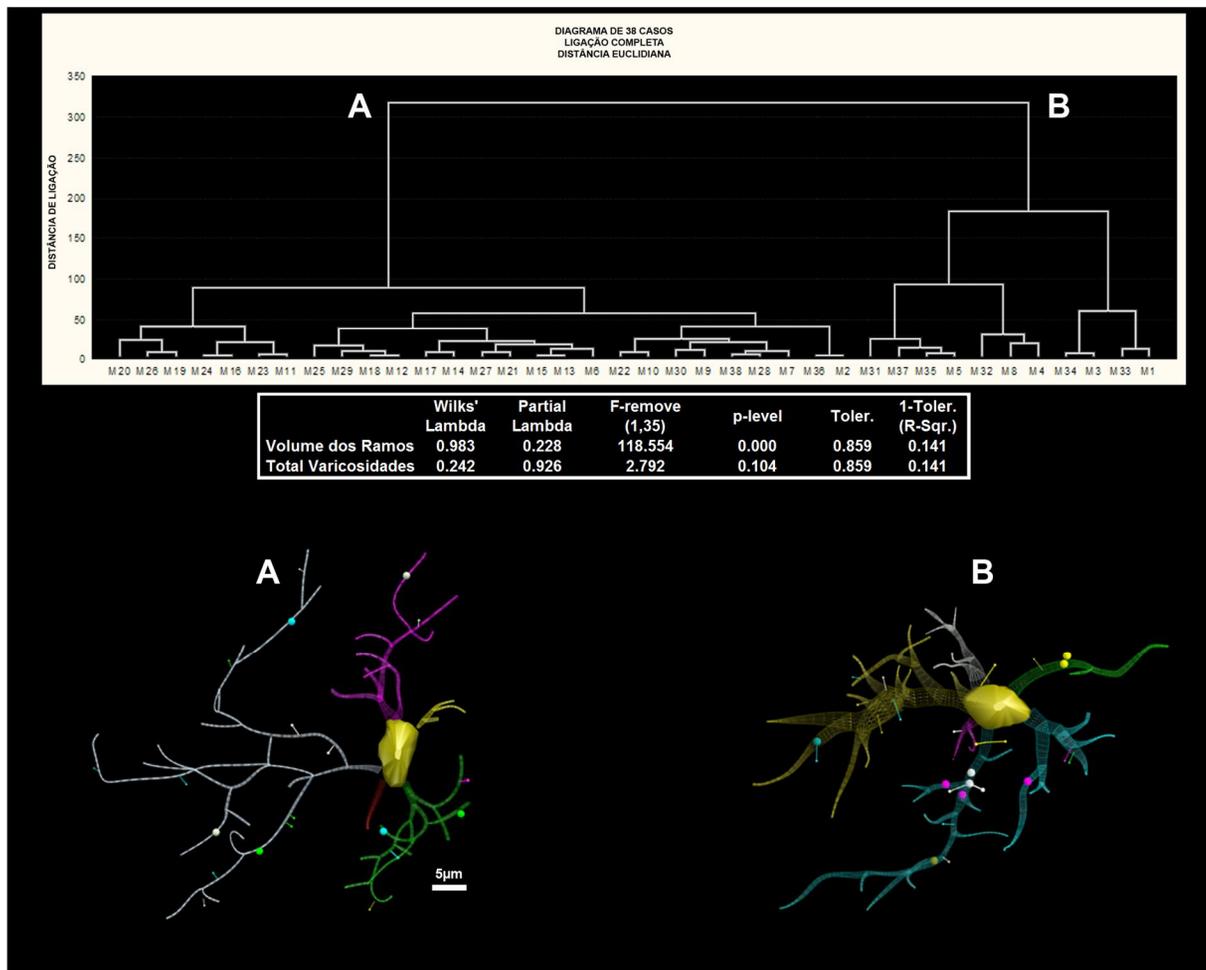


Figura 22. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia do terço médio da camada molecular do giro dentado do sujeito M empregando as variáveis morfométricas com correlação significativa com o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial (número de varicosidades e volume de ramos). A micróglia que mais se aproxima da micróglia média de cada conglomerado para o terço médio da camada molecular do giro dentado do sujeito M é representada na figura como uma reconstrução tridimensional alinhada com o seu respectivo agrupamento.

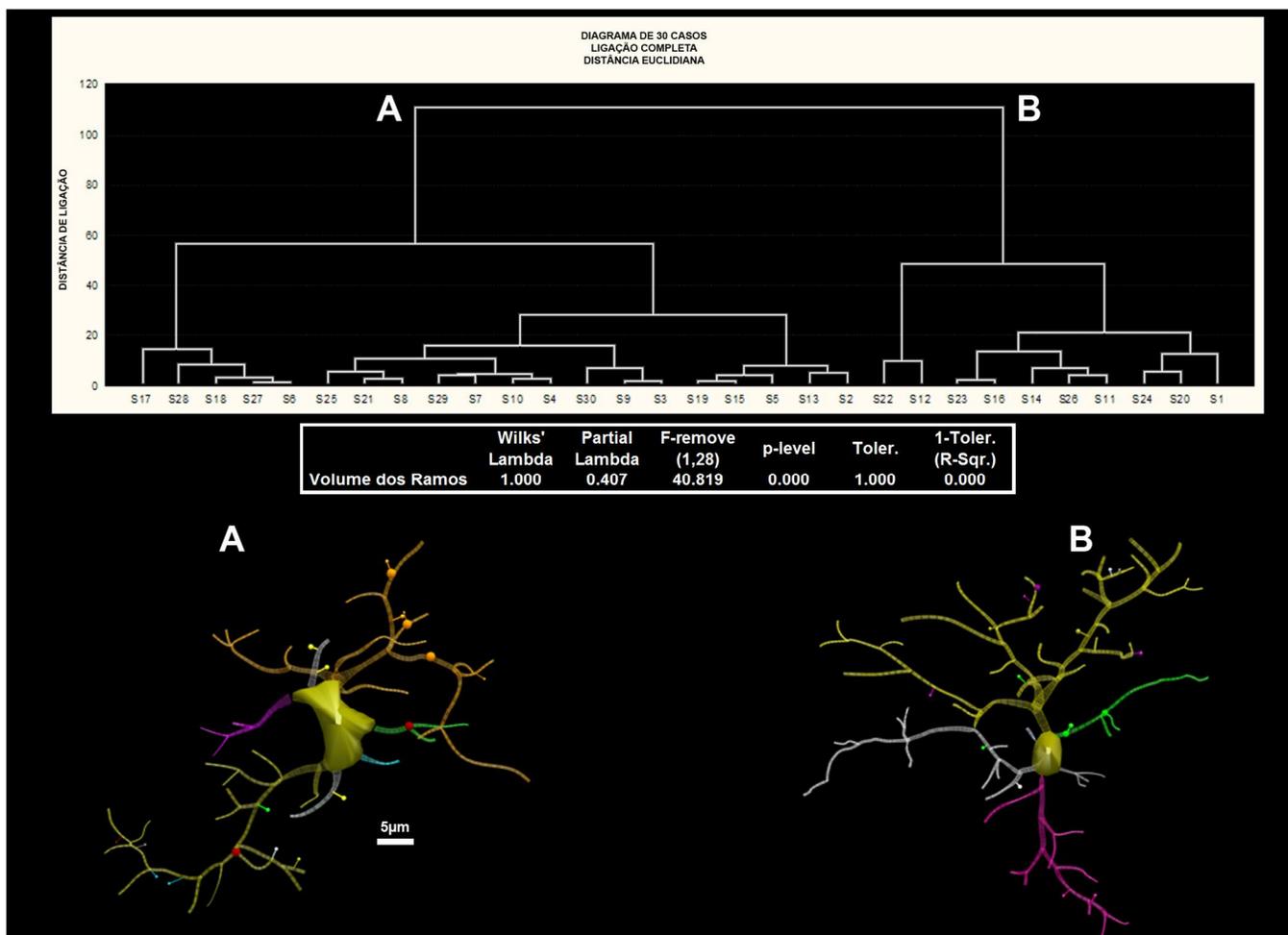


Figura 23. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia do terço externo da camada molecular do giro denteado do sujeito S empregando as variáveis morfométricas com correlação significativa com o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial (volume de ramos). A micróglia que mais se aproxima da micróglia média de cada conglomerado para o terço externo da camada molecular do giro denteado do sujeito S é representada na figura como uma reconstrução tridimensional alinhada com o seu respectivo agrupamento.

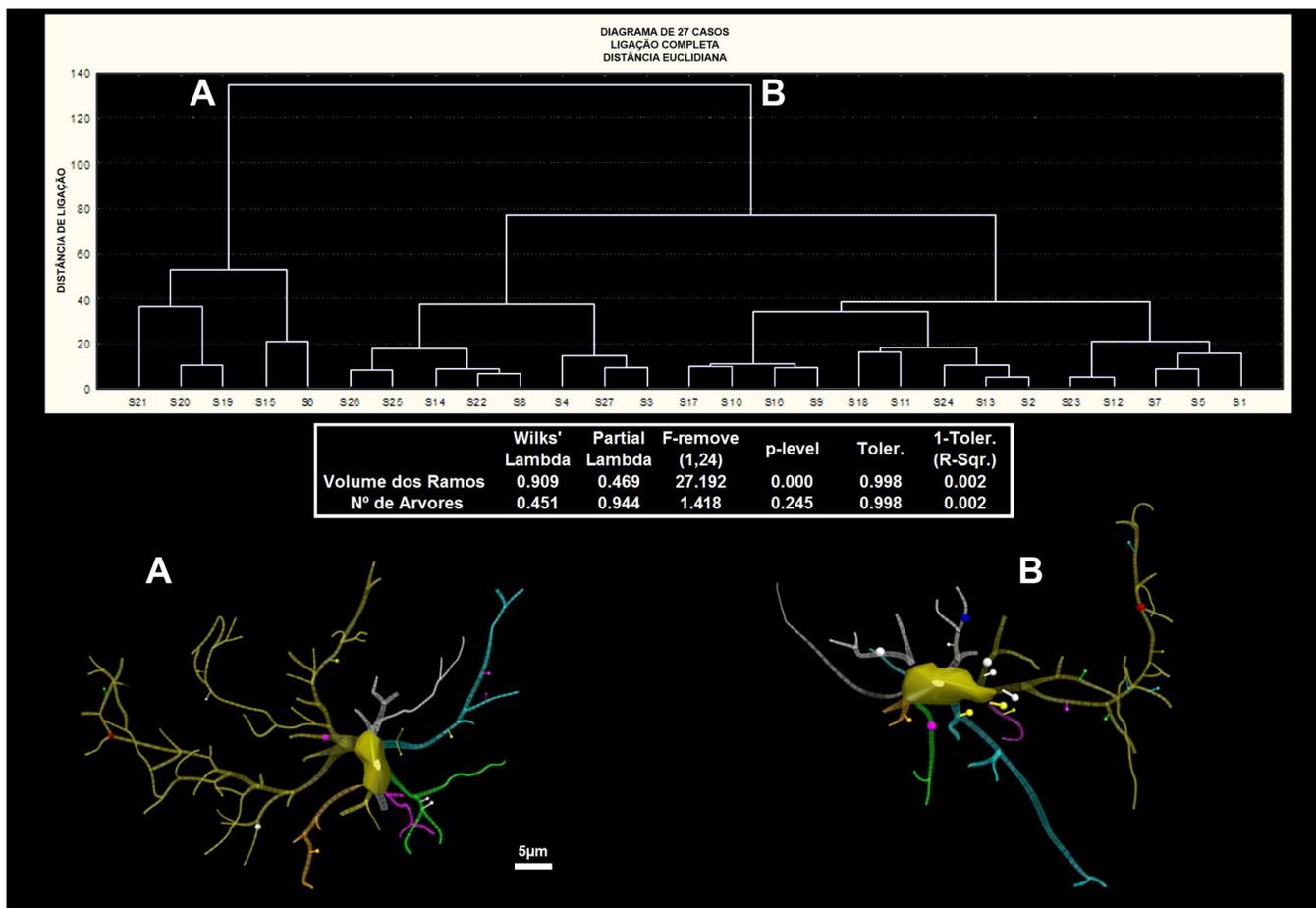


Figura 24. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia do terço médio da camada molecular do giro denteado do sujeito S empregando as variáveis morfométricas com correlação significativa com o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial (número de árvores e volume de ramos). A micróglia que mais se aproxima da micróglia média de cada conglomerado para o terço médio da camada molecular do giro denteado do sujeito S é representada na figura como uma reconstrução tridimensional alinhada com o seu respectivo agrupamento.

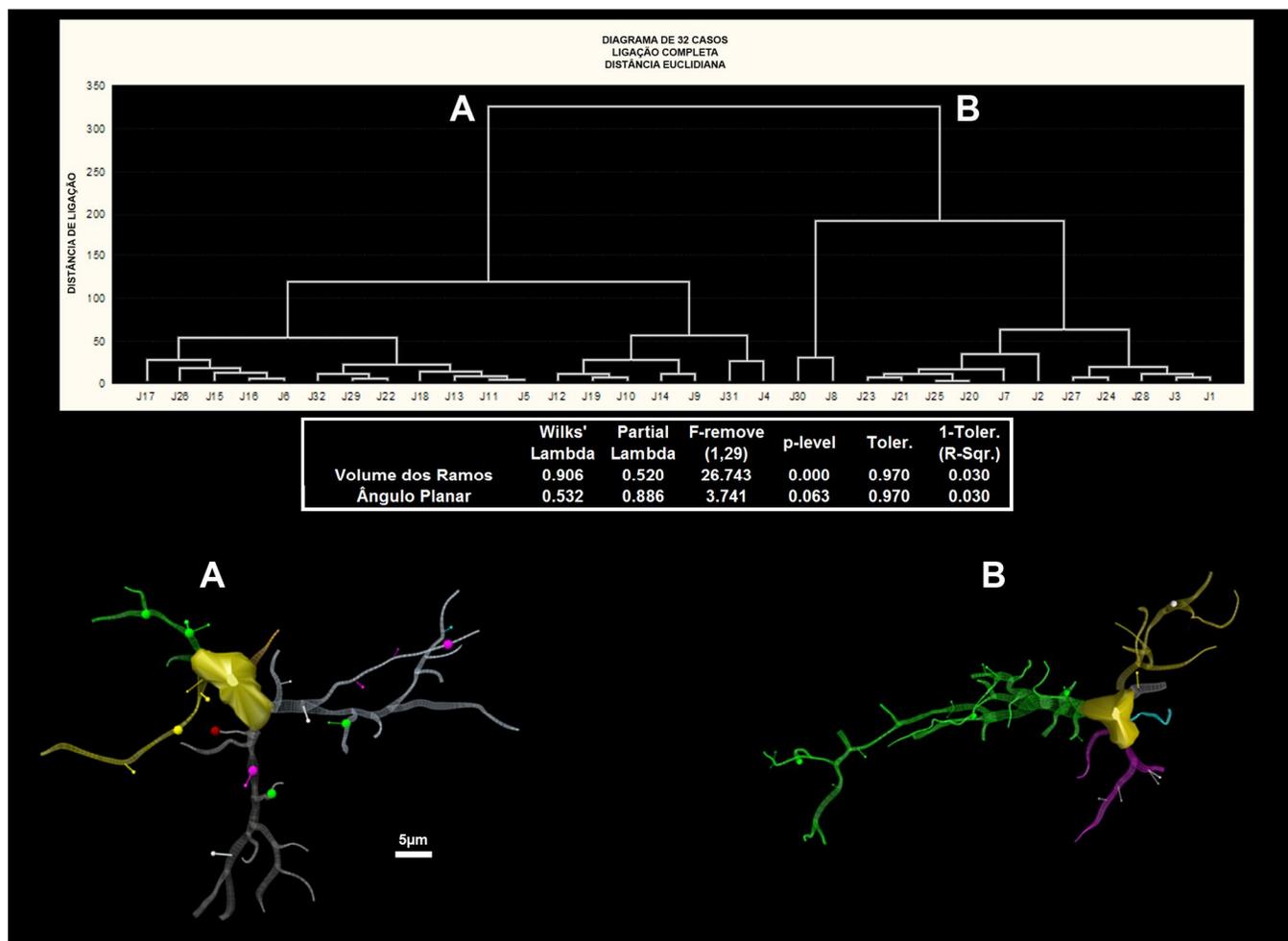


Figura 25. Representação gráfica da análise de conglomerados das micróglia do terço externo da camada molecular do giro denteado do sujeito J empregando as variáveis morfométricas com correlação significativa com o desempenho no teste de aprendizagem e memória espacial (ângulo planar e volume de ramos). A micróglia que mais se aproxima da micróglia média de cada conglomerado para o terço externo da camada molecular do giro denteado do sujeito J é representada na figura como uma reconstrução tridimensional alinhada com o seu respectivo agrupamento.

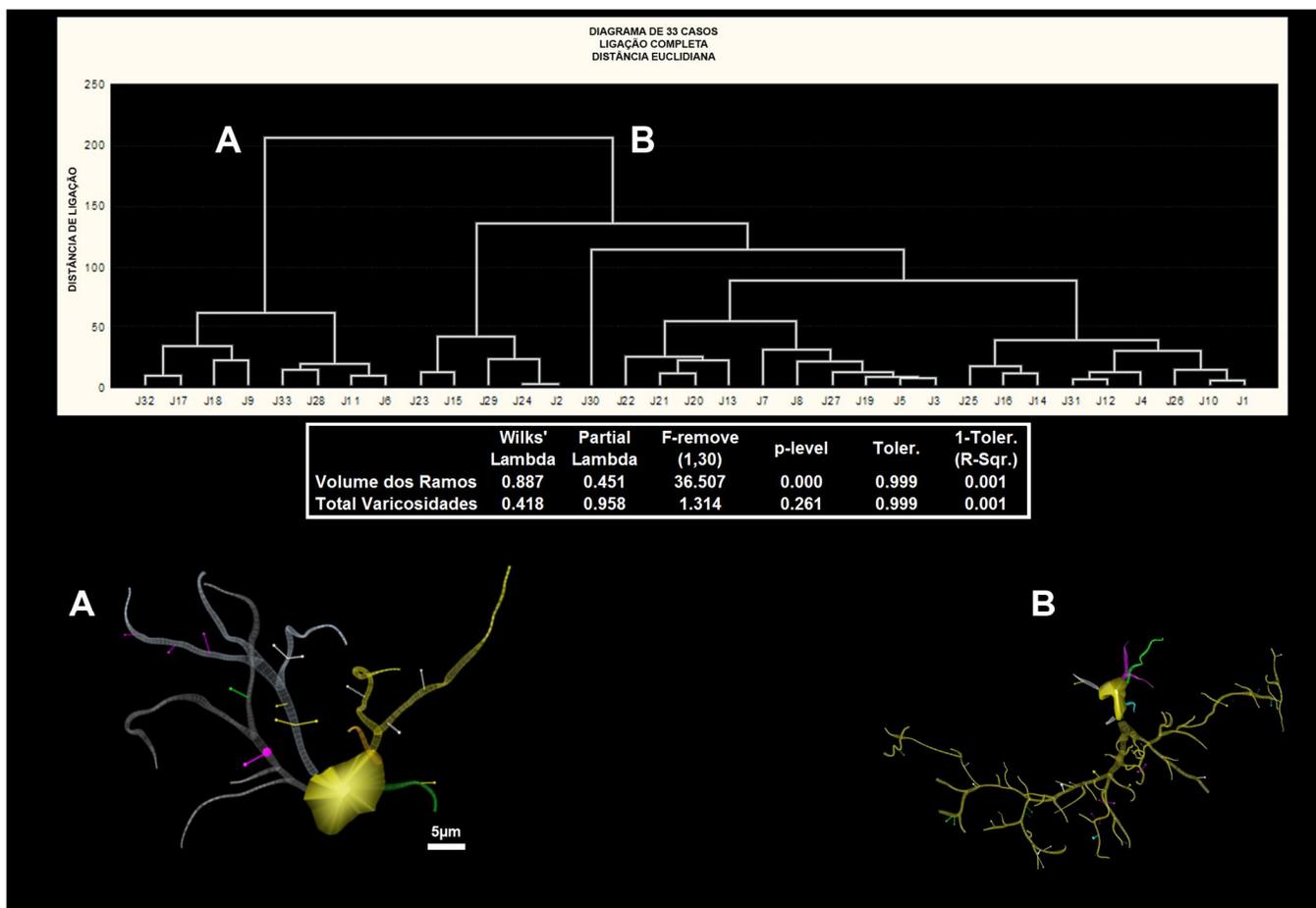
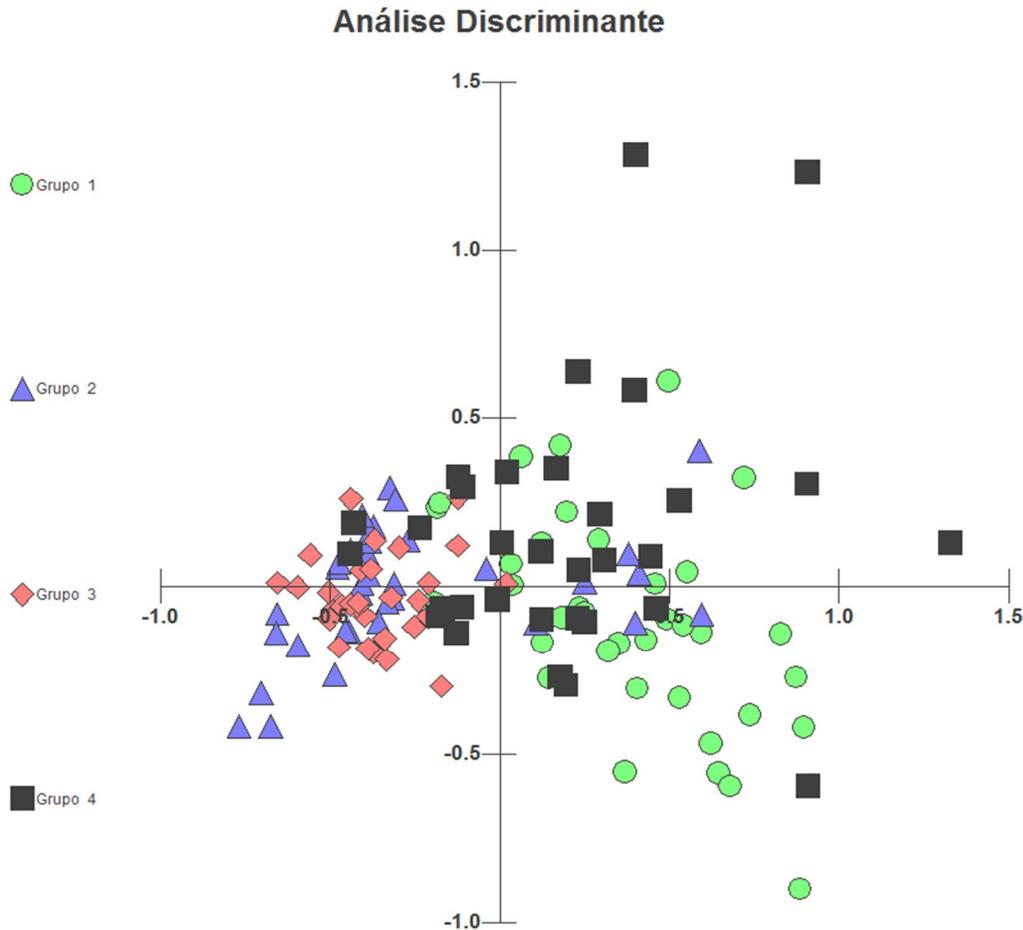


Figura 26. Representação gráfica da análise conglomerados das micróglia do terço médio da camada molecular do giro denteado do sujeito J empregando as variáveis morfológicas com correlação significativa com o desempenho no teste de aprendizado e memória espacial (número de árvores e volume de ramos). A micróglia que mais se aproxima da micróglia média de cada conglomerado para o terço médio da camada molecular do giro denteado do sujeito J é representada na figura como uma reconstrução tridimensional alinhada com o seu respectivo agrupamento.

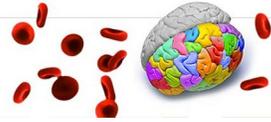


As figuras 27 e 28 ilustram em representações gráficas a distinção entre os grupos de micróglia do terço externo e médio da camada molecular do giro denteado e as respectivas variáveis que os distinguem reveladas pela Análise discriminante.

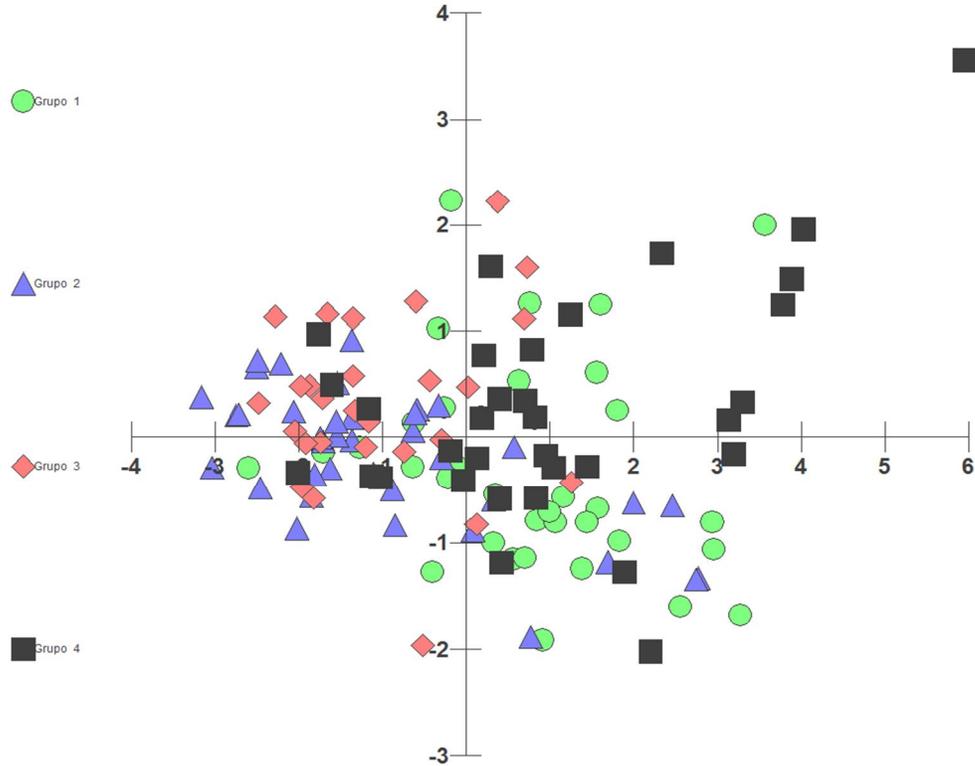


	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (3,127)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
Diâmetro da Base ( $\mu\text{m}$ )	0.541420	0.835699	8.322888	0.000043	0.646878	0.353122
Volume dos Ramos ( $\mu\text{m}^3$ )	0.523945	0.863571	6.687909	0.000315	0.646051	0.353950
Ângulo Planar	0.487706	0.927738	3.297345	0.022672	0.994877	0.005123

Figura 27. Análise discriminante para ilustrar em representação gráfica a distinção entre os grupos de micróglia do terço externo da camada molecular do giro denteado para os 4 animais. Os grupos 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente às micróglia do animal F, M, S e J. Note a maior concentração dos pontos correspondentes aos animais S (laranja) e M (azul) à esquerda e a maior dispersão a direita dos pontos correspondentes aos animais F (verde) e J (cinza) respectivamente. As variáveis discriminantes e seus níveis de significância respectivos estão indicadas na tabela.

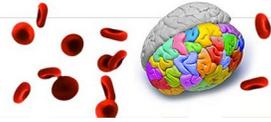


### Análise Discriminante



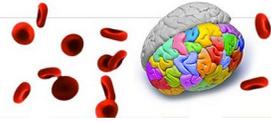
	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (3,126)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
Volume dos Ramos ( $\mu\text{m}^3$ )	0.721042	0.908979	4.205674	0.007141	0.884401	0.115599
Feret Max( $\mu\text{m}$ )	0.736220	0.890240	5.178303	0.002085	0.126195	0.873805
Total Varicosidades	0.684834	0.957038	1.885407	0.135401	0.919250	0.080750
Area( $\mu\text{m}^2$ )	0.703437	0.931728	3.077554	0.030030	0.083282	0.916718
Feret Min( $\mu\text{m}$ )	0.684782	0.957111	1.882082	0.135962	0.320051	0.679949

Figura 28. Análise discriminante para ilustrar em representação gráfica a distinção entre os grupos de micróglia do terço médio da camada molecular do giro denteado para os 4 animais. Os grupos 1, 2, 3 e 4 correspondem respectivamente às micróglia do animal F, M, S e J. Note a maior concentração dos pontos correspondentes aos animais S (laranja) e M (azul) à esquerda e a maior dispersão a direita dos pontos correspondentes aos animais F (verde) e J (cinza) respectivamente. As variáveis discriminantes e seus níveis de significância respectivos estão indicadas na tabela.



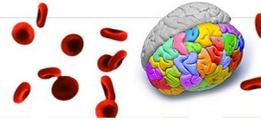
## 5 - DISCUSSÃO

No presente trabalho estudamos o desempenho comportamental em teste de memória espacial da bateria Cambridge de testes neuropsicológicos (CANTAB) em 4 exemplares da espécie *Cebus apella*, um macaco do Novo Mundo com notáveis habilidades cognitivas. Embora todos os indivíduos tenham sido capazes de aprender e lembrar a localização espacial do objeto, encontramos resultados bastantes diferentes na taxa de aprendizado utilizando o teste de aprendizado pareado. Dois dos exemplares (sujeitos M e S) demonstraram taxas de aprendizado adequadas após 3 ou 4 sessões de treino enquanto os outros dois só alcançaram níveis razoáveis de taxas de aprendizado na 13<sup>a</sup> (sujeito J) e 19<sup>a</sup> (sujeito F) sessões. Após os ensaios comportamentais os animais foram sacrificados e a micróglia dos terços externo e médio da camada molecular do giro dentado e do lacunosum molecular de CA1 do hipocampo foi reconstruída por microscopia tridimensional. Após análise morfométrica detalhada foi demonstrada forte correlação entre a morfologia da micróglia da camada molecular do giro dentado e os desempenhos comportamentais. Apesar de terem sido detectadas diferenças significativas na morfologia da micróglia do lacunosum molecular de CA1 dos diferentes sujeitos, nenhuma correlação foi encontrada entre sua morfologia e o desempenho no teste PAL. Esses achados são coerentes com o fato de que a aquisição e consolidação de certas tarefas comportamentais envolvendo aprendizado e memória espacial exigem remodelamento sináptico hipocampal regional específico sendo o giro dentado essencial para essa tarefa (O'malley *et al.*, 2000).



## 5.1 - Memória Espacial no *Cebus apella*

Obter evidência convincente da utilização de memória espacial para busca de fontes de comida em animais selvagens é difícil porque o observador raramente sabe acerca das fontes de comida tanto quanto sabem os animais e a habilidade de detectar novas fontes não é em geral medida por limitações similares (Janson, 1998). A utilização de testes em cativeiro entretanto responde prontamente a essas limitações deixando inequívocas evidências de habilidades compatíveis com essas tarefas, particularmente quando a exploração dos objetos é feita em pequena escala espacial (Tavares e Tomaz, 2002; Resende, Tavares e Tomaz, 2003; Potì e Saporiti, 2010). Até o presente não é do nosso conhecimento que a espécie *Cebus apella* tenha sido testada em suas habilidades mnemônicas espaciais empregando o aprendizado associado pareado da bateria CANTAB, um teste largamente empregado para avaliação de declínios cognitivos durante o envelhecimento normal ou patológico, tanto no macaco Rhesus quanto em humanos (Smith *et al.*, 2013). Assim os resultados do presente trabalho revelam pela primeira vez nessa espécie ensaios comportamentais bem sucedidos em teste de aprendizado e memória com essa bateria, permitindo a comparação de seu desempenho com macacos do Velho Mundo e humanos (Nagahara, Bernot e Tuszyński, 2010). Eles confirmam resultados anteriores de que o *Cebus apella* reúne todo o substrato comportamental necessário à utilização de memória visuoespacial como instrumento de busca de objetos de interesse tanto em pequena escala (tela sensível de um computador), quanto em grande escala (durante o forrageamento) (Garber e Paciulli, 1997; Janson, 1998; Potì e Saporiti, 2010; Pan *et al.*, 2011) e que seu deslocamento espacial não se faz ao acaso (Boyer, Crofoot e Walsh, 2012). Esses achados comportamentais respeitadas pequenas variações nas proporções volumétricas regionais do hipocampo, são coerentes com o fato de que a organização da formação hipocampal do *Cebus apella* (Guerreiro-Diniz, C *et al.*, 2010) o substrato morfofuncional essencial à



formação de memórias é similar a dos macacos do Velho Mundo (Amaral e Lavenex, 2007) e humanos (Clark e Squire, 2013).

## **5.2 - A Contribuição do Giro Denteado para Melhorar a Resolução da Memória Espacial (Separação de Padrões Ambíguos)**

Para entender o papel do giro denteado nesse processo de melhorar a resolução da memória espacial é útil retomar o padrão de projeções da formação hipocampal e sua relação com as projeções uni e polimodais do neocórtex. A Figura 29 sintetiza esses circuitos. Como indicado no diagrama acima o córtex entorrinal é a principal fonte de informação que a formação hipocampal usa para executar suas funções. Tendo em vista que o giro denteado é o alvo principal dos terminais dessa projeção é razoável considerar o giro denteado como o primeiro passo no processamento que culmina com a formação de memória episódica (Amaral, Scharfman e Lavenex, 2007).

De particular interesse para o presente trabalho é o fato recentemente descoberto de que os novos neurônios gerados na camada subgranular do giro denteado recebem através das células alvos da via perfurante localizadas na camada molecular do giro denteado (“MOPP cells”) contatos sinápticos inibitórios e que a estimulação da via perfurante resulta na ativação daquelas, que por sua vez imprimem forte inibição sobre os neurônios granulares (Li *et al.*, 2013). Além disso, tanto por conta das propriedades intrínsecas das células granulares quanto por circuitos GABA-érgicos locais reforçados por sinapses químicas e junções em fenda de células neurglialformes GABA-érgicas da camada molecular (Armstrong *et al.*, 2011), as aferências fortemente excitatórias provenientes do córtex entorrinal disparam apenas umas poucas células granulares que enviam seus impulsos em direção a CA3. Esse disparo esparso das células granulares tal como se verá adiante é importante para a separação de padrões (Leutgeb e Moser, 2007) e codificação de informação espacial (Moser, Kropff e Moser, 2008).

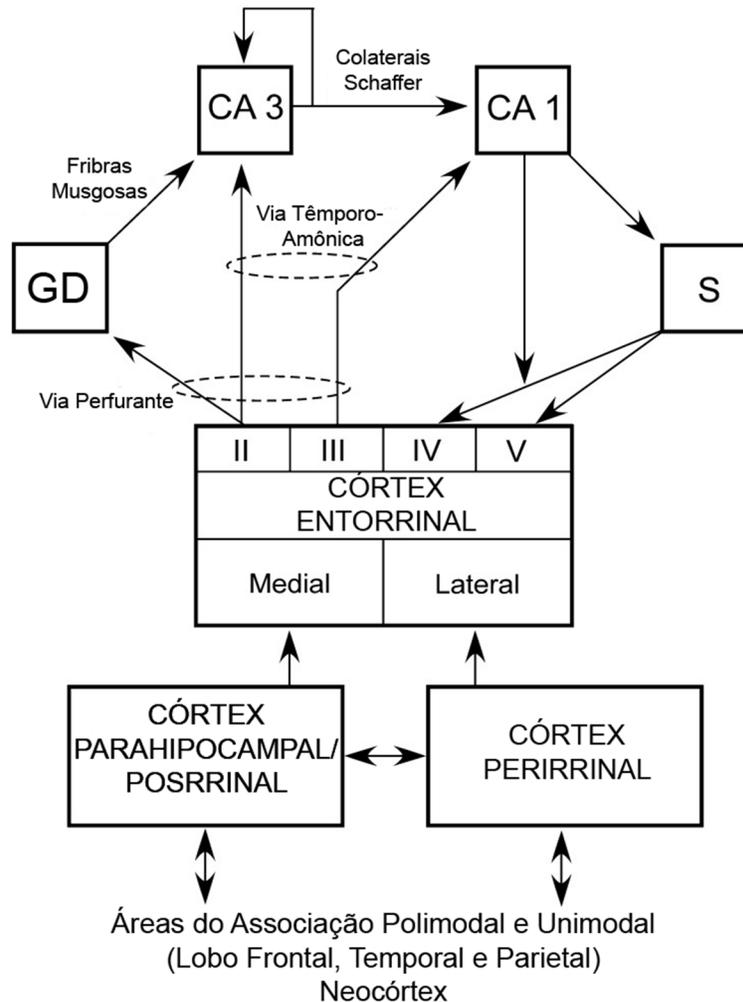
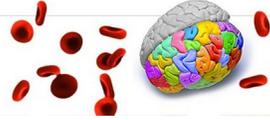


Figura 29. Representação esquemática das conexões do sistema de memória de reconhecimento da localização espacial e da forma dos objetos envolvendo o lobo temporal medial. O hipocampo aqui incluindo o giro denteado (GD), CA3, CA1 e o subiculum (S) está em situação anatômica eleita para receber de modo organizado informação previamente processada de diferentes áreas neocorticais que convergem para três áreas corticais temporais denominadas entorrinal, perirrinal e parahipocampal (no rato pósrrinal). De uma forma simplificada o diagrama ilustra a entrada no hipocampo a partir das camadas II e III do córtex entorrinal. Uma vez no hipocampo a informação flui de maneira unidirecional através do circuito trisináptico: giro denteado, CA3 e CA1 (via perfurante) ou diretamente para CA1 a partir da camada III do córtex entorrinal (via têmporo-amônica). De CA1 diretamente, ou através do subiculum o circuito se fecha de volta ao córtex entorrinal fazendo sinapses com as camadas profundas. Figura adaptada de Clark e Squire, 2013 (Clark e Squire, 2013).



Para entender o racional subjacente ao papel do giro denteado na separação de padrões ambíguos e melhoria da resolução da memória espacial, é útil rever brevemente esse conceito ilustrado na Figura 30. Para compreender esse papel e sua contribuição para o reconhecimento da localização espacial de objetos de forma contextual dois aspectos dos circuitos relacionados precisam ser considerados: 1) o número muito maior de neurônios no giro denteado em comparação com CA3 e com o córtex entorrinal, onde cada célula granular faz sinapse com não mais do que uma dúzia de neurônios piramidais em CA3; 2) sinapses musgosas maiores localizadas na vizinhança dos somas das células piramidais de CA3 e com poder de disparo de seus alvos. Além disso é necessário lembrar do ponto de vista funcional que a população de células granulares permanece sob forte inibição tônica induzida por receptores GABA-érgicos ativados continuamente pelo GABA extrasináptico (Arima-Yoshida, Watabe e Manabe, 2011), o que permite apenas excitação global esparsa e que essa inibição é essencial para codificação de informação necessária à separação de padrões espaciais ambíguos.

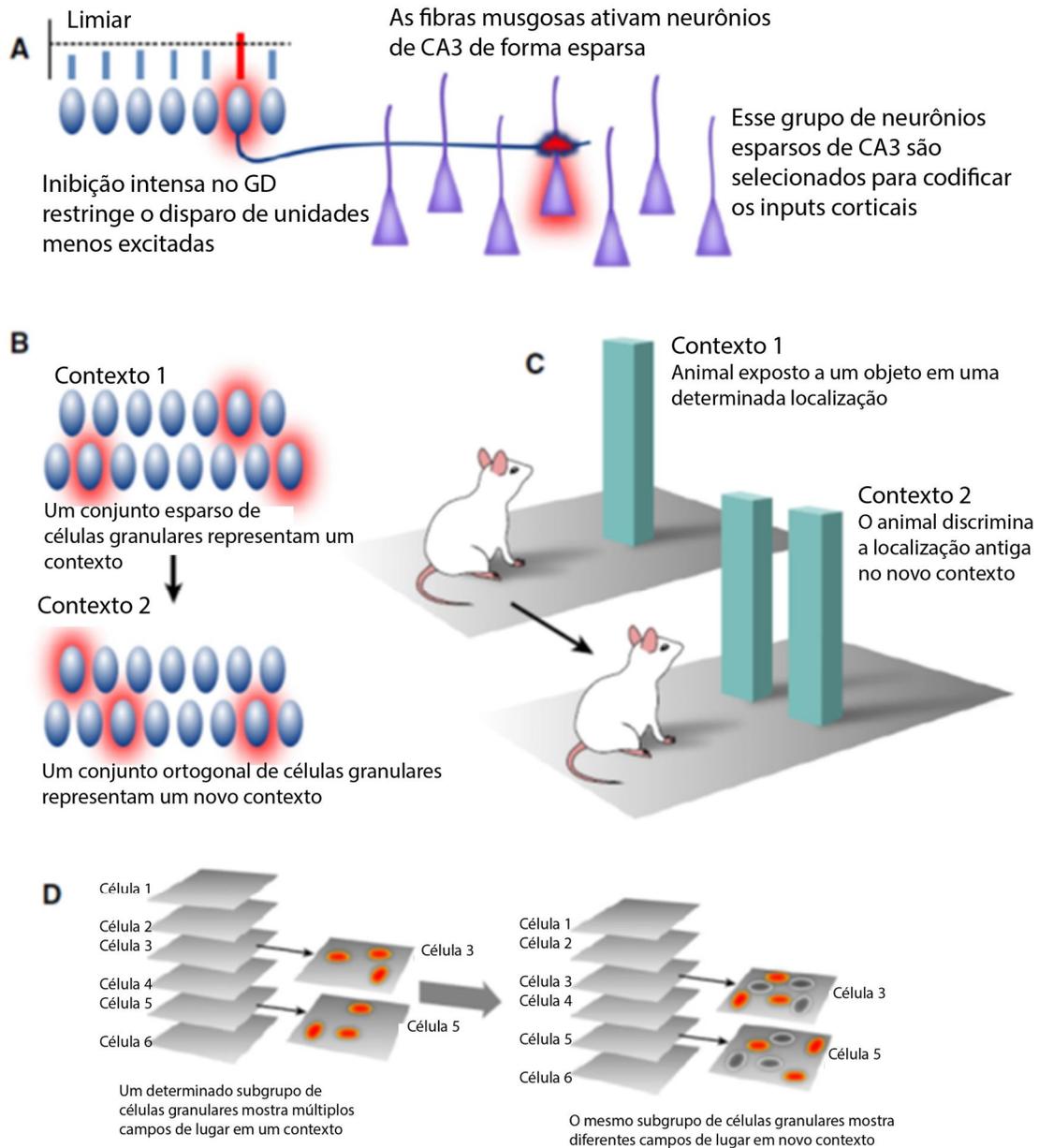
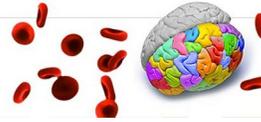


Figura 30. Sumário dos conceitos relacionados à hipótese da separação de padrões. A – Contribuição do giro denteado para a separação de padrões (codificação esparsa, inibição intensa e sinapse esparsa das fibras musgosas). B – Conceito computacional da separação de padrões. C – Exemplo comportamental da separação de padrões. D – Exemplo eletrofisiológico da separação de padrões. Figura adaptada a partir de Aimone e colaboradores (Aimone, Deng e Gage, 2011).



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

### **5.3 - Plasticidade Sináptica e Micróglia na Camada Molecular do Giro Denteado: Implicações funcionais de morfologias especializadas**

A formação de novas sinapses (plasticidade estrutural) na camada molecular do giro denteado (Scully *et al.*, 2012) e a micróglia dessa camada em particular (Rodríguez *et al.*, 2013) parecem estar relacionadas. De fato a micróglia está envolvida no remodelamento sináptico associado ao aprendizado e pelo menos parte desse remodelamento decorre por conta da neurogênese na camada subgranular onde os precursores neuronais migram e se diferenciam em neurônios para serem integrados aos circuitos pré-existentes. Esse processo migratório é dependente da síntese de quimiocinas específicas e uma das mais importantes é a fractalina (CX3CL1) que é constitutivamente produzida pelos



neurônios saudáveis e que mantem a ativação da micróglia inibida através da ativação do receptor microglial CX3CR1. O receptor CX3CR1 é expresso exclusivamente pela micróglia no SNC e sua expressão na micróglia da camada molecular do giro denteado parece essencial para a migração dos novos neurônios e sua inserção nos circuitos pré-existentes (Maggi *et al.*, 2011; Sánchez-Alcañiz *et al.*, 2011). A ativação desse receptor tal como demonstrado a partir de estudos comparativos de camundongos knockouts e selvagens é igualmente essencial para o aprendizado e memória espacial hipocampo-dependente, assim como para o aprendizado motor e isso parece estar relacionado a sua contribuição para a plasticidade sináptica (Rogers *et al.*, 2011).

Por outro lado, a micróglia associada à resposta inflamatória também contribui para a regulação das conexões sinápticas funcionais de novos neurônios no cérebro adulto alterando a plasticidade sináptica. Nessa situação o receptor CX3CR1 diminui sua expressão e o perfil microglial muda para o pró-inflamatório e o ambiente inflamatório por sua vez aumenta o input sináptico inibitório sobre os novos neurônios granulares em comparação com os neurônios maduros (Jakubs *et al.*, 2008). Não se sabe entretanto se as mudanças na plasticidade sináptica associadas ao ambiente inflamatório, contribuem para mitigar ou piorar as disfunções cognitivas associadas ao ambiente inflamatório (Jakubs *et al.*, 2008).

No presente trabalho encontramos diferenças marcantes na morfologia da micróglia do hipocampo e do giro denteado encontrando forte correlação entre os parâmetros morfométricos e o desempenho no teste do PAL para aquelas da camada molecular do giro denteado. Esses achados parecem coerentes com evidências de que a morfologia da micróglia pode ser utilizada para caracterizar mudanças em seu estado funcional (Karperien, Ahammer e Jelinek, 2013) e que isso está associado à uma combinação de influências extracelulares que incluem atividade neuronal (Tremblay, Lowery e Majewska, 2010; Tremblay *et al.*, 2011; Wake, Hiroaki, Moorhouse, Andrew J e Nabekura, Junichi, 2011; Wake *et al.*, 2013), sinalização por quimiocinas (Liang *et al.*, 2009) e sinalização purinérgica (Davalos *et al.*, 2005; Dibaj *et al.*, 2010; Fontainhas *et al.*, 2011; Ohsawa e Kohsaka, 2011). Dentre essas influências a atividade neuronal emerge como uma

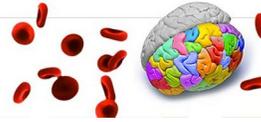


excelente candidata a reguladora da fisiologia microglial dado que entre as funções microgliais estão a manutenção das sinapses e a liberação de fatores tróficos (Wong, Wang e Li, 2011). Essa regulação portanto estaria sincronizada com os níveis da atividade neural onde um aumento da neurotransmissão ionotrópica glutamatérgica induziria alterações morfológicas distintas daquelas associadas ao aumento da atividade GABA-érgica, através da liberação extracelular de ATP (Fontainhas *et al.*, 2011; Wong, Wang e Li, 2011). Esse controle da morfologia microglial por diferentes formas de neurotransmissão é exercido rapidamente (em minutos) e parece depender de comunicação recíproca entre micróglia e neurônio contribuindo para manutenção da homeostase do SNC.

Uma outra questão relevante é o de que os terços externo e médio da camada molecular do giro denteado recebem seus inputs da via perfurante lateral e medial respectivamente e essa vias convergem sobre os dendritos das células granulares do giro denteado onde suas sinapses parecem competir e cooperar em função das distâncias diferentes que as separam do soma das células granulares (Hayashi e Nonaka, 2011).

No presente trabalho os achados de correlação entre a morfologia das micróglia e o desempenho cognitivo foram mais significativos no terço médio da camada molecular do giro denteado onde presumivelmente a atividade da via perfurante seria mais intensa em função da natureza da estimulação visuoespacial empregada no teste de aprendizado associado pareado. De fato os animais com melhor desempenho nesse teste revelaram em média micróglia com volumes menores, ramos mais delgados e menos tortuosos, maior densidade de segmentos assim como diâmetros, perímetros e áreas do soma menores do que os dos animais com pior desempenho.

Ainda que tais evidências sejam indiretas, pelo menos dois tipos morfológicos foram distinguidos pela análise de conglomerados em todos os animais, tendo sido encontrado distribuição relativa de cada qual nos dois grupos de cada sujeito bastante diferente. Dentre todas as variáveis empregadas para a análise discriminante, o volume dos ramos foi partilhado por todos os animais como sendo a variável de maior significância para a distinção dos grupos



morfológicos e os animais de melhor desempenho apresentaram um predomínio de micróglia com menor volume de ramos em comparação com os de pior desempenho.

É necessário entretanto em etapa posterior investigar empregando método estereológico com dupla marcação imunohistoquímica para IBA-1 e para fatores neurotróficos microgliais como por exemplo o IGF-1 (do inglês Insulin-like growth factor 1) qual a proporção relativa de micróglia duplamente imunomarcadas para IGF-1 e IBA-1 em relação a população global de micróglia nessas camadas. Essa dupla imunomarcação distinguiria a micróglia associada à neurogênese (Choi *et al.*, 2008; Kohman *et al.*, 2012) em relação ao número total de micróglia em cada grupo permitindo validar quantitativamente o presente ensaio.

Em sequência seria igualmente relevante investigar a taxa de neurogênese nos diferentes animais empregando duplacortina para estabelecer possível correlação entre neurogênese, morfologia microglial e o desempenho na tarefa de aprendizado e memória visuo-espacial. De fato, em artigo recente, Sahay e colaboradores demonstraram inequivocamente que camundongos com neurogênese aumentada tem maior capacidade de distinguir padrões espaciais ambíguos e que o aumento da neurogênese em si mesmo seria suficiente para esse ganho funcional (Sahay *et al.*, 2011).

#### **5.4 - Limitações Técnicas**

No presente trabalho a análise multivariada empregando os parâmetros morfométricos da micróglia revelou pelo menos dois grupos de micróglia morfologicamente distintos na camada molecular do giro denteado em todos os animais e por conta disso nós sugerimos que a contribuição funcional de cada um desses grupos morfológicos de micróglia pode ser diferente e que possíveis desequilíbrios em sua distribuição e frequência pode ser um indicador de desequilíbrios funcionais com repercussões cognitivas. Como não foram realizadas estimativas estereológicas para definir o número total de cada um deles

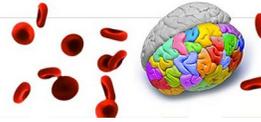


é difícil estabelecer correlação direta com seus números restando por ora distingui-los morfologicamente. Entretanto, como os critérios para escolha da micróglia reconstruída foram homogêneos, o número de elementos selecionados para reconstrução bastante amplo (580 no total, 188 no lacunosum molecular de CA1 e 147 e 145 nos terços externo e médio da camada molecular do giro denteado) sendo a seleção nas camadas feita ao acaso, é razoável supor que não há a priori, viés amostral induzido pela escolha dos objetos de interesse entre os sujeitos.

É igualmente importante chamar atenção para as limitações técnicas associadas ao processamento do tecido utilizado para imunomarcação seletiva para micróglia em sua reconstrução tridimensional. Impostas pela fixação e pelos fatores mecânicos associados ao seccionamento do encéfalo dos animais, assim como pelo subsequente processo de desidratação, o tecido sofre retração não uniforme no eixo z em comparação aos eixos x-y prontamente evidente nas secções montadas em lâmina (Hosseini-Sharifabad e Nyengaard, 2007).

Assim as estimativas de possíveis modificações nos eixos x/y após o processo de desidratação não podem ser extrapoladas linearmente para o eixo z. Essa impossibilidade difícil de ser circunscrita por sua influência multifatorial, impõe limitações que precisam ser consideradas quando analisando o conjunto dos dados aqui apresentados. Entretanto é preciso realçar que uma indicação segura da ocorrência de retração severa do eixo z é a ondulação frequente dos ramos retraídos, normalmente mais evidentes na superfície das secções, o que indica que os processos individuais não retraem de forma homogênea como um todo, mas refletem variações de retração regionais da fatia que tendem a ser de maior amplitude na superfície, decrescendo em profundidade no eixo z. Esse padrão, entretanto, não foi observado nas micróglias eleitas para reconstrução neste estudo que normalmente foram selecionadas da região média do eixo z, onde o impacto dessas alterações são menores.

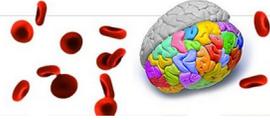
Ensaio sistemáticos anteriores mostraram que a taxa de retração nos eixos x-y é desprezível e que é em média 75% menor do que a do eixo z (Carlo, C. N. e Stevens, C. F., 2011). Para minimizar esse efeito imposto por tal retração



assimétrica aplicou-se para cada micróglia reconstruída fator de correção linear para o eixo z, na mesma proporção, e nenhum fator de correção para os eixos x-y.

No que concerne às correlações entre o comportamento e as variáveis morfométricas da micróglia encontradas no presente trabalho, é bom ter em conta que ainda que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) entre os testes comportamentais e algumas das variáveis morfométricas da micróglia do presente trabalho seja elevado, ele se refere a uma relação numérica entre as variáveis testadas, não implicando necessariamente em uma relação de causa-efeito. No caso de correlações não lineares a interpretação dos resultados de  $R^2$  deve ser feita com cautela por conta da dificuldade com o cumprimento de alguns pressupostos subjacentes àquele coeficiente (Ma *et al.*, 2011). Para fins práticos ele significa a porcentagem de variação comum entre as variáveis escolhidas para o teste de correlação. Por outro lado o nível de significância  $p < 0,05$  implica que a probabilidade da correlação não existir entre as variáveis morfométricas da micróglia e o desempenho nos testes comportamentais é quase nula validando os modelos sugeridos.

Finalmente é preciso realçar o fato de que não é do nosso conhecimento até o presente um único trabalho sobre possível correlação entre morfologia da micróglia e desempenho cognitivo, o que torna este trabalho original e pioneiro nesse domínio, abrindo a possibilidade de inaugurar novas linhas de investigação em busca dos mecanismos subjacentes.

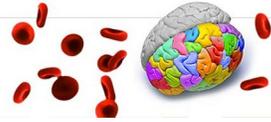


## 6 - CONCLUSÕES

A partir de reconstruções tridimensionais da micróglia dos terços externo e médio da camada molecular do giro dentado e do lacunosum molecular de CA1 do *Cebus apella* e utilizando procedimentos de estatística multivariada identificou-se a ocorrência de pelo menos dois grandes grupos morfológicos microgliais.

Aplicando-se o teste de aprendizado pareado da bateria CANTAB aos mesmos animais empregados nas reconstruções tridimensionais mediu-se a performance em aprendizado e memória espacial buscando-se correlações com os parâmetros morfométricos da micróglia com a taxa de aprendizado de cada qual tendo sido encontradas significativas correlações, lineares e não lineares com as micróglia do giro dentado mas não com as de CA1.

Esses resultados ainda que de forma indireta abrem a possibilidade de estender à micróglia uma possível contribuição para o aprendizado e memória espacial, repertório funcional até então restrito aos astrócitos.



## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACSÁDY, L. et al. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. **The Journal of neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 3386-3403, 1998. ISSN 0270-6474.

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

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

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

AJMO, J. M. et al. Discordant localization of WFA reactivity and brevican/ADAMTS-derived fragment in rodent brain. **BMC Neurosci**, v. 9, p. 14, 2008. ISSN 1471-2202 (Electronic) 1471-2202 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18221525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18221525) >.

ALLEN, K. et al. Hippocampal place cells can encode multiple trial-dependent features through rate remapping. **J Neurosci**, v. 32, n. 42, p. 14752-66, Oct 2012. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23077060> >.

AMARAL, D. G.; LAVENEX, P. Hippocampal Neuroanatomy. In: ANDERSEN, P.; MORRIS, R. G., et al (Ed.). **The Hippocampus Book**. New York: Oxford University Press, 2007. cap. 03, p.37-114. ISBN 13:978-019-510027-3.

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



AMARAL, P. J. et al. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. **BMC Evol Biol**, v. 8, p. 169, 2008. ISSN 1471-2148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18534011> >.

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

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

BACHEVALIER, J.; NEMANIC, S. Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex. **Hippocampus**, v. 18, n. 1, p. 64-80, 2008. ISSN 1098-1063 (Electronic) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17924520](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17924520) >.

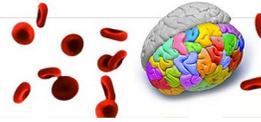
BARBOSA, F. F. et al. Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. **Front Behav Neurosci**, v. 7, p. 112, 2013. ISSN 1662-5153. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23986669> >.

BEATS, B. C.; SAHAKIAN, B. J.; LEVY, R. Cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction in the elderly depressed. **Psychol Med**, v. 26, n. 3, p. 591-603, May 1996. ISSN 0033-2917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8733217> >.

BI, X. X. et al. The complete mitochondrial genome sequence of the black-capped capuchin (*Cebus apella*). **Genet Mol Biol**, v. 35, n. 2, p. 545-52, Apr 2012. ISSN 1678-4685. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22888306> >.

BITSIKA, V.; SHARPLEY, C. F.; ORAPELENG, S. An exploratory analysis of the use of cognitive, adaptive and behavioural indices for cluster analysis of ASD subgroups. **J Intellect Disabil Res**, v. 52, n. 11, p. 973-85, Nov 2008. ISSN 1365-2788 (Electronic). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19017167](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19017167) >.

BITZER-QUINTERO, O. K.; GONZÁLEZ-BURGOS, I. Immune system in the brain: a modulatory role on dendritic spine morphophysiology? **Neural Plast**, v. 2012, p.



348642, 2012. ISSN 1687-5443. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22548192> >.

BLANK, T.; PRINZ, M. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. **Glia**, Jun 2012. ISSN 1098-1136. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740320> >.

BOYER, D.; CROFOOT, M. C.; WALSH, P. D. Non-random walks in monkeys and humans. **J R Soc Interface**, v. 9, n. 70, p. 842-7, May 2012. ISSN 1742-5662. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031731> >.

BROGLIO, C. et al. Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: Specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. **Brain Research Bulletin**, v. 66, n. 4-6, p. 277-281, 2005. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6SYT-4G7JVHX-3/2/69bbb1a6b23a6d489b5b3910f1c3d4bd> >.

BRUCKNER, G. et al. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. **J Chem Neuroanat**, v. 26, p. 37-50, 2003.

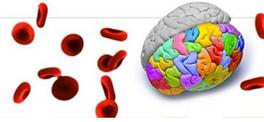
CARLO, C.; STEVENS, C. Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology. **Journal of Comparative Neurology**, v. 519, n. 14, p. 2803-2810, 2011. ISSN 1096-9861.

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

CARR, M. F.; FRANK, L. M. A single microcircuit with multiple functions: state dependent information processing in the hippocampus. **Curr Opin Neurobiol**, v. 22, n. 4, p. 704-8, Aug 2012. ISSN 1873-6882 (Electronic) 0959-4388 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480878> >.

CASADO, F. et al. Mitochondrial divergence between 2 populations of the hooded capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates). **J Hered**, v. 101, n. 3, p. 261-9, 2010 May-Jun 2010. ISSN 1465-7333. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056682> >.

CASARRUBEA, M.; SORBERA, F.; CRESCIMANNO, G. Multivariate data handling in the study of rat behavior: an integrated approach. **Behav Res Methods**, v. 41, n. 3, p. 772-81, Aug 2009. ISSN 1554-351X (Print). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19587191](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19587191) >.



CHOI, S. H. et al. Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. **Neuron**, v. 59, n. 4, p. 568-80, Aug 2008. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760694> >.

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

CLARK, R. E. et al. Rats with lesions of the hippocampus are impaired on the delayed nonmatching-to-sample task. **Hippocampus**, v. 11, n. 2, p. 176-86, 2001. ISSN 1050-9631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11345124> >.

CLEVELAND, A. et al. Transport of tools to food sites in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Anim Cogn**, v. 7, n. 3, p. 193-8, Jul 2004. ISSN 1435-9448 (Print) 1435-9448 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15022055](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15022055) >.

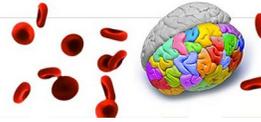
CLOPATH, C. Synaptic consolidation: an approach to long-term learning. **Cogn Neurodyn**, v. 6, n. 3, p. 251-7, Jun 2012. ISSN 1871-4080 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23730356> >.

CORRELL, R. E.; SCOVILLE, W. B. Effects of medial temporal lesions on visual discrimination performance. **J Comp Physiol Psychol**, v. 60, n. 2, p. 175-81, Oct 1965. ISSN 0021-9940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4953533> >.

CROFTS, H. S. et al. Home cage presentation of complex discrimination tasks to marmosets and rhesus monkeys. **Lab Anim**, v. 33, n. 3, p. 207-14, Jul 1999. ISSN 0023-6772 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10780838](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10780838) >.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-8, Jun 2005. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15895084> >.

DE LILLO, C.; SPINOZZI, G.; TRUPPA, V. Pattern recognition in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*): the role of the spatial organisation of stimulus parts. **Behav Brain Res**, v. 181, n. 1, p. 96-109, Jul 19 2007. ISSN 0166-4328 (Print)



0166-4328 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17467068](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17467068)>.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Three dimensional morphometric analyses of axon terminals early changes induced by methylmercury intoxication in the adult cat striate cortex. **Brain Research**, v. 1244, p. 155-163, 2008. ISSN 0006-8993.

DE RESENDE, B. D.; OTTONI, E. B.; FRAGASZY, D. M. Ontogeny of manipulative behavior and nut-cracking in young tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*): a perception-action perspective. **Dev Sci**, v. 11, n. 6, p. 828-40, Nov 2008. ISSN 1467-7687 (Electronic)  
1363-755X (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19046151](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19046151)>.

DE ROVER, M. et al. Hippocampal dysfunction in patients with mild cognitive impairment: a functional neuroimaging study of a visuospatial paired associates learning task. **Neuropsychologia**, v. 49, n. 7, p. 2060-70, Jun 2011. ISSN 1873-3514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21477602> >.

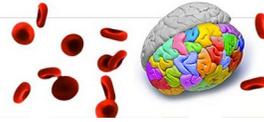
DIBAJ, P. et al. NO mediates microglial response to acute spinal cord injury under ATP control in vivo. **Glia**, v. 58, n. 9, p. 1133-44, Jul 2010. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20468054> >.

DINIZ, D. et al. Aging, environmental enrichment, object recognition and astrocyte plasticity in dentate gyrus. In: GONZALEZ-PEREZ, O. (Ed.). **Astrocytes: Structure, Functions and Role in Disease**. New York: Nova Science Publisher Inc, 2012. p.in press.

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

FEDIGAN, L. M. Vertebrate predation in *Cebus capucinus*: meat eating in a neotropical monkey. **Folia Primatol (Basel)**, v. 54, n. 3-4, p. 196-205, 1990. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2391049](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2391049)>.

FONTAINHAS, A. M. et al. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15973, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21283568>>.



GARBER, P. A.; PACIULLI, L. M. Experimental field study of spatial memory and learning in wild capuchin monkeys (*Cebus capucinus*). **Folia Primatol (Basel)**, v. 68, n. 3-5, p. 236-53, 1997. ISSN 0015-5713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360308> >.

GIBBIE, T. et al. Depression and neurocognitive performance in individuals with HIV/AIDS: 2-year follow-up. **HIV Med**, v. 7, n. 2, p. 112-21, Mar 2006. ISSN 1464-2662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16420256> >.

GIL-MOHAPEL, J. et al. Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75125, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086453> >.

GILBERT, P. E.; KESNER, R. P.; LEE, I. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. **Hippocampus**, v. 11, n. 6, p. 626-36, 2001. ISSN 1050-9631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11811656> >.

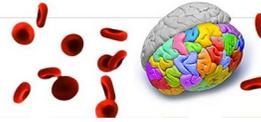
GOLUB, M. S. Cognitive testing (delayed non-match to sample) during oral treatment of female adolescent monkeys with the estrogenic pesticide methoxychlor. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, n. 1, p. 87-92, Jan-Feb 2002. ISSN 0892-0362 (Print) 0892-0362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11836075> >.

GOSHEN, I. et al. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 8-10, p. 1106-15, 2007 Sep-Nov 2007. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17976923> >.

GRUBER, A. J.; MCDONALD, R. J. Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. **Front Behav Neurosci**, v. 6, p. 50, 2012. ISSN 1662-5153 (Electronic) 1662-5153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876225> >.

GUERREIRO-DINIZ, C. **ENSAIOS ESTEREOLÓGICOS E MORFOLOGIA TRIDIMENSIONAL NA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE AVES MIGRATÓRIAS MARINHAS: Análise quantitativa da imunomarcacão seletiva de neurônios e micróglia em *Calidris pusilla* e *Actitis macularia***. 2013. 118 (PhD). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém - Pará - Brasil.

GUERREIRO-DINIZ, C. et al. Hippocampus and Dentate Gyrus of the Cebus Monkey: Architectonic and Stereological Study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 2010.



\_\_\_\_\_. Hippocampus and dentate gyrus of the Cebus monkey: architectonic and stereological study. **J Chem Neuroanat**, v. 40, n. 2, p. 148-59, Oct 2010. ISSN 1873-6300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558278> >.

\_\_\_\_\_. Hippocampus and dentate gyrus of the Cebus monkey: Architectonic and stereological study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 40, n. 2, p. 148-159, OCT 2010 2010. ISSN 0891-0618.

GUZOWSKI, J. F. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. **Hippocampus**, v. 12, n. 1, p. 86-104, 2002. ISSN 1050-9631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11918292> >.

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

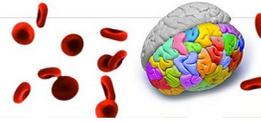
HAN, X. et al. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 3, p. 342-53, Mar 7 2013. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23472873> >.

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

HAYASHI, H.; NONAKA, Y. Cooperation and competition between lateral and medial perforant path synapses in the dentate gyrus. **Neural Netw**, v. 24, n. 3, p. 233-46, Apr 2011. ISSN 1879-2782. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269806> >.

HERRERA, D. G.; ROBERTSON, H. A. Activation of c-fos in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 50, n. 2-3, p. 83-107, Oct 1996. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971979> >.

HILBORN, J. V. et al. Intraindividual variability across cognitive domains: investigation of dispersion levels and performance profiles in older adults. **J Clin Exp Neuropsychol**, v. 31, n. 4, p. 412-24, May 2009. ISSN 1744-411X (Electronic). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18720183](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18720183) >.



HO, V. M.; LEE, J. A.; MARTIN, K. C. The cell biology of synaptic plasticity. **Science**, v. 334, n. 6056, p. 623-8, Nov 4 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053042> >.

HOSSEINI-SHARIFABAD, M.; NYENGAARD, J. R. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 206-14, May 15 2007. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368561> >.

HUNSAKER, M. R.; ROSENBERG, J. S.; KESNER, R. P. The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. **Hippocampus**, v. 18, n. 10, p. 1064-73, 2008. ISSN 1098-1063 (Electronic) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18651615](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18651615) >.

IMAI, Y. et al. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 224, n. 3, p. 855-62, Jul 1996. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8713135> >.

ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 57, n. 1, p. 1-9, Jun 1 1998. ISSN 0169-328X (Print) 0169-328X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630473> >.

JAKUBS, K. et al. Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain. **J Neurosci**, v. 28, n. 47, p. 12477-88, Nov 2008. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19020040> >.

JANSON, C. H. Experimental evidence for spatial memory in foraging wild capuchin monkeys, *Cebus apella*. **Anim Behav**, v. 55, n. 5, p. 1229-43, May 1998. ISSN 0003-3472 (Print) 0003-3472 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9632507](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9632507) >.

JELINEK, H. et al. MicroMod—an L-systems approach to neuron modelling. Proceedings of the Sixth Australasia-Japan Joint Workshop on Intelligent and Evolutionary Systems, Australian National University, Canberra, 2002. p.156-163.



KARLSSON, M. P.; FRANK, L. M. Network dynamics underlying the formation of sparse, informative representations in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 28, n. 52, p. 14271-81, Dec 24 2008. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109508> >.

KARPERIEN, A. FracLac for ImageJ, version 2.5. **Introduction. htm**, v. 2007, 1999.

KARPERIEN, A.; AHAMMER, H.; JELINEK, H. F. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 3, 2013. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386810> >.

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

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011. ISSN 0031-9333.

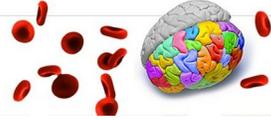
KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. **Neuron**, v. 77, n. 1, p. 10-8, Jan 2013. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23312512> >.

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

KOHMAN, R. A. et al. Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 5, p. 803-10, Jul 2012. ISSN 1090-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056294> >.

LANE, A. E. et al. Sensory Processing Subtypes in Autism: Association with Adaptive Behavior. **J Autism Dev Disord**, Jul 31 2009. ISSN 1573-3432 (Electronic). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19644746](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19644746) >.

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



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

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

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

LIANG, K. J. et al. Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 50, n. 9, p. 4444-51, Sep 2009. ISSN 1552-5783. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443728> >.

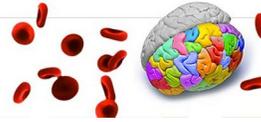
MA, S. et al. Varying coefficient model for gene-environment interaction: a non-linear look. **Bioinformatics**, v. 27, n. 15, p. 2119-26, Aug 2011. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690105> >.

MAGGI, L. et al. CX(3)CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. **Front Cell Neurosci**, v. 5, p. 22, 2011. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025910> >.

MALKOVA, L.; MISHKIN, M. One-trial memory for object-place associations after separate lesions of hippocampus and posterior parahippocampal region in the monkey. **J Neurosci**, v. 23, n. 5, p. 1956-65, Mar 2003. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629201> >.

MANNS, J. R.; EICHENBAUM, H. Evolution of declarative memory. **Hippocampus**, v. 16, n. 9, p. 795-808, 2006. ISSN 1050-9631 (Print) 1050-9631 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16881079](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16881079) >.

\_\_\_\_\_. A cognitive map for object memory in the hippocampus. **Learn Mem**, v. 16, n. 10, p. 616-24, 2009. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19794187](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19794187) >.



MCDONALD, R. J.; HONG, N. S. How does a specific learning and memory system in the mammalian brain gain control of behaviour? **Hippocampus**, Aug 8 2013. ISSN 1098-1063 (Electronic)

1050-9631 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23929795>>.

MCHUGH, T. J. et al. Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. **Science**, v. 317, n. 5834, p. 94-9, Jul 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556551>>.

MIYAMOTO, A. et al. Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 70, 2013. ISSN 1662-5102. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720611>>.

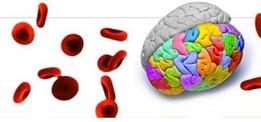
MOSER, E. I.; KROPFF, E.; MOSER, M. B. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. **Annu Rev Neurosci**, v. 31, p. 69-89, 2008. ISSN 0147-006X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284371>>.

MURAKAMI, T. et al. Perineuronal nets of proteoglycans in the adult mouse brain, with special reference to their reactions to Gomori's ammoniacal silver and Ehrlich's methylene blue. **Arch Histol Cytol**, v. 62, n. 1, p. 71-81, Mar 1999. ISSN 0914-9465 (Print). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10223744](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10223744)>.

MURRAY, E. A.; BUSSEY, T. J.; SAKSIDA, L. M. Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents. **Annu Rev Neurosci**, v. 30, p. 99-122, 2007. ISSN 0147-006X (Print). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17417938](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17417938)>.

NAGAHARA, A. H.; BERNOT, T.; TUSZYNSKI, M. H. Age-related cognitive deficits in rhesus monkeys mirror human deficits on an automated test battery. **Neurobiol Aging**, v. 31, n. 6, p. 1020-31, Jun 2010. ISSN 1558-1497 (Electronic) 0197-4580 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760505>>.

NAKAKO, T. et al. Effects of a dopamine D1 agonist on ketamine-induced spatial working memory dysfunction in common marmosets. **Behav Brain Res**, v. 249, p. 109-15, Jul 15 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23608483>>.



NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-8, May 27 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831717> >.

O'MALLEY, A. et al. Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent. **Neuroscience**, v. 99, n. 2, p. 229-32, 2000. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938428> >.

OBERHEIM, N. A. et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **J Neurosci**, v. 29, n. 10, p. 3276-87, Mar 11 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279265> >.

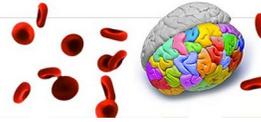
\_\_\_\_\_. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. **Trends Neurosci**, v. 29, n. 10, p. 547-53, Oct 2006. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938356> >.

OHSAWA, K.; KOHSAKA, S. Dynamic motility of microglia: Purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. **Glia**, Sep 7 2011. ISSN 1098-1136 (Electronic) 0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901756> >.

PAN, J. et al. Development of maze navigation by tufted capuchins (*Cebus apella*). **Behav Processes**, v. 86, n. 2, p. 206-15, Feb 2011. ISSN 1872-8308. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138761> >.

PASCALIS, O. et al. Change in background context disrupts performance on visual paired comparison following hippocampal damage. **Neuropsychologia**, v. 47, n. 10, p. 2107-13, Aug 2009. ISSN 1873-3514 (Electronic) 0028-3932 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19467361](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19467361) >.

PEARCE, P. C. et al. The effects of acutely administered low dose sarin on cognitive behaviour and the electroencephalogram in the common marmoset. **J Psychopharmacol**, v. 13, n. 2, p. 128-35, 1999. ISSN 0269-8811 (Print) 0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10475717> >.



POTI, P. et al. Searching in the middle-Capuchins' (*Cebus apella*) and bonobos' (*Pan paniscus*) behavior during a spatial search task. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 36, n. 1, p. 92-109, Jan 2010. ISSN 1939-2184 (Electronic)

0097-7403 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20141320](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20141320)>.

POTI, P.; SAPORITI, M. A capuchin monkey (*Cebus apella*) uses video to find food. **Folia Primatol (Basel)**, v. 81, n. 1, p. 16-30, 2010. ISSN 1421-9980. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20357474>>.

RAIVICH, G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 11, p. 571-3, Nov 2005. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16165228>>.

REMONDES, M.; SCHUMAN, E. M. Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons. **Nature**, v. 416, n. 6882, p. 736-40, Apr 18 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11961555>>.

\_\_\_\_\_. Molecular mechanisms contributing to long-lasting synaptic plasticity at the temporoammonic-CA1 synapse. **Learn Mem**, v. 10, n. 4, p. 247-52, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 1072-0502. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888542>>.

\_\_\_\_\_. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. **Nature**, v. 431, n. 7009, p. 699-703, Oct 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470431>>.

RESENDE, M. C.; TAVARES, M. C.; TOMAZ, C. Ontogenetic dissociation between habit learning and recognition memory in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Neurobiol Learn Mem**, v. 79, n. 1, p. 19-24, Jan 2003. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12482675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12482675)>.

ROBBINS, T. W. et al. A study of performance on tests from the CANTAB battery sensitive to frontal lobe dysfunction in a large sample of normal volunteers: implications for theories of executive functioning and cognitive aging. Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery. **J Int Neuropsychol Soc**, v. 4, n. 5, p. 474-90, Sep 1998. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9745237](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9745237)>.



\_\_\_\_\_. Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB): a factor analytic study of a large sample of normal elderly volunteers. **Dementia**, v. 5, n. 5, p. 266-81, 1994 Sep-Oct 1994. ISSN 1013-7424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7951684> >.

ROCHA, E. G. et al. Callosal axon arbors in the limb representations of the somatosensory cortex (SI) in the agouti (*Dasyprocta primnolopha*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 500, n. 2, p. 255-266, Jan 2007. ISSN 0021-9967.

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

ROGERS, J. T. et al. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. **J Neurosci**, v. 31, n. 45, p. 16241-50, Nov 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072675> >.

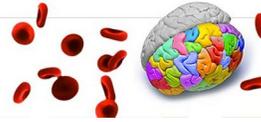
ROLLS, E. T. A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus. **Behav Brain Res**, Mar 20 2010. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20307583](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20307583) >.

ROLLS, E. T.; XIANG, J.; FRANCO, L. Object, space, and object-space representations in the primate hippocampus. **J Neurophysiol**, v. 94, n. 1, p. 833-44, Jul 2005. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15788523](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15788523) >.

ROSS, F. M. et al. A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. **J Neuroimmunol**, v. 144, n. 1-2, p. 61-7, Nov 2003. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597099> >.

RUIZ-GARCÍA, M. et al. Molecular relationships and classification of several tufted capuchin lineages (*Cebus apella*, *Cebus xanthosternos* and *Cebus nigrinus*, Cebidae), by means of mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequences. **Folia Primatol (Basel)**, v. 83, n. 2, p. 100-25, 2012. ISSN 1421-9980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23128150> >.

RUSS, J. C.; ROVNER, I. Stereological identification of opal phytolith populations from wild and cultivated *Zea*. **American antiquity**, p. 784-792, 1989. ISSN 0002-7316.



SAHAKIAN, B. J.; OWEN, A. M. Computerized assessment in neuropsychiatry using CANTAB: discussion paper. **J R Soc Med**, v. 85, n. 7, p. 399-402, Jul 1992. ISSN 0141-0768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629849> >.

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

SAPER, C. B.; SAWCHENKO, P. E. Magic peptides, magic antibodies: Guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 465, n. 2, p. 161-163, 2003. ISSN 1096-9861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cne.10858> >.

SCHAFFER, D. P.; LEHRMAN, E. K.; STEVENS, B. The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia**, Jul 2012. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829357> >.

\_\_\_\_\_. The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 24-36, Jan 2013. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829357> >.

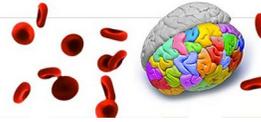
SCHMIDT, B.; MARRONE, D. F.; MARKUS, E. J. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 1, p. 56-65, Jan 2012. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907247> >.

SCHNEIDER, H. et al. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 13, p. 7778-83, Jun 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636227> >.

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

SEGAL, E. F. **Housing, care and psychological wellbeing of captive and laboratory Primates**. . 1989. ISBN 0-8155-1201-5.

SEHGAL, M. et al. Learning to learn - Intrinsic plasticity as a metaplasticity mechanism for memory formation. **Neurobiol Learn Mem**, Jul 18 2013. ISSN 1095-9564 (Electronic) 1074-7427 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23871744> >.



SHEFI, O. et al. Biophysical constraints on neuronal branching. **Neurocomputing**, v. 58, p. 487-495, 2004. ISSN 0925-2312.

SHU, S. Y.; JU, G.; FAN, L. Z. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neurosci Lett**, v. 85, n. 2, p. 169-71, Feb 29 1988. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3374833> >.

SMITH, P. J. et al. A comparison of the Cambridge Automated Neuropsychological Test Battery (CANTAB) with "traditional" neuropsychological testing instruments. **J Clin Exp Neuropsychol**, v. 35, n. 3, p. 319-28, Mar 2013. ISSN 1744-411X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23444947> >.

SPIERS, H. J. et al. Place Field Repetition and Purely Local Remapping in a Multicompartment Environment. **Cereb Cortex**, Aug 2013. ISSN 1460-2199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945240> >.

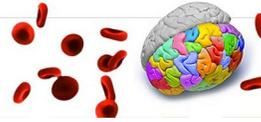
SPINELLI, S. et al. Enhancing effects of nicotine and impairing effects of scopolamine on distinct aspects of performance in computerized attention and working memory tasks in marmoset monkeys. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 2, p. 238-50, Aug 2006. ISSN 0028-3908 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16678864](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16678864) >.

\_\_\_\_\_. Effects of the mGluR2/3 agonist LY354740 on computerized tasks of attention and working memory in marmoset monkeys. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 292-302, Apr 2005. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15678362> >.

\_\_\_\_\_. Performance of the marmoset monkey on computerized tasks of attention and working memory. **Brain Res Cogn Brain Res**, v. 19, n. 2, p. 123-37, Apr 2004. ISSN 0926-6410 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15019709](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15019709) >.

SPULBER, S. et al. Impaired long term memory consolidation in transgenic mice overexpressing the human soluble form of IL-1ra in the brain. **J Neuroimmunol**, v. 208, n. 1-2, p. 46-53, Mar 2009. ISSN 1872-8421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211154> >.

SQUIRE, L. R.; STARK, C. E.; CLARK, R. E. The medial temporal lobe. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 279-306, 2004. Disponível em: <



[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15217334](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15217334) >.

SÁNCHEZ-ALCAÑIZ, J. A. et al. Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. **Neuron**, v. 69, n. 1, p. 77-90, Jan 2011. ISSN 1097-4199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220100> >.

TAFFE, M. A.; TAFFE, W. J. Rhesus monkeys employ a procedural strategy to reduce working memory load in a self-ordered spatial search task. **Brain Res**, v. 1413, p. 43-50, Sep 21 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840507> >.

TAFFE, M. A.; WEED, M. R.; GOLD, L. H. Scopolamine alters rhesus monkey performance on a novel neuropsychological test battery. **Brain Res Cogn Brain Res**, v. 8, n. 3, p. 203-12, Oct 25 1999. ISSN 0926-6410 (Print) 0926-6410 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556599> >.

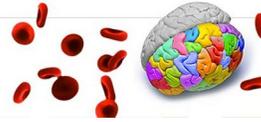
TAFFE, M. A. et al. Differential muscarinic and NMDA contributions to visuo-spatial paired-associate learning in rhesus monkeys. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 160, n. 3, p. 253-62, Mar 2002. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11889494> >.

TAVARES, M. C.; TOMAZ, C. Working memory in capuchin monkeys (*Cebus apella*). **Behav Brain Res**, v. 131, n. 1-2, p. 131-7, Apr 1 2002. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11844580](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11844580) >.

TENG, E. et al. Contrasting effects on discrimination learning after hippocampal lesions and conjoint hippocampal-caudate lesions in monkeys. **J Neurosci**, v. 20, n. 10, p. 3853-63, May 2000. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10804225> >.

TREMBLAY, M. et al. The role of microglia in the healthy brain. **J Neurosci**, v. 31, n. 45, p. 16064-9, Nov 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072657> >.

TREMBLAY, M. E.; LOWERY, R. L.; MAJEWSKA, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. **PLoS Biol**, v. 8, n. 11, p. e1000527, 2010. ISSN 1545-7885 (Electronic) 1544-9173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072242> >.



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

VISALBERGHI, E. Tool use in Cebus. **Folia Primatol (Basel)**, v. 54, n. 3-4, p. 146-54, 1990. ISSN 0015-5713 (Print) 0015-5713 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2202616](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2202616) >.

\_\_\_\_\_. Success and Understanding in Cognitive Tasks: A Comparison Between Cebus apella and Pan troglodytes. **International Journal of Primatology**, v. 18, n. 5, p. 811-830, 1997. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1023/A:1026399930727> >.

VISALBERGHI, E.; FRAGASZY, D. M.; SAVAGE-RUMBAUGH, S. Performance in a tool-using task by common chimpanzees (Pan troglodytes), bonobos (Pan paniscus), an orangutan (Pongo pygmaeus), and capuchin monkeys (Cebus apella). **J Comp Psychol**, v. 109, n. 1, p. 52-60, Mar 1995. ISSN 0735-7036 (Print) 0021-9940 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7705062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7705062) >.

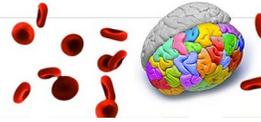
VUKOVIC, J. et al. Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches. **Neurochem Int**, v. 59, n. 3, p. 341-6, Sep 2011. ISSN 1872-9754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21699941> >.

\_\_\_\_\_. Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. **J Neurosci**, v. 32, n. 19, p. 6435-43, May 2012. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573666> >.

WAKE, H. et al. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 4, p. 209-17, Apr 2013. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23260014> >.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system - beyond the immune response. **Neuron Glia Biol**, v. 7, n. 1, p. 47-53, Feb 2011. ISSN 1741-0533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22613055> >.

\_\_\_\_\_. Functions of microglia in the central nervous system—beyond the immune response. **Neuron Glia Biology**, v. 7, n. 01, p. 47-53, 2011. ISSN 1741-0533.



WEED, M. R. et al. Impaired performance on a rhesus monkey neuropsychological testing battery following simian immunodeficiency virus infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 1, p. 77-89, Jan 2004. ISSN 0889-2229 (Print)

0889-2229 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000701>>.

\_\_\_\_\_. Performance norms for a rhesus monkey neuropsychological testing battery: acquisition and long-term performance. **Brain Res Cogn Brain Res**, v. 8, n. 3, p. 185-201, Oct 25 1999. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10556598](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10556598)>.

WESTERGAARD, G. C.; SUOMI, S. J. Capuchin monkey (*Cebus apella*) grips for the use of stone tools. **Am J Phys Anthropol**, v. 103, n. 1, p. 131-5, May 1997. ISSN 0002-9483 (Print)

0002-9483 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9185956](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9185956)>.

WHITE, N. M.; MCDONALD, R. J. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 77, n. 2, p. 125-84, Mar 2002. ISSN 1074-7427 (Print)

1074-7427 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848717>>.

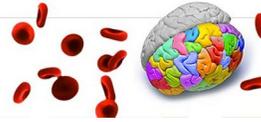
WILDMAN, D. E. et al. A fully resolved genus level phylogeny of neotropical primates (Platyrrhini). **Mol Phylogenet Evol**, v. 53, n. 3, p. 694-702, Dec 2009. ISSN 1095-9513. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19632342>>.

WILLIAMSON, L. L. et al. Microglia and memory: modulation by early-life infection. **J Neurosci**, v. 31, n. 43, p. 15511-21, Oct 2011. ISSN 1529-2401. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031897>>.

WIRZ, A.; RIVIELLO, M. C. Reproductive parameters of a captive colony of capuchin monkeys (*Cebus apella*) from 1984 to 2006. **Primates**, v. 49, n. 4, p. 265-70, Oct 2008. ISSN 0032-8332. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18696009>>.

WITTER, M. P. et al. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. **Prog Neurobiol**, v. 33, n. 3, p. 161-253, 1989. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2682783>>.



WONG, W. T.; WANG, M.; LI, W. Regulation of microglia by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **Neuron Glia Biol**, v. 7, n. 1, p. 41-6, Feb 2011. ISSN 1741-0533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166726> >.

ZHANG, Y.; BARRES, B. A. A smarter mouse with human astrocytes. **Bioessays**, Jul 30 2013. ISSN 1521-1878 (Electronic) 0265-9247 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897758> >.

ZIV, Y. et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. **Nat Neurosci**, v. 9, n. 2, p. 268-75, Feb 2006. ISSN 1097-6256 (Print). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16415867](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16415867) >.

ZIV, Y.; SCHWARTZ, M. Immune-based regulation of adult neurogenesis: implications for learning and memory. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 2, p. 167-76, Feb 2008. ISSN 1090-2139 (Electronic). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17905567](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17905567) >.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; MISHKIN, M. The neuroanatomy of amnesia: amygdala-hippocampus versus temporal stem. **Science**, v. 218, n. 4579, p. 1337-9, Dec 1982. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6890713> >.



## ANEXO 1

Valores absolutos associados às diferenças estatísticas de cada parâmetro morfométrico da micróglia entre os sujeitos, no lacunosum molecular de CA1.

LACUNOSUM MOLECULAR DE CA1														
	Comprimento Ramos		N° de Segmentos		Volume Ramos		Segmentos/mm		Área Superfície		N° Protusões		Total Árvores	
	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO
FCA1	6.795	0.114	62.333	3.332	188.429	10.128	149.608	2.971	858.041	40.909	21.667	1.849	6.196	0.313
MCA1	7.026	0.136	51.100	3.151	127.396	7.978	144.851	2.707	661.637	39.655	12.140	0.944	6.720	0.338
SCA1	6.214	0.102	77.263	11.652	147.237	10.866	162.579	2.806	795.356	55.720	16.789	1.231	6.974	0.359
JCA1	7.876	0.177	52.680	2.502	132.209	7.640	130.315	3.102	720.450	34.368	15.420	0.753	5.000	0.230
	Ângulo Planar		Tortuosidade		Dimensão Fractal									
	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO								
FCA1	46.820	0.599	1.151	0.006	1.059	0.005								
MCA1	45.986	0.774	1.131	0.005	1.040	0.005								
SCA1	49.669	0.782	1.170	0.007	1.058	0.006								
JCA1	47.079	0.632	1.172	0.007	1.052	0.004								
	Convexidade		Área Soma		Ferret Min		Fator Forma							
	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO						
FCA1	0.926	0.007	55.886	2.248	6.980	0.133	0.643	0.020						
MCA1	0.920	0.006	54.569	2.393	6.652	0.193	0.602	0.019						
SCA1	0.883	0.010	48.337	2.326	6.563	0.183	0.554	0.023						
JCA1	0.924	0.007	47.918	2.308	6.294	0.185	0.624	0.019						



## ANEXO 2

Valores absolutos associados às diferenças estatísticas de cada parâmetro morfométrico da micróglia entre os sujeitos, no terço externo da camada molecular do giro denteado.

TERÇO EXTERNO DA CAMADA MOLECULAR DO GIRO DENTEADO (GDE)														
	Comprimento dos Ramos		Diâmetro da Base		Número de Varicosidade		Número de Segmentos		Volume dos Ramos		Segmentos/mm		Área de Superfície	
	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO
FDGE	6.904	0.200	1.098	0.027	6.611	0.572	70.639	3.507	220.434	13.122	148.531	3.733	989.379	51.270
MDGE	6.561	0.132	0.767	0.042	6.086	0.714	66.429	2.547	105.613	8.586	154.437	3.018	677.686	25.015
SDGE	5.140	0.176	0.697	0.016	4.633	0.674	79.100	3.643	95.939	5.127	200.853	6.618	636.114	26.847
JDGE	7.783	0.231	1.030	0.041	8.313	1.240	55.031	3.439	159.419	13.048	131.928	3.831	792.185	52.894
	Ângulo Planar		Tortuosidade		Dimensão Fractal									
	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO								
FDGE	48.491	0.705	1.167	0.009	1.063	0.004								
MDGE	45.296	1.034	1.129	0.008	1.069	0.004								
SDGE	45.137	0.599	1.095	0.004	1.056	0.003								
JDGE	49.726	1.050	1.155	0.008	1.053	0.005								
	Esfericidade		Fator Forma		Solidez		Compacidade		Perímetro do Soma		Área do Soma		Ferret Max	
	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO
FDGE	0.553	0.023	0.680	0.023	0.922	0.010	0.738	0.016	30.647	0.983	49.816	2.544	10.931	0.403
MDGE	0.581	0.023	0.715	0.017	0.958	0.006	0.756	0.016	27.814	0.751	43.716	1.763	9.994	0.363
SDGE	0.601	0.028	0.703	0.025	0.930	0.012	0.769	0.019	27.173	0.780	40.757	1.745	9.473	0.325
JDGE	0.505	0.019	0.624	0.022	0.910	0.011	0.707	0.013	32.434	1.140	50.900	2.276	11.488	0.383



### ANEXO 3

Valores absolutos associados às diferenças estatísticas de cada parâmetro morfométrico da micróglia entre os sujeitos, no terço médio da camada molecular do giro denteado.

TERÇO MÉDIO DA CAMADA MOLECULAR DO GIRO DENTEADO (GDM)																			
	Comprimento dos Ramos		Diâmetro da Base		Número de Varicosidade		Número de Segmentos		Volume dos Ramos		Segmentos/mm		Área de Superfície						
	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	
FDGM	7.123	0.143	1.030	0.024	8.972	0.900	65.028	3.274	178.970	9.659	142.371	2.879	886.609	41.011					
MDGM	6.296	0.129	0.809	0.049	5.658	0.562	69.211	3.399	125.465	13.780	161.196	3.190	725.620	45.271					
SDGM	5.037	0.104	0.723	0.021	4.621	0.710	85.069	4.387	105.893	6.402	200.880	4.083	682.559	34.224					
JDGM	7.664	0.268	0.951	0.022	8.424	1.055	73.848	6.663	175.020	10.145	135.441	4.663	959.952	57.134					
		Ângulo Planar		Tortuosidade		Excentricidade													
		MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO												
FDGM		46.621	0.784	1.155	0.006	1.783	0.071												
MDGM		46.182	0.680	1.125	0.008	1.574	0.039												
SDGM		46.313	0.763	1.098	0.003	1.735	0.072												
JDGM		49.183	0.804	1.188	0.010	1.964	0.136												
		Esfericidade		Fator Forma		Solidez		Convexidade		Compacidade		Perímetro do Soma		Área do Soma		Ferret Min		Ferret Max	
		MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO	MEDIA	ERRO
FDGM		0.514	0.022	0.668	0.022	0.909	0.013	0.942	0.005	0.711	0.016	31.389	1.191	51.264	2.665	6.525	0.181	11.556	0.495
MDGM		0.598	0.015	0.711	0.015	0.952	0.007	0.925	0.007	0.771	0.010	27.245	0.796	42.132	1.960	6.058	0.150	9.492	0.289
SDGM		0.546	0.026	0.675	0.020	0.926	0.013	0.937	0.007	0.733	0.018	28.041	0.983	41.865	2.170	5.926	0.203	10.087	0.411
JDGM		0.467	0.024	0.584	0.026	0.873	0.016	0.916	0.009	0.675	0.019	34.794	2.095	52.208	3.226	6.479	0.153	12.615	0.889



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROCIÊNCIAS E  
BIOLOGIA CELULAR

