



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

**ENVELHECIMENTO, DECLÍNIO COGNITIVO E PLASTICIDADE
ASTROGLIAL EM CA3**

TATYANA PEREIRA TOKUHASHI

**BELÉM - PARÁ
2011**

TATYANA PEREIRA TOKUHASHI

**ENVELHECIMENTO, DECLÍNIO COGNITIVO E PLASTICIDADE
ASTROGLIAL EM CA3**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre, Área de concentração: Neurociências. **Orientador:** Prof.º Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

**BELÉM - PARÁ
2011**

TATYANA PEREIRA TOKUHASHI

**ENVELHECIMENTO, DECLÍNIO COGNITIVO E PLASTICIDADE
ASTROGLIAL EM CA3**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre, Área de concentração: Neurociências. **Orientador:** Prof.º Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

Banca Examinadora:

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

Dra. Márcia Consentino Kronka Sósthene

Dra. Lucília Fonseca Santiago

Dedico este trabalho a minha mãe, meu pai, minha filha e amigos que de forma direta ou indireta me ajudaram na construção deste trabalho.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida.

A minha família, em especial à minha mãe Maria de Fátima Pereira Tokuhashi e meu pai Fernando Shota Tokuhashi, minha sobrinha Julyana Tokuhashi Pinheiro e minha filha Fernanda Tokuhashi Toledo por acreditarem em mim e me incentivarem sempre a buscar algo melhor e saberem lidar com minha ausência. E a sabedoria de me acalmarem nos momentos em que eu não sabia lidar com a distância.

Aos meus orientadores, Dr Cristóvam Diniz e Msc João Bento Torres Neto por terem aberto as portas da ciência para mim e por terem me feito conhecer um mundo novo.

Aos meus amigos do Laboratório de Neurodegeneração e Infecção, Aline Passos, Nara Lins, Carlos Santos, Renata Rodrigues, Nonata Trévia, Roseane Borne e principalmente a Maíra Turiel e Lucas Trindade, pelo companheirismo, amizade e ajuda no decorrer de tantos anos.

Agradeço imensamente a Professora Marcia Kronka e Lucídia Santiago por toda dedicação e ajuda proposta durante a banca.

Aos amigos que incentivaram, ajudaram e souberam entender minha ausência nos momentos mais difíceis, em especial a minha amiga Suene Lima Colonelli que foi de fundamental ajuda no término deste trabalho.

Ao Diego Takeshi Moreira, por me incentivar e ficar ao meu lado me dando apoio nos momentos em que mais precisei.

**"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original".**

Albert Einstein

Resumo

Poucos estudos tem se dedicado a investigar em detalhe possíveis relações entre o declínio cognitivo associado ao envelhecimento e a plasticidade astrogliar no hipocampo. No presente trabalho investigamos possíveis relações entre o desempenho em testes de memória de reconhecimento de objeto e o número e a distribuição laminar dos astrócitos em CA3 em modelo murino. Para isso empregamos camundongos fêmeas adultas da linhagem C57Bl6 de 6 (n = 7) e 20 meses (n = 5) de idade, mantidos em gaiolas padrão desde o nascimento, comparando seus desempenhos em tarefas hipocampo-dependentes para reconhecimento da forma, do lugar e do momento em que os objetos selecionados lhes foram expostos. Após os testes comportamentais todos os animais foram perfundidos com fixadores aldeídicos e tiveram seus cérebros removidos e processados para imunomarcção empregando anticorpo seletivo para detecção da proteína ácida fibrilar dos astrócitos (GFAP). Para evitar possível viés amostral empregamos o fracionador óptico, um método estereológico que não é afetado pelo processamento histológico. Os resultados nos testes comportamentais isolados e integrados (memória episódica) revelaram que o envelhecimento compromete significativamente (teste T bi-caudal, $p < 0.05$) o reconhecimento da forma, do lugar e do momento em que objetos selecionados são apresentados aos sujeitos. As análises estereológicas das estimativas do número de astrócitos revelaram que o envelhecimento afetou a distribuição laminar com aumento na proporção relativa daqueles na camada piramidal de CA3 dorsal e ventral e redução no lacunoso molecular de CA3 dorsal. O número total de astrócitos em consequência apresentou significativa reorganização na distribuição laminar em função da idade com os animais senis mostrando redução no percentual daqueles localizados na camada oriens. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os volumes das camadas de CA3 sugerindo que as mudanças induzidas pelo envelhecimento alteram diretamente a plasticidade astrogliar em CA3. Finalmente os estudos de correlação linear entre as estimativas do número dos astrócitos da camada piramidal e os testes comportamentais demonstraram correlação inversa com os piores desempenhos estando associados a um maior número de astrócitos naquela camada. Evidências diretas adicionais dessa correlação com os astrócitos alterados em CA3 e possíveis mecanismos moleculares para explicar o declínio cognitivo associado ao envelhecimento permanecem por ser investigados.

Palavras Chave: Envelhecimento, declínio cognitivo, hipocampo, CA3, astrócitos

Abstract

A few studies investigated in detail possible relationships between aging cognitive decline and hippocampal astroglial plasticity. In the present report we investigated in murine model possible relationships between performances in object recognition tests and the astrocytes laminar distribution in CA3. To do so, young (6 months old, $n = 7$) and old (20 months old, $n = 5$) C57Bl6 mice, were maintained in standard cages and assessed in object recognition hippocampal-dependent tasks. Isolated or integrated (episodic-like memory) tests were applied and revealed that object identity (What?), place (Where?) and time (When?), were impaired in old subjects, whereas in young mice only spatial memory was impaired. After behavioral tests all subjects were sacrificed and perfused with aldehyde fixatives had their brains removed and processed for glial fibrillary acid protein (GFAP) immunohistochemistry, a selective marker for astrocytes. To avoid sample bias we used the optical fractionator, a stereological method that is not affected by histological procedures. The results on behavioral isolated or integrated tests revealed that aging significantly impairs object, spatial and time recognition (two-tail t-test, $p < 0.05$). As compared to young subjects, old mice showed laminar changes in the astrocytes distribution with proportional increase of the astrocytes number in the pyramidal layer of dorsal and ventral CA3 and a reduction in the lacunosum molecular layer of dorsal CA3. Coherently, the total number of CA3 astrocytes showed significant reorganization of its laminar distribution as a function of age with reduction of its numbers in the stratum oriens. No significant differences were detected in the mean values of laminar volumes suggesting that aging induced changes directly affected astroglial plasticity in CA3. Finally, a linear inverse correlation was found between the estimations of pyramidal cell layer astrocytes and performances in the behavioral tasks. Further direct evidences of this correlation with altered CA3 astrocytes and possible molecular mechanisms to explain aging cognitive decline remains to be investigated.

Keywords: Aging, hippocampus, cognitive decline, CA3, astrocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama esquemático simplificado dos circuitos hipocampais e parahipocampais.....	19
Figura 2: Astrócitos promovendo rápida modificação estrutural.....	25
Figura 3: Interações entre astrócitos e espinhas ilustrando a dinâmica desse processo.....	25
Figura 4: Representação esquemática do aparato nos testes comportamentais.....	31
Figura 5: Representação esquemática dos teste de memória de objeto.....	32
Figura 6: Representação esquemática dos teste de memória de lugar.....	33
Figura 7: Representação esquemática dos teste de memória de tempo.....	34
Figura 8: Representação esquemática do teste de memória similar à episódica.....	35
Figura 9: Desenho esquemático de uma caixa de contagem.....	38
Figura 10: Gráfico com a taxa de discriminação nos testes isolados para reconhecimento de lugar (Espaço), sequência temporal (Tempo) e forma de objetos (Forma).....	41
Figura 11: Gráfico com a taxa de discriminação de objetos no teste de memória semelhante à episódica em animais jovens e senis.....	42
Figura 12: Fotomicrografias de secções imunomarcadas para GFA.....	43
Figura 13: Gráfico com as médias das estimativas do número de astrócitos em cada camada da região CA3 dorsal e Ventral.....	44
Figura 14: Gráfico com a estimativa do número total de astrócitos na região de CA3.....	45
Figura 15: Gráfico com as alterações induzidas pelo envelhecimento na distribuição laminar dos astrócitos de CA3.....	48
Figura 16: Análise multivariada e correlação de Pearson associando as estimativas do número de astrócitos na região de CA3 e o índice de discriminação da forma de objetos.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Etapas para a realização da imunohistoquímica para detecção de GFAP.....	36
Tabela 2: Contracoloração com violeta de cresila (Nissl).....	37
Tabela 3: Parâmetros estereológicos para contagem de astrócitos nas camadas de CA3.....	40
Tabela 4: Resultados das estimativas de astrócitos na camada molecular de CA3.....	45
Tabela 5: Resultados das estimativas de astrócitos no radiatum de CA3.....	46
Tabela 6: Resultados das estimativas de astrócitos na piramidal de CA3.....	46
Tabela 7: Resultados das estimativas de astrócitos no oriens em CA3.....	47
Tabela 8: Resultados Comparativos de Estimativas Estereológicas do Número de Neurônios em CA3 do hipocampo de Ratos Wistar.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – Avidin-biotin complex

ANOVA – Análise de variância

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

CA – Corno de Amon

CE – Córtex entorrinal

CE – Coeficiente de Scheaffer

CV² – Coeficiente de Variação

CVB² – Coeficiente de Variação Biológica

DAB – Diaminobenzidine tetrahydrochloride

DG – Giro denteado

GFAP – Proteína Ácida Fibrilar glial

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IEC – Instituto Evandro Chagas

LNI – Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção

MOM – Mouse-On-Mouse

N – número total de células

PB – Tampão fosfato

PBS – Tampão fosfato Salina

PBST – Tampão fosfato Salina Triton

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

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

ΣQ – número de marcadores contados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A REALIDADE DO ENVELHECIMENTO NO BRASIL E NO MUNDO.....	13
1.2	ALTERAÇÕES CEREBRAIS NO ENVELHECIMENTO.....	15
1.3	MEMÓRIA, ENVELHECIMENTO E DISFUNÇÃO HIPOCAMPAL.....	17
1.3.1	Contribuição Regional do Hipocampo para a formação da Memória Episódica.....	18
1.3.2	Envelhecimento, Déficits de Memória e Alterações Regionais Hipocampais.....	20
1.4	ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS, PLASTICIDADE SINÁPTICA, ENVELHECIMENTO E DECLÍNIO COGNITIVO.....	23
1.5	O MODELO EXPERIMENTAL MURINO.....	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	GERAL.....	30
2.2	ESPECÍFICOS.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.....	31
3.2	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	31
3.3	EQUIPAMENTO.....	32
3.4	FASE DE HABITUAÇÃO.....	32
3.5	FASES DE TESTES: MEMÓRIA DE OBJETO, MEMÓRIA DE LUGAR, DE TEMPO E SIMILAR À EPISÓDICA.....	33
3.6	ANÁLISES DAS IMAGENS CAPTURADAS.....	36
3.7	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS.....	36
3.8	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	37
3.9	ESTEREOLOGIA.....	38
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4	RESULTADOS	42
4.1	ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	42
4.2	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTEREOLÓGICAS.....	44
5	DISCUSSÃO	51
5.1	DECLÍNIO COGNITIVO SENIL, PLASTICIDADE SINÁPTICA E DISTRIBUIÇÃO LAMINAR DOS ASTRÓCITOS EM CA3.....	51
5.2	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DOS ASTRÓCITOS EM CA3.....	53
5.3	HORMÔNIOS SEXUAIS E ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS.....	54
5.4	LIMITAÇÕES TÉCNICAS NÃO ESTEREOLÓGICAS.....	55
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

“...When Hebb reached his 70s he noted, ‘I have long believed that the best way to remember to take something with me is to put it on the doorstep, so I see it when I leave; now this works better if the object is big enough to trip me’...” (BURKE e BARNES, 2010)

Donald Hebb tinha setenta anos quando escreveu sobre a dificuldade crescente de lembrar-se das coisas que tinha que fazer ou carregar consigo a medida que envelhecia. Essa descrição anedótica de Hebb o famoso neurofisiologista canadense a quem devemos a formulação teórica acerca da plasticidade sináptica dependente de experiência, nos deixa ver a correlação entre o envelhecimento e o esquecimento... Sua descrição publicada em 1978 no periódico *Psychology Today* sob o título: “Assistindo a mim mesmo envelhecer” (HEBB, 1978), ilustra bem um dilema de proporções epidêmicas do tempo presente que é fruto de uma vida melhor e mais longa (BURKE e BARNES, 2010).

1.1 A REALIDADE DO ENVELHECIMENTO NO BRASIL E NO MUNDO

Nos estudos demográficos voltados à análise da dinâmica da população mundial nas últimas décadas tem se configurado o remodelamento das pirâmides etárias em diversos países do mundo (DICZFALUSY, 2001, COHEN, 2003, FERRUCCI, GIALLAURIA e GURALNIK, 2008, LUNENFELD, 2008). Tanto em países mais desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, tem sido observado um estreitamento da base das pirâmides etárias, o que reflete a realidade da diminuição percentual da população jovem, associada ao alargamento do ápice representando o aumento da população idosa (RAMOS, VERAS e KALACHE, 1987, CARVALHO e GARCIA, 2003).

Essas alterações demográficas se devem às mudanças relacionadas ao aumento da qualidade de vida da população em geral e as novas descobertas na área da saúde que têm levado a expectativas de vida média cada vez mais elevadas. De fato os estudos prospectivos realizados pela Organização Mundial de Saúde revelam que em 2020 o mundo contará com mais de 400 milhões de idosos e o Brasil ocupará a sexta posição dentre os países com o maior contingente de pessoas com 60 ou mais anos de vida na população. Dentre os países que terão as maiores populações de idosos daqui a menos de trinta anos, oito se situam na categoria de países em desenvolvimento. Onde, 20% da população do mundo industrializado já estão acima de sessenta anos de idade e a proporção daqueles acima de 85 anos está

crecendo seis vezes mais rápido do que a população como um todo. O Brasil, desde a década de 70, tem passado por um claro processo de deslocamento demográfico, sendo a faixa de sessenta anos ou mais a que mais cresce em termos proporcionais (OMS, 2011).

Segundo as projeções estatísticas da Organização Mundial da Saúde, tomando como ponto de partida o ano de 1950 e como referência futura o ano de 2025, a população de idosos no país crescerá 16 vezes contra 5 vezes da população total, o que nos colocará em termos absolutos com mais de 32 milhões de pessoas com 60 anos ou mais. Este crescimento populacional é o mais acelerado no mundo e só comparável ao do México e Nigéria. Essas projeções estatísticas demonstram que a proporção de idosos no país que estava em 7,3% em 1991 (11 milhões) passará para cerca de 15% em 2025, que é a atual proporção de idosos da maioria dos países europeus, os quais tiveram sua transição mais lenta e que ainda não conseguiram equacioná-la (MURRAY e LOPEZ, 1997). Deve-se recordar que estas projeções são baseadas em estimativas conservadoras de fecundidade e mortalidade, sendo que se houver uma melhoria mais acentuada na qualidade de vida em nossas zonas mais miseráveis, como o Nordeste, o envelhecimento brasileiro poderá ser ainda maior.

Na população idosa, as doenças crônicas neurodegenerativas são um sério e complexo problema a ser resolvido, de alta importância epidemiológica. As duas patologias mais diagnosticadas são o Mal de Parkinson e o de Alzheimer, com esta última em maior prevalência (KALARIA et al., 2008, SHAFQAT, 2008). Os registros do SUS revelam que, já em 1996, pelo menos 450.000 casos de demência foram diagnosticados e motivaram internações em nosso país. Do contingente com 85 anos ou mais estima-se que cerca de 50% torna-se demente como uma consequência de processos neurodegenerativos (AZAD, AL BUGAMI e LOY-ENGLISH, 2007, KALARIA et al., 2008, SHAFQAT, 2008).

O impacto econômico sobre as contas públicas decorrente do aumento da expectativa de vida pode ser previsto pelo fato prontamente reconhecido de que os maiores gastos com saúde se dão no último ano de vida, e isto reflete o acréscimo das necessidades de cuidados de enfermagem domiciliar, estimando-se um crescimento exponencial destes custos com o aumento da população idosa, com reflexos consideráveis na economia de diversos países, ver (WICK et al., 2000) para revisão.

Torna-se, portanto, relevante que se compreenda melhor o impacto das doenças neurodegenerativas sobre o cérebro envelhecido assim como os fatores de risco que podem acelerar o seu curso temporal, para que se desenvolva capacidade instalada para enfrentar os desafios impostos pela maior expectativa de vida alcançada neste século.

1.2 ALTERAÇÕES CEREBRAIS NO ENVELHECIMENTO

Durante a senescência as alterações físicas que a caracterizam são facilmente observáveis, mas os aspectos neurobiológicos que concorrem para o seu desenvolvimento permanecem, em grande parte desconhecidos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a gênese do envelhecimento, mas o processo em sua totalidade ainda não foi totalmente esclarecido. Aparentemente, o envelhecimento cerebral está associado a fatores que promovem um desequilíbrio progressivo entre as defesas antioxidantes e a concentração intracelular das espécies reativas de oxigênio que aumentam a peroxidação dos lipídeos e a oxidação de proteínas, além de gerar modificações oxidativas no DNA nuclear e mitocondrial (DROGE e SCHIPPER, 2007). A teoria dos radicais livres prediz que o tempo de vida de um organismo pode ser aumentado com o aumento das defesas antioxidantes (HARMAN, 1956) e como os neurônios têm capacidade glicolítica limitada, permanecem dependentes da fosforilação aeróbica oxidativa mitocondrial. Essa dependência do cérebro por oxigênio é comprovada facilmente pela morte dos neurônios sob condições isquêmicas, demonstrando o papel essencial das mitocôndrias na função neuronal (ZHU et al., 2004).

No envelhecimento, a mitocôndria desempenha um papel importante pelo fato de ser uma grande fonte de radicais livres e possivelmente seu alvo mais importante. O DNA mitocondrial é particularmente vulnerável ao dano oxidativo, com sua taxa de mutação superior a 10 vezes a do DNA nuclear. O DNA mitocondrial mutante pode codificar citocromos anormais implicando em modificações na cadeia transportadora de elétrons levando a um aumento na produção de radical superóxido em um ciclo vicioso que progressivamente aumenta o estresse oxidativo (DROGE e SCHIPPER, 2007).

O comprometimento do aprendizado e da memória uma das consequências mais óbvias do envelhecimento com consequências diretas para as atividades da vida diária está correlacionado ao decréscimo de antioxidantes no plasma e no cérebro (BERR C, 2000), justificando o fato do envelhecimento em humanos e em roedores geralmente ser acompanhado por um declínio em vários processos que envolvem essas funções (FRICK et al., 2003).

O estresse oxidativo tem implicação direta nas alterações encefálicas durante o processo de envelhecimento (POON, VAISHNAV ET AL. 2006), e este ocorre quando há uma produção de oxidantes maior do que a reparação antioxidante, gerando um aumento na quantidade de radicais livres, tornando o encéfalo seu principal alvo devido ao predomínio do

metabolismo aeróbico (LIDDELL 2010). A consequência do acúmulo constante desses radicais livres é tornar o DNA mitocondrial relativamente vulnerável ao dano oxidativo (KUJOTH, HIONA ET AL. 2005; DROGE AND SCHIPPER 2007) e essa cascata de eventos afeta o tecido cerebral de forma variável. Seguem-se mudanças estruturais e funcionais (PETIT-TABOUE et al., 1998, MORA, SEGOVIA e DEL ARCO, 2007, DESGRANGES, KALPOUZOS e EUSTACHE, 2008), que tem sido estudadas de forma sistemática há algumas décadas. Durante o envelhecimento, ocorrem diversas alterações macro e microscópicas no encéfalo que incluem a redução do peso e volume do órgão, redução de giros e alargamento de sulcos, aumento do volume ventricular, redução das dimensões neuronais, da arborização dendrítica, do número de espinhas dendríticas e de sinapses, acúmulo de lipofucsina nos neurônios e células gliais e aparecimento de mudanças microscópicas características, associadas à doenças crônico-neurodegenerativas, como placas senis e emaranhados neurofibrilares (BURKE e BARNES, 2006, DICKSTEIN et al., 2007, SWERDLOW, 2007, MURALI, PANNEERSELVAM e PANNEERSELVAM, 2008, SULZER et al., 2008).

Dados obtidos por vários autores apontam para diferentes tipos de disfunções sinápticas causadas pelo envelhecimento, entre essas disfunções destacam-se as alterações na neurotransmissão e em componentes de sistemas de tradução de sinais, como por exemplo o de cinases protéicas (SMITH et al., 2007, ETO et al., 2008, YAMAZAKI e SAITOE, 2008). Vários sistemas de neurotransmissores são afetados pelo envelhecimento como, por exemplo, o serotoninérgico, glutamatérgico, aminérgico e colinérgico (MCGEER, 1984, FRANCIS et al., 1993, OSSOWSKA, 1993, ROTH e JOSEPH, 1994, ROTH, 1995, BARILI et al., 1998, STEMMELIN et al., 2000). Sabe-se que existe uma interação entre os sistemas colinérgico e serotoninérgico, indicando uma modulação conjunta em processos de aprendizado e memória sendo ambos comprometidos durante o envelhecimento (RICHTER-LEVIN e SEGAL, 1993, 1996, BAXTER et al., 1999, ARAUJO, STUDZINSKI e MILGRAM, 2005).

Além do declínio cognitivo associado ou não as doenças neurodegenerativas, durante o envelhecimento (CHARCHAT-FICHMAN et al., 2005) observam-se alterações nos sistemas sensoriomotores em humanos e em modelos experimentais. Isso está aparente na perda paulatina da capacidade motora, com redução da destreza de reflexos e perda de coordenação, sinais do comprometimento dos sistemas sensoriais e motores centrais além dos déficits de unidade motora e neurônio motor inferior que afetam as fibras musculares inervadas por esses neurônios, causando a redução de massa e da força muscular agravadas

pelo envelhecimento (TOMLINSON e IRVING, 1977, MITTAL e LOGMANI, 1987, LEXELL, 1997).

1.3 MEMÓRIA, ENVELHECIMENTO E DISFUNÇÃO HIPOCAMPAL

A memória pode ser definida de uma forma mais abrangente como a função do sistema nervoso que retém informações que podem ser recuperadas posteriormente. Assim a memorização engloba três mecanismos básicos: registro, armazenamento e resgate de informações (MACHADO et al., 2007).

Para compreender o funcionamento da memória é útil rever sua classificação. Podem ser classificadas em função do intervalo de tempo entre o evento e sua evocação em memória de curto e de longo prazo. A memória de curto prazo divide-se em memória imediata e memória operacional e a memória de longo prazo é dividida em: implícita ou explícita. A memória de procedimento, isto é, a capacidade de realizar uma sequência de ações na ausência de controle consciente, também faz parte da memória implícita, assim como o fenômeno de pré-ativação e condicionamento. A memória explícita, por sua vez, classifica-se em: memória semântica e memória episódica (MACHADO et al., 2007).

A memória imediata corresponde à habilidade de manter pouca informação consciente durante um período de tempo curto. Essa forma de memória mostra-se pouco influenciada pelo processo de envelhecimento, de maneira que a retenção de informação imediata é similar quando se comparam os desempenhos de jovens e idosos. Diferente da memória imediata, que envolve somente o registro breve e a evocação de informações, a memória operacional (*working memory*) engloba, além do armazenamento, a manipulação de informações. Um exemplo desse tipo de operação é a realização de cálculos mentalmente. Com o aumento da idade, observa-se uma dificuldade na capacidade de manipulação de informações resultando em alterações na memória operacional (BERTOLUCCI, 2000).

Na memória de longo prazo são observadas diferenças maiores quando da comparação do desempenho entre jovens e idosos. Os déficits podem ser percebidos em três diferentes estágios: na codificação de informações; na retenção, que implica a manutenção da memória ao longo do tempo; e na recuperação, que corresponde à evocação do que foi armazenado (BRUCKI e ROCHA, 2004).

A memória explícita ou declarativa é formada pela memorização consciente e é utilizada para armazenar e recordar fatos e eventos, de forma que as lembranças possam ser

declaradas verbalmente ou no formato de imagens. Essa memória é comumente afetada no processo de envelhecimento normal. Em associação é frequente o comprometimento das funções cognitivas dependentes do córtex pré-frontal gerando déficits de funções executivas e redução da memória de trabalho (KRAMER et al., 1999, KRAMER et al., 2007).

A memória semântica está relacionada ao conhecimento de fatos sem relação com a temporalidade, de forma que o indivíduo não é capaz de identificar quando adquiriu determinado aprendizado. Pode ser entendida como uma memória de conceitos, que é formada ao longo da vida. Não apresenta alterações significativas com a idade, sendo afetada em casos de demências somente em fases mais avançadas. Em contrapartida, a memória episódica é temporalmente relacionada, sendo uma memória de acontecimentos e pode ser considerada como autobiográfica, mas não engloba somente os eventos pessoais. Esse tipo de memória apresenta declínio com o envelhecimento e, na demência as alterações são percebidas nos estágios iniciais (BERTOLUCCI, 2000).

1.3.1 *Contribuição Regional do Hipocampo para a formação da Memória Episódica.*

A Figura 1 é um diagrama esquemático simplificado da conectividade hipocampal e parahipocampal posicionando cada região, indicando suas aferências e eferências e a posição relativa de cada qual no contexto da alça fechada: córtex entorrinal – hipocampo – córtex entorrinal. Esse conjunto de regiões garante a formação da memória episódica para a qual cada uma das áreas envolvidas contribui de forma particular. A integridade desses circuitos é essencial para formação de memória episódica e o primeiro requisito que precisa ser garantido é de que após terem sido formadas, as novas memórias não devem se confundir com antigas (LANGSTON et al., 2010). Para isso é necessário remover ambigüidades acentuando as diferenças entre experiências semelhantes e para isso o giro denteado é essencial. Essa operação denominada de separação de padrões é atribuída ao giro denteado e parece estar relacionada ao fato de que ele parece conter 10 vezes mais células granulares do que o número de células corticais que para ele projetam garantindo que a informação recebida sofrerá divergência. Coerentemente a lesão do giro denteado reduz a capacidade de distinguir objetos similares e a análise do padrão de ativação de genes de expressão imediata permitiu descobrir que o giro denteado é capaz de distinguir situações similares com alta eficiência (SCHMIDT, MARRONE e MARKUS, 2012).

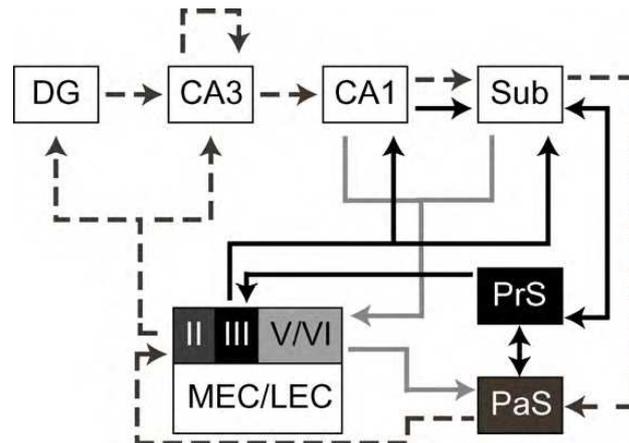


Figura 1. Diagrama esquemático simplificado dos circuitos hipocampais e parahipocampais. As setas indicam a direção do fluxo da informação. As linhas pretas contínuas indicam interações predominantes com a camada III do córtex entorrinal (EC), linhas tracejadas indicam interações predominantes com a camada II do EC e a linhas cinzas indicam interações com as camadas V e VI. DG = Giro Denteado; CA3 = Corno de Amon III; CA1 = Corno de Amon I; Sub = Subiculum; MEC = Córtex Entorrinal Medial; LEC = Córtex Entorrinal Lateral; II, III; V/VI = Camadas II, III, V/VI do Córtex Entorrinal; PrS = Pré-Subiculum; PaS = Para-Subiculum (Adaptado de (LANGSTON et al., 2010)).

Na sequência a informação que deixou o giro denteado através das fibras musgosas do giro denteado é transferida a CA3 que é subdividido após Lorente de Nó em três subcampos CA3a, CA3b e CA3c (LORENTE DE NÓ, 1934). Os dois primeiros campos são em geral tratados como uma unidade CA3a,b que parece estar relacionada com a codificação de memória espacial de curto prazo (segundos a minutos), incluindo aí a detecção de novidade e recuperação de informação espacial memorizada a partir de uma única exposição e que utiliza pistas ambientais como referência. Da mesma forma CA3a,b parece estar envolvido em recuperação de informação memorizada a partir de múltiplas tentativas de aprendizado envolvendo representações relacionais. Finalmente CA3a,b parece envolvido na recuperação de memória de curto prazo relacionadas ao completamento de padrões. Esse fenômeno (o completamento de padrões) revela o papel que o hipocampo desempenha na codificação rápida de um conjunto de estímulos durante um único evento e na sua posterior recuperação (memória episódica). Essa associação entre os estímulos permite subsequente recuperação do evento como um todo ainda que ao sujeito se tenha apresentado apenas uma parte do estímulo original. Esse completamento de padrões que se constitui em uma das contribuições mais importantes de CA3 parece estar associado a sua rica rede de co-laterais recorrentes. Finalmente CA3c parece contribuir para geração de padrões de separação relacionados ao

reconhecimento da geometria ambiental (KESNER, LEE e GILBERT, 2004, KESNER, 2007).

Assim, CA3 e o giro denteado podem, portanto ser caracterizados como possuindo dois papéis contrastantes no processamento mnemônico que parece refletir de perto o padrão de seus circuitos, onde em CA3 se identifica uma rede autoassociativa que se presta ao papel de comparar o estímulo que chega do córtex entorrinal com experiências familiares prévias, enquanto que o giro denteado estaria anatomicamente organizado para promover o reconhecimento do estímulo novo a partir dos circuitos que viabilizam a separação de padrões independentemente da modalidade da informação que o alcança em função do enorme número de células que dispõe se comparado ao córtex entorrinal ou CA3 (LANGSTON et al., 2010).

CA1 por sua vez parece ter sua contribuição mais difícil de ser definida em função do fato de que representa a via final comum do hipocampo a partir de onde os eferentes hipocampais partem em direção a outras regiões do sistema límbico. De qualquer modo ele tem sido proposto como um detector de coincidências uma vez que recebe não somente os aferentes diretos do córtex entorrinal, mas também indiretos a partir de CA3. Dessa forma tem sido sugerido que realiza comparação entre os eventos em curso provenientes do córtex entorrinal e aqueles estocados a partir da informação proveniente de CA3 (LISMAN e OTMAKHOVA, 2001). Uma outra alternativa é de que CA1 adiciona a escala temporal aos eventos de modo que seja possível detectar a separação entre estímulos que não são contíguos construindo possíveis associações entre eles (ROLLS e KESNER, 2006).

1.3.2 Envelhecimento, Déficits de Memória e Alterações Regionais Hipocampais

Uma vez classificado os tipos de memória e as relações da memória episódica com as diferentes regiões do hipocampo é útil para os objetivos do presente trabalho rever as relações entre os déficits de memória e as alterações regionais da formação hipocampal durante o envelhecimento.

Os três principais campos hipocampais CA1, CA2, CA3 e o giro denteado apresentam diferenças claras no que concerne as suas aferências, eferências, propriedades biofísicas e moleculares. As diferenças anatômicas incluem tipos e dimensões celulares distintas que dão origem a diferentes padrões de projeções (AMARAL e LAVENEX, 2007, AMARAL, SCHARFMAN e LAVENEX, 2007).

O giro denteado consiste de três camadas: a de células granulares, a camada molecular e a camada polimórfica. As células granulares representam o seu principal tipo celular que preserva capacidade proliferativa mesmo na idade adulta. O giro denteado recebe aferências do córtex entorrinal através da via perfurante. Sua projeção extrínseca mais importante alcança CA3 através das fibras musgosas. Por outro lado os campos de CA1, CA2 e CA3 apresentam laminação típica com quatro camadas. A camada de células piramidais composta por uma lâmina espessa de corpos celulares piramidais, e os strata oriens, lucidum, radiatum e lacunosum molecular. As células piramidais são as células de projeção mais numerosas e importantes em CA1, CA2 e CA3. Devido a reduzida dimensão de CA2, esse campo é em geral descrito em associação à CA1. O campo CA3 é composto por células piramidais grandes enquanto que os neurônios piramidais de CA1 são menores. CA3 recebe aferências do giro denteado via fibras musgosas enquanto que CA1 não recebe essas projeções. Além dessa distinção CA3 é caracterizado por um complexo de projeções que se dirigem à camada polimórfica do giro denteado mas que também dão origem a sinapses recorrentes dentro de CA3, e através da via comissural alcançam os campos hipocampais contra-laterais. A projeção extrínseca mais importante de CA3 se dirige a CA1 através das fibras colaterais de Schaffer.

Finalmente CA1 projeta para a área entorrinal fechando o circuito: córtex entorrinal-giro denteado-CA3-CA1-córtex entorrinal (WITTER, 2007). Os neurônios piramidais de CA1 também projetam para o subículo e todas essas projeções são moduladas por interneurônios excitatórios e inibitórios localizados em cada região. Esse padrão único de conexões que caracteriza cada região hipocampal dá origem às propriedades biofísicas e eletrofisiológicas regionais (BURGER, 2010) e o melhor exemplo disso é a expressão diferencial da potenciação de longo prazo em campos hipocampais distintos pelo desligamento seletivo de genes que são normalmente expressos em todas as regiões hipocampais, afetando seletivamente a plasticidade sináptica de cada campo (CHEN et al., 2009). De modo similar o envelhecimento afeta esses circuitos e suas funções de forma diferente nas diferentes regiões induzindo alterações eletrofisiológicas detectáveis consideradas mais adiante. As diferenças moleculares entre os três campos hipocampais estão relacionadas à diferentes expressões gênicas e proteínas relacionadas com mecanismos de transcrição e expressão que são particulares de cada região (LEIN, ZHAO e GAGE, 2004, TORRES-MUNOZ et al., 2004, GREENE, BORGES e DINGLEDINE, 2009). Assim, durante o envelhecimento as conexões anatômicas e as propriedades moleculares que caracterizam cada região do hipocampo são alteradas de modo particular conferindo vulnerabilidades distintas a cada um

dos campos hipocampais (BURGER, 2010). Tais mudanças que incluem perda de 30% das sinapses na via temporoamônica no stratum radiatum de CA1 (NICHOLSON et al., 2004) e redução dos inputs da via perfurante para o giro denteado (ROGALSKI et al., 2009) são observadas nos animais velhos com declínio cognitivo, mas não nos animais senis cognitivamente intactos.

Historicamente havia sido descrito que uma das alterações mais importantes durante o envelhecimento era a perda neuronal (BALL, 1977). Entretanto essa perda generalizada de neurônios não foi comprovada quando se empregou técnicas estereológicas para estimar esses números (WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991, MAYHEW e GUNDERSEN, 1996). Em vez disso foi demonstrado que as características morfológicas do hipocampo velho incluíam mudança nas espinhas sinápticas assim como nas taxas de neurogênese e que essas alterações afetavam de forma distinta os diversos campos hipocampais (CURCIO e HINDS, 1983, MARKHAM et al., 2005).

Assim, parece que as perdas de memória relacionadas ao envelhecimento ocorrem na ausência de mudanças estruturais significativas e que a mudança na expressão de um ou mais genes pode contribuir para alterações na expressão de canais iônicos, ou na morfologia das espinhas dendríticas que em última instância podem afetar a plasticidade sináptica e o comportamento relacionado. Como essas alterações se expressam de diferentes maneiras nos diferentes campos hipocampais é possível prever que a susceptibilidade às alterações induzidas pelo envelhecimento sejam distintas nos diferentes campos hipocampais. Coerente com isso é o fato de que há perda sináptica significativa na região subicular (UEMURA, 1985) mas não nas demais regiões (CURCIO e HINDS, 1983, MARKHAM et al., 2005). Realmente enquanto não há perda no número total de sinapses em CA1, foi demonstrado um decréscimo na região de projeção da via perfurante em animais velhos com declínio cognitivo (NICHOLSON et al., 2004).

Na região de CA3 o envelhecimento também não induz perda sináptica significativa (POE et al., 2001). De fato o declínio cognitivo nos animais velhos que apresentam declínio cognitivo tem sido associado com um decréscimo nos elementos pré-sinápticos em CA3 tal como revelado pela imunomarcção de vesículas sinápticas com anticorpo dirigido contra a sinaptofisina (SMITH et al., 2000). Da mesma forma um decréscimo das aferências da via perfurante para o giro denteado tem sido descrito em animais envelhecidos (ROGALSKI et al., 2009) em associação com o declínio cognitivo senil (SMITH et al., 2000). Do ponto de vista funcional a plasticidade sináptica alterada parece ser o principal componente do envelhecimento. Por exemplo ainda que permaneça matéria de discussão os déficits

cognitivos associados a animais velhos parecem co-existir com uma diminuição no limiar para indução da depressão de longo prazo na via de projeção de CA3 para CA1 (FOSTER e KUMAR, 2007). Do mesmo modo foi descrito um decréscimo na potenciação sináptica de longo prazo em CA1 de animais velhos com declínio cognitivo mas não naqueles cognitivamente normais (TOMBAUGH et al., 2002). Assim, de um modo geral a mudança na plasticidade sináptica alterando as propriedades da potenciação e depressão de longo prazos parece distinguir animais velhos cognitivamente normais daqueles com declínio cognitivo instalado (BURGER, 2010).

Tomados em conjunto, os dados revelam que o hipocampo em processo de envelhecimento não sofre significativa perda de neurônios ou alterações em sua morfologia sofrendo entretanto regulação genética diferencial em distintas regiões que parecem induzir alterações funcionais modificando canais iônicos, receptores, proteínas sinápticas, e proteínas estruturais que por sua vez podem alterar espinhas dendríticas e suas sinapses.

Por outro lado permanecem por ser investigado com o igual vigor e detalhe o impacto do envelhecimento sobre as células da glia e sua possível contribuição para o declínio cognitivo hipocampo dependente, sendo esse o foco do presente trabalho.

Como este esforço inicial é dedicado a avaliar as alterações induzidas pelo envelhecimento sobre os astrócitos hipocampais, as células gliais mais numerosas dessa região é útil rever sua contribuição funcional.

1.4 ASTRÓCITOS HIPOCAMPAIS, PLASTICIDADE SINÁPTICA, ENVELHECIMENTO E DECLÍNIO COGNITIVO

Astrócitos são células gliais especializadas, presentes em todo o SNC, exercendo várias funções essenciais complexas no SNC saudável. No SNC lesionado, atuam através de resposta conhecida como astrogliose reativa, patognomônica em lesões estruturais (SOFRONIEW e VINTERS, 2010). Os astrócitos podem ser divididos em dois subgrupos: astrócitos protoplasmáticos e fibrosos. Os astrócitos protoplasmáticos estão presentes em toda a substância cinzenta, possuem vários ramos proximais, que originam muitos processos ramificados distribuídos uniformemente em forma globóide. O tipo fibroso é encontrado na substância branca e possui muitos processos longos com aparência de fibra. Ambos os tipos contatam vasos sanguíneos e formam junções em fenda (do inglês gap junctions) entre processos distais de astrócitos vizinhos. Enquanto os prolongamentos do subtipo

protoplasmático envolvem sinapses, os do tipo fibroso contatam nodos de Ranvier (SOFRONIEW e VINTERS, 2010).

Uma das funções astrocitárias conhecidas há mais tempo é o suprimento de substratos de energia para neurônios; para isso, os astrócitos ocupam posições estratégicas entre os neurônios e capilares sanguíneos, tendo papel fundamental na relação entre atividade neuronal e consumo cerebral de glicose (MAGISTRETTI, 2006). Atuam no fornecimento de substratos metabólicos para neurônios glutamatérgicos quando a atividade neuronal indica aumento na demanda energética; tal mecanismo envolve a recaptação de glutamato acoplado ao Na^+ pelos astrócitos, ativação da ATPase Na^+/K^+ , com consequente captação de glicose do sangue e glicólise, resultando na liberação astrocitária de lactato, suprimindo a demanda energética neuronal (MAGISTRETTI, 2006).

Na década passada houve uma explosão nos programas de investigação dedicados à compreensão do papel das interações neuroastrocitárias no controle da função cerebral. Mais especificamente, reconheceu-se um novo elemento nas sinapses que passou a ser referida como estrutura sináptica tripartite consistindo dos elementos pré e pós-sinápticos associados aos processos astrocíticos. Reconheceu-se de forma definitiva que os astrócitos respondiam à atividade neural ativando receptores metabotrópicos liberando gliotransmissores, como o trifosfato de adenosina (ATP), D-serina e glutamato, que por sua vez agem sobre os neurônios (HALASSA e HAYDON, 2010).

Mais recentemente emergiu o conceito de redes astrogliais para comunicação a longa distância associando os astrócitos à redes de conexão organizadas que permitem a troca de informações reguladas por sinais intra e extracelulares, através de canais que atravessam junções em fenda (do inglês “gap junctions”). Essa comunicação a longa distância entre células da glia modulando a atividade sináptica neuronal e contribuindo diretamente para a plasticidade sináptica adicionou nova dimensão de complexidade a análise das funções cerebrais (GIAUME et al., 2010). Como referido anteriormente, os astrócitos participam do controle da excitabilidade neuronal e transmissão sináptica através da liberação de moléculas neuroativas, como glutamato, a D-serina e o ATP (HALASSA et al., 2007, LEE e HAYDON, 2007). Além disso, realizam recaptação do glutamato, regulando os níveis do neurotransmissor (LEE e HAYDON, 2007). Além disso, os astrócitos também secretam fatores solúveis como trombospondinas e colesterol, que influenciam a formação das espinhas dendríticas e maturação sináptica (ULLIAN, CHRISTOPHERSON e BARRES, 2004, CHRISTOPHERSON et al., 2005). Importante lembrar do ponto de vista quantitativo que no

hipocampo, mais de 50% das sinapses excitatórias são associadas, em graus variados, com processos astrocitários; um único astrócito pode estar relacionado a aproximadamente 100.000 contatos sinápticos, sugerindo sua participação na dinâmica das sinapses e das redes neuronais (VENTURA e HARRIS, 1999, BUSHONG et al., 2002).

Ao investigar essa dinâmica envolvendo os processos astrocíticos e espinhas dendríticas no hipocampo, observou-se que em escala de minutos, ocorre extensão e retração de processos astrocitários próximo às espinhas dendríticas, confirmando-se que as membranas astrocitárias estão associadas intimamente com estas, com os quais parecem entrar em contato; ver Figuras 2 e 3 (HABER, ZHOU e MURAI, 2006).

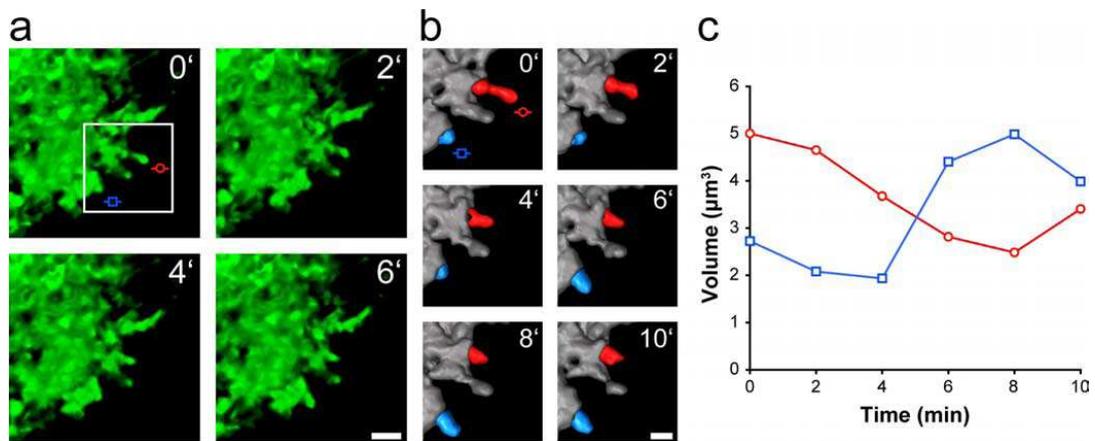


Figura 2. Astrócitos promovendo rápida modificação estrutural. a) exemplo de retração e extensão de um processo astrocítico em escala temporal de 10 minutos. b) reconstruções tridimensionais da área circunscrita pelo retângulo branco realizadas a cada 2 minutos por um período de 10 minutos. c) medidas do volume durante a retração (círculos vermelhos) e durante a extensão (quadrados azuis) dos processos em função do tempo (HABER, ZHOU e MURAI, 2006).

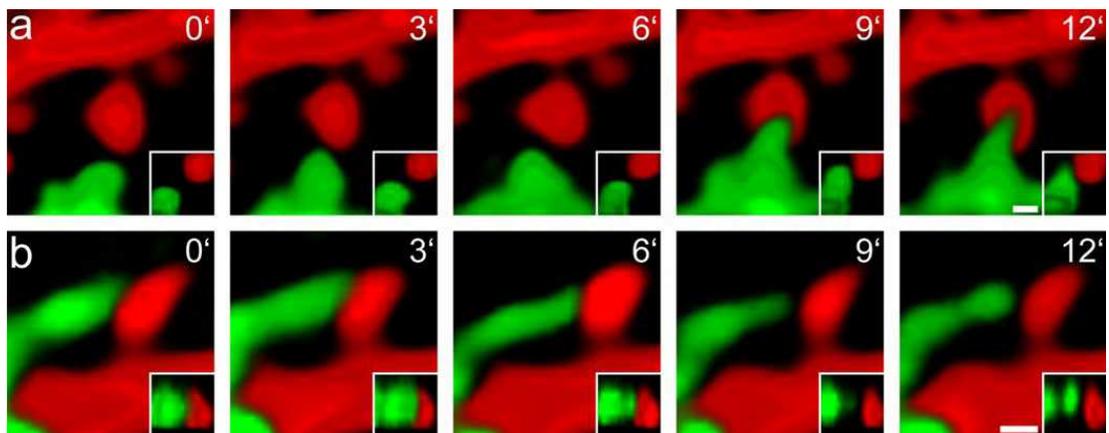


Figura 3. Interações entre astrócitos e espinhas ilustrando a dinâmica desse processo. a) exemplo de um processo astrocítico (verde) extendendo-se na direção de uma espinha dendrítica (vermelha). b) exemplo de uma retração subsequente a perda de uma interação entre a espinha dendrítica (vermelha) e o processo astrocítico em retração (vermelha). Os inserts no canto inferior direito de cada foto ilustra a interação em ângulo de 90° graus em relação a vista anterior (HABER, ZHOU e MURAI, 2006).

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

Em uma única frase, os astrócitos permitem que os neurônios funcionem fornecendo energia e substratos para a neurotransmissão contribuindo diretamente para a formação e modulação das sinapses através de mecanismo bidirecional de comunicação com os neurônios (ALLEN e BARRES, 2009).

Conversamente os astrócitos parecem se alterar com o envelhecimento em forma, número, distribuição laminar (DINIZ, 2010, ALMEIDA et al., 2011, DINIZ et al., 2011) e perfil imunológico (GODBOUT e JOHNSON, 2009, JINNO, 2011, SALMINEN et al., 2011) e essas alterações parecem estar relacionadas com o declínio cognitivo associado à neuroinflamação que acompanha a senescência (ALBAYRAM et al., 2011).

Tendo em conta de que já havia sido descrita a participação dos astrócitos na potenciação de longo prazo na via perfurante (ALLEN e BARRES, 2009, BEN MENACHEM-ZIDON et al., 2011) investigamos em trabalho prévio, possíveis relações entre o declínio cognitivo associado ao envelhecimento e mudanças na distribuição laminar (DINIZ et al., 2010) e na morfologia (DINIZ et al., 2011) dos astrócitos do giro denteado. Para isso, comparamos animais que foram mantidos em diferentes ambientes (enriquecido ou empobrecido) desde o 21º dia pós-natal até o sacrifício. Tomados em conjunto nossos resultados demonstraram que as diferentes camadas do giro denteado são afetadas diferencialmente pelo envelhecimento e pelo ambiente e que a estimulação sensoriomotora e cognitiva mais intensa do ambiente enriquecido parece proteger os animais que nele crescem do declínio cognitivo associado ao envelhecimento. Da mesma forma, outros resultados de nosso laboratório demonstraram que o envelhecimento afeta os astrócitos de CA1 reduzindo o número deles no stratum lacunosum molecular, principal alvo das projeções temporoamônicas para CA1 (VAN GROEN, MIETTINEN e KADISH, 2003) e que isso coincide com o comprometimento da memória espacial revelado pelo teste do labirinto

aquático de Morris (ALMEIDA et al., 2011). Tomados em conjunto esses trabalhos demonstraram que o envelhecimento altera os fenótipos morfológicos e o número dos astrócitos de CA1 e do giro denteado de forma distinta nas diferentes camadas.

No presente trabalho estendemos as análises prévias à região de CA3 completando os ensaios estereológicos dedicados a investigar o impacto do envelhecimento sobre a distribuição laminar dos astrócitos do hipocampo. Mais especificamente, analisamos se é possível detectar qualquer mudança no número desses astrócitos e em caso positivo, em quais camadas de CA3 as alterações se instalam. Escolhemos a proteína ácida fibrilar (GFAP) como um marcador de astrócitos, em detrimento da proteína glutamina sintetase ou S100 beta porque a GFAP parece ser mais sensível e mais específica quando relacionado aos déficits de aprendizagem e memória (WU, ZHANG e YEW, 2005).

Para quantificar o número de astrócitos utilizamos o fracionador óptico, um método estereológico sem viés baseado em amostragem aleatória e sistemática dos objetos de interesse nas áreas de interesse. Nossa escolha pelo fracionador óptico se deu porque é o que tem sido usado com mais frequência, combinando as propriedades da sonda tri-dimensional para contagem dos elementos de interesse (o dissector óptico) com o sistema de amostragem sistemática e aleatória (o fracionador) removendo a necessidade de pressuposições acerca dos objetos de interesse (WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991). A combinação do dissector óptico com o fracionador de amostras, conhecida na literatura como Fracionador Óptico (WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991), tem numerosas vantagens práticas; sendo a principal, o fato de não ser afetado pela retração do tecido e não requerer definições rigorosas de fronteiras estruturais que podem ser feitas em objetivas de baixo aumento.

O fracionador óptico envolve a contagem de objetos, utilizando sondas de dissectores ópticos, em uma amostra sistemática uniforme que constitui uma fração conhecida do volume da região em análise. Na prática, isso é feito através de amostragem sistemática de uma fração conhecida da espessura da secção, “TSF” (iniciais de “*thickness sample fraction*”), da área seccional “ASF” (iniciais de “*area sample fraction*”) e do número de secções que incluem a região de interesse, “SSF” (iniciais de “*section sample fraction*”) (WEST, SLOMIANKA e GUNDERSEN, 1991).

Essa escolha é feita para contornar a impossibilidade de contar todas as células dentro da região de interesse e obter estimativas próximas dos valores reais. Para isso, é necessário a utilização de coleta sistemática e aleatória de dados, incluindo a terceira dimensão (SCHMITZ e HOF, 2005).

Além dos estudos estereológicos, analisamos no presente trabalho os efeitos do envelhecimento sobre o possível declínio cognitivo associado ao envelhecimento documentado através de testes de memória de reconhecimento de objeto nos quais a integridade da formação hipocampal é essencial para o bom desempenho. O pressuposto é de que a formação hipocampal dos animais com desempenho comprometido estaria alterada enquanto que a dos animais cognitivamente íntegros, não. Escolhemos o paradigma de reconhecimento de objetos baseado na tendência natural de roedores de explorar objetos novos (DIX e AGGLETON, 1999, DERE, HUSTON e DE SOUZA SILVA, 2005b, a, DERE et al., 2006). Esses testes seguiram o modelo de teste isolado ou integrado de memória semelhante a episódica descrito anteriormente (DERE, HUSTON e DE SOUZA SILVA, 2007). As tarefas selecionadas envolvem o reconhecimento da forma, localização espacial e momento em que objetos selecionados são apresentados aos animais comparando-se o desempenho de animais jovens e idosos. Essas tarefas representam respostas a três perguntas acerca dos objetos selecionados: o quê ? onde? e quando? Que do ponto de vista experimental são medidas de forma indireta computando-se o tempo dedicado por cada animal à exploração de cada objeto em valores percentuais do tempo total de exploração.

1.5. O MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Quando da investigação de processos fisiológicos e patológicos que afetam de forma comum o homem e os modelos experimentais tais como o envelhecimento, cuidado especial deve ser dedicado a escolha de qual modelo empregar. Roedores têm sido escolhas valiosas para o estudo do envelhecimento particularmente porque partilham com os humanos uma série de similaridades no nível celular e sistêmico nesse período da vida (NADON, 2006). De fato a neurobiologia do envelhecimento tem sido uma área onde os roedores adotados como modelo experimental, têm dado contribuição significativa para compreensão dos declínios cognitivos subjacentes, tendo sido construídos importantes conexões entre achados comportamentais e estudos cognitivos em humanos idosos (BONTEMPI et al., 2001, ERICKSON e BARNES, 2003). Ainda assim tem sido constatadas eventuais diferenças entre os modelos murino e primata que precisam ser consideradas para evitar extrapolações indevidas, e.g a expressão das monoaminas que embora sejam qualitativamente semelhantes em camundongos e primatas revelam pelo menos uma ordem de magnitude na síntese das isoformas A e B quando se comparam espécies de meia idade (IRWIN et al., 1997). Com tais

limites claros, o presente trabalho adotou como modelo experimental fêmeas adultas da variedade C57Bl6 com seis e 20 meses de idade. Essa variedade de camundongo tem sido largamente empregada em numerosos estudos acerca da neurobiologia do envelhecimento e.g. (FELZIEN et al., 2001, MANCZAK et al., 2005, TROEN et al., 2008) e em particular, tem sido a variedade eleita para estudos recentes dedicados a investigar as diferenças regionais e laminares dos perfis antigênicos dos astrócitos hipocâmpais durante o envelhecimento (JINNO et al., 2007, JINNO, 2011). Finalmente, foi o modelo utilizado em estudos estereológicos dedicados a investigar diferenças no número de astrócitos hipocâmpais entre machos e fêmeas senis (MOUTON et al., 2002, LEI et al., 2003) permitindo comparações diretas com os números encontrados nesta dissertação.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Investigar em modelo murino, a ocorrência de possíveis relações entre o declínio cognitivo associado ao envelhecimento e a estimativa do número e a distribuição laminar de astrócitos em CA3.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Comparar as performances nos testes de memória espacial e de identidade de objetos entre os dois grupos.

2.2.2 Estimar o número total e a distribuição laminar de astrócitos na região de CA3 do hipocampo de camundongos da linhagem C57/Bl6 de 6 e 20 meses.

2.2.3 Testar a hipótese de possíveis relações entre declínio cognitivo associado ao envelhecimento, o número e a distribuição laminar de astrócitos em CA3.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho, todos os procedimentos foram realizados de acordo com o “Principles of Laboratory Animal Care” e aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto/UFPA (ver anexo 1).

Os camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6, fêmeas, foram obtidos do Instituto Evandro Chagas (IEC) e os experimentos realizados no Laboratório de Neurodegeneração e Infecção, no Hospital Universitário João de Barros Barreto.

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Para formação dos grupos experimentais foram usados animais de 6 meses de idade e 20 meses, sendo divididos em dois grupos, o grupo jovem (J) composto por sete animais (n=7) e grupo senil (S) constituído por cinco animais (n=5).

Cada grupo de animais foi mantido em gaiola de cloreto de polivinil (PVC) de dimensões (32 x 39 x 16,5cm), em uma sala com controle de temperatura (25°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. As gaiolas eram forradas com palha de arroz autoclavada, trocada uma vez por semana. Comida e água foram oferecidas em regime *ad libitum*.

3.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais aos quais os grupos foram submetidos, eram compostos por 5 dias de fase de habituação e 4 dias para testes isolados de memória de objeto, memória de lugar, tempo e de memória semelhante a episódica.

Segundo Aggleton (1985) roedores tendem a explorar objetos que são novidade em detrimento aos que já são familiares. Como os testes utilizam o comportamento exploratório natural dos camundongos e o interesse pela novidade como elemento motivador, o teste de memória para reconhecimento de objeto, de lugar e de tempo podem ser classificados como etológicos uma vez que são baseados em atividade voluntária de reconhecimento e exploração, independente da aplicação de recompensas ou punições motivacionais.

3.3 EQUIPAMENTO

Os testes foram realizados em uma caixa de compensado com paredes e assoalho forrado com fórmica branca, de 30x30x40cm. O piso foi dividido em 9 quadrados de 10x10 cm (Figura).

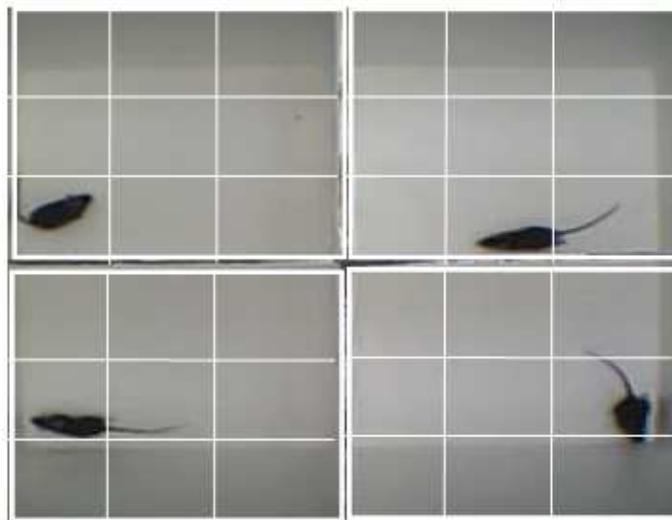


Figura 4. Aparato onde foram realizados os testes comportamentais. As linhas brancas que dividem a arena em quadrados são virtuais e definidas com auxílio do software Anymaze.

Instalada no teto, acima do aparato, havia uma câmera de vídeo conectada a um computador, para filmar e armazenar as sessões de teste para análise posterior. O aparelho era limpo com uma solução de etanol 75% imediatamente após cada sessão.

3.4 FASE DE HABITUAÇÃO

Nesta fase, os camundongos foram colocados no centro da caixa, livre de objetos, por 5 min, por três dias consecutivos. Nos dois dias seguintes, os animais fizeram três sessões diárias de 5 min de duração. Nos testes de memória de objeto, lugar e tempo os animais foram expostos a duas cópias de um objeto, alocadas nos cantos da arena. E no teste de memória similar à episódica os camundongo eram expostos a quatro objetos idênticos colocados nos cantos da arena. Os objetos utilizados nesta fase não foram reutilizados em nenhum dos testes a seguir.

3.5 FASE DE TESTES: MEMÓRIA DE OBJETO, MEMÓRIA DE LUGAR, DE TEMPO E SIMILAR À EPISÓDICA

Memória de objeto

1º Dia – Reconhecimento de Objeto (identidade): O teste de reconhecimento de objeto foi constituído de duas fases. Primeira fase – Exposição: os animais foram colocados no centro da caixa contendo um par de objetos idênticos dispostos em localizações fixas para todos os animais. Segunda fase – Teste: cinquenta minutos após a exposição aos objetos (familiares) cada animal foi recolocado na caixa contendo um dos objetos familiares e um objeto novo disposto no mesmo lugar onde estava a cópia do objeto familiar (referente à primeira fase), substituindo-o. Em cada fase, os camundongos tiveram cinco minutos para explorar livremente a caixa e os objetos contidos nela (Figura).

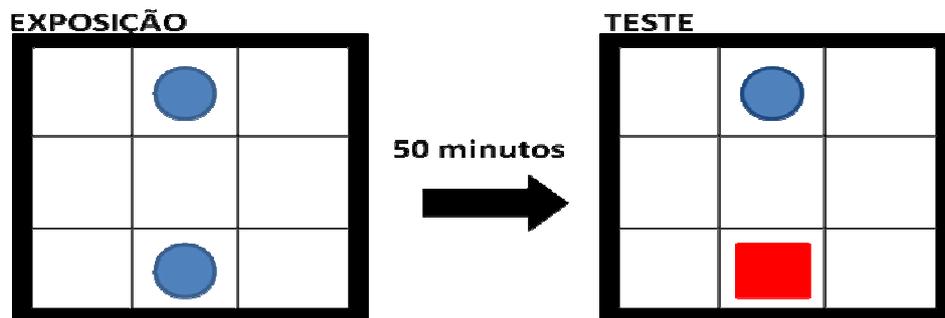


Figura 5 Representação esquemática do teste de reconhecimento do objeto (identidade). Modificado de(DERE, HUSTON e DE SOUZA SILVA, 2007).

Memória Espacial

2º Dia – Reconhecimento de lugar (espaço): O teste de reconhecimento de lugar foi também constituído de duas fases. Para este teste foi utilizado apenas um par de objetos idênticos dispostos em uma determinada posição na primeira fase (exposição). Os animais foram colocados no centro da caixa e receberam cinco minutos para exploração da caixa e dos objetos. Após cinquenta minutos de intervalo, os sujeitos foram recolocados na caixa com um dos objetos deslocado para uma nova posição na caixa (teste) e receberam novamente mais cinco minutos para exploração da caixa e objetos (Figura).

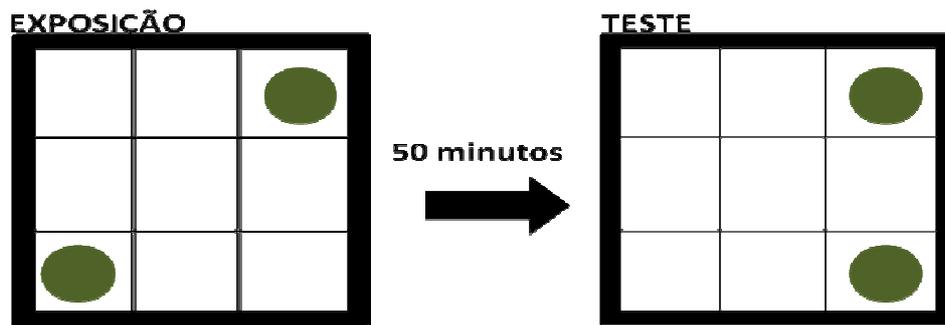


Figura 6. Representação esquemática do teste de reconhecimento de lugar (espaço). Modificado de (DERE, HUSTON e DE SOUZA SILVA, 2007).

Memória temporal

3º Dia – Reconhecimento temporal

O teste de reconhecimento temporal foi constituído de três fases, duas de exposição e uma de teste. Para este teste foi utilizado um par de objetos idênticos dispostos em uma determinada posição; os animais foram colocados no centro da caixa e receberam cinco minutos para exploração da caixa e dos objetos (primeira exposição). Após cinquenta minutos de intervalo os animais foram recolocados na caixa por mais cinco minutos com outro par de objetos idênticos entre si e diferentes dos da primeira exposição, mas colocados na mesma posição que os anteriores (segunda exposição). Após mais um intervalo de cinquenta minutos, os sujeitos foram testados na caixa por mais cinco minutos com um par de objetos, onde um deles era da primeira exposição e o outro da segunda, dispostos nas mesmas posições que os das vezes anteriores (terceira exposição) (Figura 7).

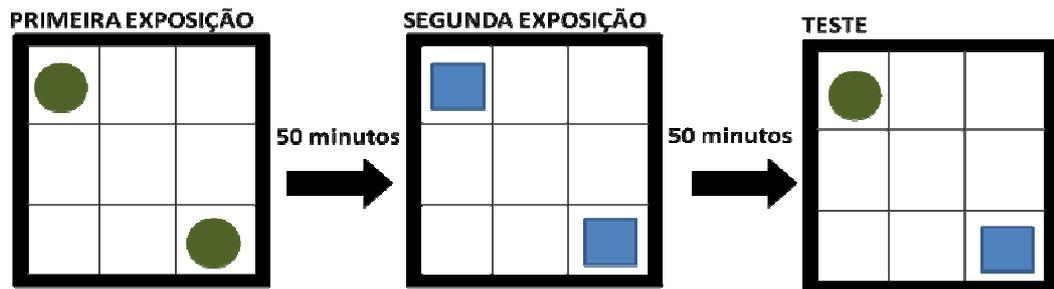


Figura 7. Representação esquemática do teste de reconhecimento temporal (quando). Modificado de (DERE, HUSTON e DE SOUZA SILVA, 2007).

Memória similar à episódica

4º Dia – Reconhecimento de objeto para testes integrados

O teste de memória similar à episódica consistiu de três sessões sendo: duas sessões de exposição aos objetos, de 5 minutos de duração com intervalos de 50 minutos entre elas e uma sessão de teste. A primeira sessão apresentou quatro objetos, idênticos entre si e em uma determinada localização espacial, que foram livremente explorados pelos animais durante cinco minutos. Terminada a primeira exposição cada animal foi devolvido a sua gaiola. Após cinquenta minutos de intervalo cada animal foi recolocado na caixa por mais cinco minutos com outros quatro objetos idênticos entre si e diferentes dos da primeira exposição, mas colocados em posições diferentes dos da primeira sessão (segunda exposição). Na sessão de teste (terceira exposição), dois objetos da primeira sessão (objetos antigos) e dois objetos da segunda sessão (objetos recentes) foram apresentados. Além disso, um objeto antigo foi deslocado para uma nova posição (objetos deslocado), porém os objetos da segunda sessão permaneciam nos lugares originais (objetos estacionários) (Figura 8).



Figura 8: Representação esquemática do teste de reconhecimento temporal (quando). Modificado de (DERE, HUSTON e DE SOUZA SILVA, 2007).

3.6 ANÁLISE DAS IMAGENS CAPTURADAS

O método de análise do comportamento exploratório nos teste de reconhecimento de identidade, localização espacial e temporal dos objetos foi realizado usando o sistema semi-automático de rastreamento (Any Maze, Stoelting[®]), que permitiu que fossem criadas zonas de exploração definidas pelo experimentador em torno dos objetos. Cada zona de exploração consistia de uma área de aproximadamente dois a três centímetros de raio em torno de cada objeto. O sistema de rastreamento conta com um algoritmo que distingue as partes anatômicas do animal referentes à cabeça, corpo e cauda. Com essas ferramentas foi possível quantificar o tempo em que a cabeça do animal permanecia dentro da zona de interesse em torno de cada objeto e tomar essa medida como variável que representou a atividade exploratória do objeto.

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

3.7 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Perfusão e corte

Ao final dos testes comportamentais os animais receberam uma dose letal de anestésico (avertina – 2,2,2 tribromoetanol, 0.08ml/5g de peso corpóreo) por via intraperitoneal. Após a parada respiratória fez-se uma ampla toracotomia, expondo o coração para canulação do ventrículo esquerdo e abertura do átrio direito através de uma pequena incisão para permitir a saída do sangue e dos líquidos injetados. Seguiu-se a perfusão da solução de cloreto de sódio a 0,9% (solução salina) heparinizada (heparina sódica, Liquemine, Roche, 0,01%) por 9 minutos. Em sucessão, injetou-se solução de paraformoldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4 (solução fixadora) por 30 minutos.

Ao término da perfusão, realizou-se a craniotomia. Após a dissecação de pele, tecido subcutâneo e músculos, a placa óssea cobrindo a superfície do cérebro foi retirada com a

ajuda de um alveolótomo. Em seguida, o cérebro foi removido, retirando-se a dura-máter e fazendo-se a secção dos nervos cranianos. Logo após a craniotomia, o encéfalo foi imerso em paraformoldeído 4% por duas horas.

O tecido foi seccionado no plano horizontal a 70µm de espessura com o auxílio de um vibrátomo (Microm) e as secções recolhidas em tampão fosfato 0,1M (pH 7.2-7.4) de forma seriada 1/6, respeitando-se a ordem anatômica.

3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

Séries anatômicas de secções dos cérebros dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais foram selecionadas para imunomarcção da proteína ácida fibrilar (GFAP) Chemicon (CA, USA). As secções foram reagidas seguindo protocolo descrito na tabela 1.

Tabela 3. Etapas para a realização da imunohistoquímica para detecção de GFAP.

<i>Soluções</i>	<i>Nº. De Lavagens</i>	<i>Tempo (min)</i>
Ácido Bórico 0,2M (70 °C pH 9)	1	60
PBST 5%	3	5
Metanol + Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) a 1%	1	10
PBS	3	2
MOM IgG Block (3 gotas de solução de trabalho + 10ml PBS)	1	60
PBS	3	2
Solução de trabalho (200µl de proteína concentrada + 10ml de PBS)	1	5
Anticorpo primário (GFAP 1:800)	1	72h
PBS	3	2
MOM IgG Biotinylded Anti-Mouse IgG (45µl de Biotinylated IgG em 10ml da solução de trabalho)	1	12h
PBS	3	2
ABC	1	60
PB 0,1M	3	2
GND	1	Até 30
PB 0,1M	3	2

Os cortes reagidos foram montados em lâminas gelatinizadas, secados à temperatura ambiente e posteriormente desidratados em álcool, em várias diluições (70, 80, 90 e 100%) para então serem diafanizados em xileno e cobertos com Entellan (Merck) e lamínula.

Contracoloração pela Técnica de Nissl

Essa coloração é feita para marcar os limites dos corpos celulares nas áreas de interesse previamente imunomarcadas para GFAP. Para isso, é usado o cresil violeta, que marca os núcleos celulares em violeta. As etapas dessa técnica de coloração são descritos na

Tabela 4. Contracoloração com violeta de cresila (Nissl).

<i>Soluções</i>	<i>Tempo (min)</i>
Etanol 100%	5
Etanol 100% + Clorofórmio (1:1)	10
Etanol 95%	3
Etanol 75%	3
Água Destilada	-
Cresil Violeta	1-4
Água Destilada	-
Etanol 80%	3
Etanol 90%	10
Etanol 100% + Clorofórmio (1:1)	3
Etanol 95% + Ácido Acético	3
Etanol 95%	6
Etanol 100% + Ácido Butílico (1:1)	3
Xileno I	5
Xileno II	5

3.9 ESTEREOLOGIA

Para quantificar o número de astrócitos foi utilizado o fracionador óptico, um método estereológico sem viés baseado em amostragem aleatória e sistemática dos objetos de interesse na região de CA3. Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total

de células a partir do número daquelas detectadas em cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (SCHMITZ e HOF, 2005).

Toda investigação estereológica é iniciada com a identificação dos limites da região de interesse. A estimativa de contagem é feita a partir de um software (StereoInvestigator) integrado a um microscópio e um hardware que permite o deslocamento da região de interesse nos eixos “x”, “y”, “z”. Essa estimativa do número e da distribuição de células requer que cada região tenha a mesma probabilidade de ser incluída na contagem dentro da região de interesse. Para isso em todas as secções histológicas analisadas foi realizada a delimitação das camadas de interesse com uma objetiva de pequeno aumento, 3.2× em um microscópio óptico (NIKON, Eclipse 80i) (Nikon, Japan) equipado com uma platina motorizada (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) seguindo os limites anatômicos de cada região. Em secções imunomarcadas para GFAP os limites dos *strata oriens, lucidum, pyramidale, radiatum* e *lacunosum molecular* de CA3 do hipocampo puderam ser facilmente identificados e delimitados.

Para o início da contagem dos objetos de interesse foi usada uma objetiva de maior aumento 60x. Através do programa computacional, caixas de contagem que podem variar de tamanho de acordo com o protocolo desejado foram geradas e dispostas de forma sistemática respeitando as especificações definidas pelo experimentador.

A Figura mostra a grade e as caixas de contagem e destaca uma das caixas onde as linhas vermelhas do bloco correspondem às linhas de exclusão, ou seja, qualquer célula que cruze essa linha não deve ser contada, enquanto que as linhas verdes correspondem às linhas de inclusão.

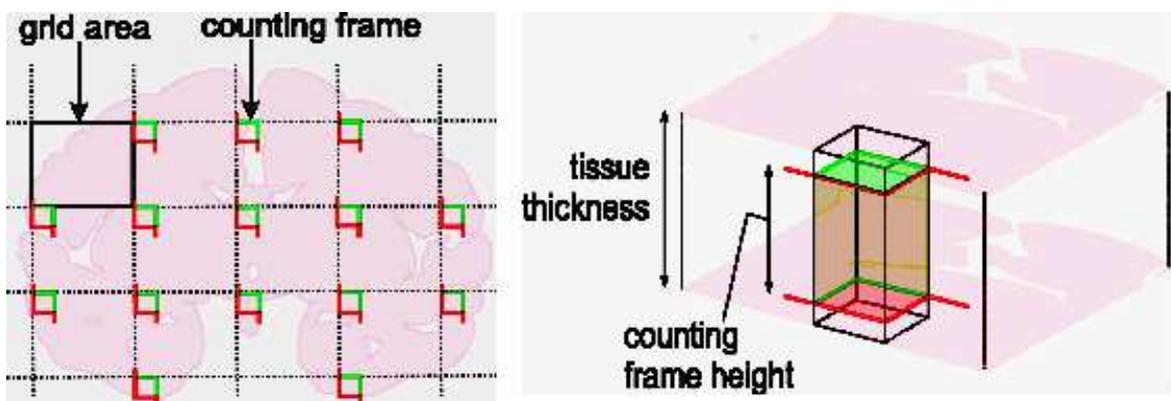


Figura 9. Representação esquemática da distribuição das caixas de contagem com as linhas de inclusão (verdes) e linhas de exclusão (vermelhas) nas interseções da matriz de contagem. À direita representação tridimensional

da caixa de contagem mostrando a altura d da caixa em relação a espessura do tecido. Fonte: www.uhnresearch.ca/wcif.

Devido às variações no processamento histológico (microtomia, desidratação, coloração, etc.), podemos encontrar variações na superfície do corte que podem afetar a contagem. Para corrigir esse erro, é definida uma zona de guarda, ou seja, a distância entre o topo (superfície) da secção e o início do bloco de contagem de modo que se possa assegurar que a contagem se dará numa região onde as variações impostas à superfície de corte pelo vibrátomo não afetem a caixa de contagem.

O soma dos astrócitos foi utilizado como marcador estereológico e a estimativa do número total daqueles dentro da região de interesse foi obtida multiplicando-se o número de objetos dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra. Esses valores dependem: 1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções que contém a região de interesse (“section sampling fraction”); 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem (“area sampling fraction”); e 3) a altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos (“thickness sampling fraction”).

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

Onde,

N – número total de objetos

ΣQ – número de marcadores (astrócitos ou neurônios) contados

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

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

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

Adotamos os seguintes parâmetros estereológicos (BONTHIUS et al., 2004):

- Método: Fracionador Óptico
- Intervalo de contagem entre as secções: 1:6
- Matriz de contagem: variável de acordo com a camada
- Zona de guarda: 2 μm
- Altura do bloco de contagem: 7 μm

A tabela 3 sumaria os parâmetros estereológicos para contagem nas camadas de CA3.

Tabela 3. Parâmetros estereológicos para contagem de astrócitos nas camadas de CA3.

<i>Área de interesse</i>	<i>a(caixa)(μm^2)</i>	<i>A(X,Y)(μm^2)</i>	<i>Espessura do bloco(z)</i>	<i>Zona de guarda</i>
Lacunosum Molecular	80x80	80x80	7 μm	2 μm
Radiatum	80x80	80x80	7 μm	2 μm
Piramidal	80x80	80x80	7 μm	2 μm
Oriens	80x80	80x80	7 μm	2 μm

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística paramétrica para avaliar o grau de significância dos resultados empregou-se o teste T de Student e a análise de variância ANOVA um critério, Bonferroni *a priori*, aceitando-se como significantes as diferenças entre grupos com intervalo de confiança de 95% ($P < 0.05$).

Entretanto tem-se descrito, particularmente em roedores, um alto nível de variabilidade quando se analisa os resultados pelos métodos quantitativos clássicos baseados na média e nos desvios e.g. (CASARRUBEA, SORBERA e CRESCIMANNO, 2008, 2009). De fato um conjunto crescente de evidências sugere que existe variabilidade substancial nas habilidades cognitivas entre diferentes indivíduos. Essa variabilidade interindividual pode ser detectada através da análise de conglomerados baseados em variáveis discriminantes. A análise de conglomerados é um tipo de estatística multivariada que tem sido aplicada a uma ampla variedade de abordagens experimentais incluindo ensaios comportamentais, sendo principalmente utilizada quando não há nenhuma hipótese *a priori* acerca da ocorrência de conglomerados na amostra (BITSIKA, SHARPLEY e ORAPELENG, 2008, CASARRUBEA, SORBERA e CRESCIMANNO, 2009, HILBORN et al., 2009, LANE et al., 2009). Em linha com essas evidências aplicamos esse procedimento da estatística multivariada aos nossos grupos experimentais em busca de possíveis subgrupos com desempenhos distintos nos testes comportamentais.

4 RESULTADOS

4.1 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

O reconhecimento de objeto, assim como, sua localização espacial e temporal são funções cognitivas associadas à formação hipocampal que parecem estar comprometidas no envelhecimento.

Na avaliação da memória de reconhecimento de objetos, os animais do grupo jovem conseguiram distinguir o objeto novo do objeto familiar no teste de identificação da “Forma” do objeto, uma vez que permaneceu maior porcentagem do tempo explorando o objeto novo em relação ao familiar. Por outro lado, nos animais do grupo senil não houve diferença entre o tempo de exploração do objeto novo e do familiar indicando que esse grupo não foi capaz de distinguir a forma dos objetos .

No teste de reconhecimento da diferença temporal onde os animais são desafiados a distinguir objetos familiares antigos de objetos familiares recentes, os grupos jovens e senis conseguiram distinguir temporalmente a sequência em que os objetos foram expostos por apresentaram taxa de exploração significativamente maior para o objeto mais antigo (Figura 10).

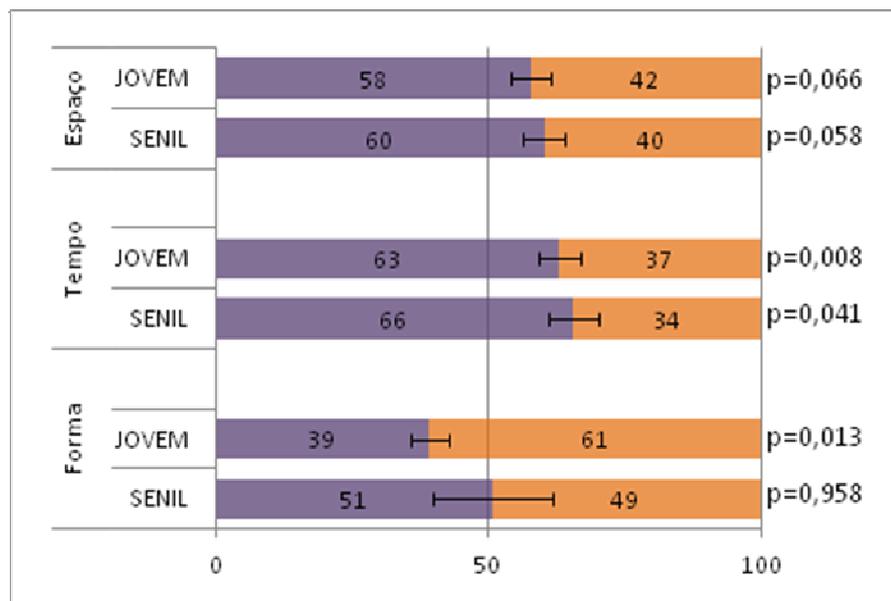


Figura 10. Taxa de discriminação nos testes isolados para reconhecimento de lugar (Espaço), sequência temporal (Tempo) e forma de objetos (Forma). O percentual do tempo de exploração nos diferentes objetos de cada teste reflete a capacidade dos animais jovens em discriminar a forma e a sequência temporal enquanto que os senis somente discriminam a sequência temporal em que os objetos são apresentados. Ambos os grupos apresentam somente tendências para discriminação espacial. p = valor de alfa no teste t-Student bicaudal.

Por outro lado, o reconhecimento de localização espacial dos objetos (“Espaço”) não revelou diferenças significantes sugerindo prejuízo dessa função em ambos os grupos. Detectou-se em ambos os grupos apenas uma tendência para maior exploração do objeto móvel. Esse resultado confirma dados anteriores do nosso laboratório sugerindo que animais que crescem em ambiente empobrecido têm baixo desempenho em testes de reconhecimento espacial de objetos (DINIZ et al., 2010).

No paradigma do teste de memória semelhante à episódica onde os componentes de reconhecimento de forma, tempo e espaço podem ser traduzidos por perguntas como “O QUE?”, “QUANDO?” e “ONDE?”, os camundongos do grupo jovem apresentaram bom reconhecimento de forma e tempo enquanto que os sujeitos do grupo senil não reconheceram as diferenças entre os objetos. Como o teste de memória episódica apresenta maior complexidade em relação aos testes isolados de reconhecimento de objetos, e em concordância com os resultados anteriores, os grupos jovem e senil também não foram capazes de distinguir onde estava o objeto que foi apresentado em nova disposição espacial (Figura 11).

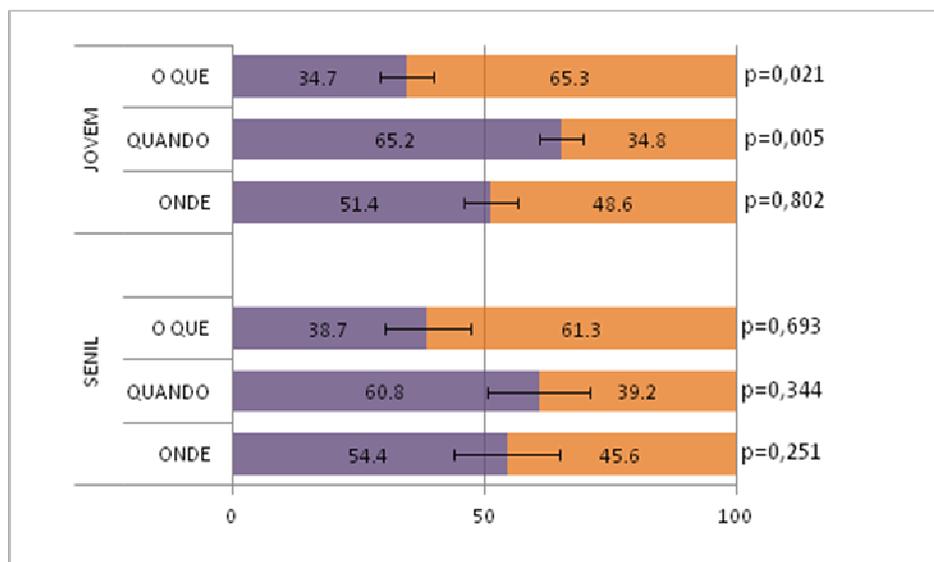


Figura 11: Taxa de discriminação de objetos no teste de memória semelhante à episódica em animais jovens e senis. O percentual do tempo de exploração nos objetos é apresentado separadamente para cada componente relacionado à memória espacial (onde), temporal (quando) e da forma do objeto (o que). Note que os animais jovens são capazes de discriminar objetos de diferentes formas e objetos antigos de objetos recentes, mas não

objetos deslocados de estacionários. Por outro lado, o grupo de camundongos senis parece perder a capacidade discriminativa para os três componentes da memória episódica. $p =$ valor de alfa no teste t-Student bicaudal.

4.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTEREOLÓGICAS

A imunomarcção para GFAP revelou o citoesqueleto dos astrócitos com excelente resolução com boa definição dos corpos celulares e das ramificações proximais e distais. Apesar de não ter sido feita nenhuma análise quantitativa, a partir de reconstruções tridimensionais normalmente utilizadas para comparações morfométricas, os resultados qualitativos sugerem que os astrócitos de CA3 dos animais jovens e velhos não apresentam diferenças morfológicas óbvias (Figura 12).

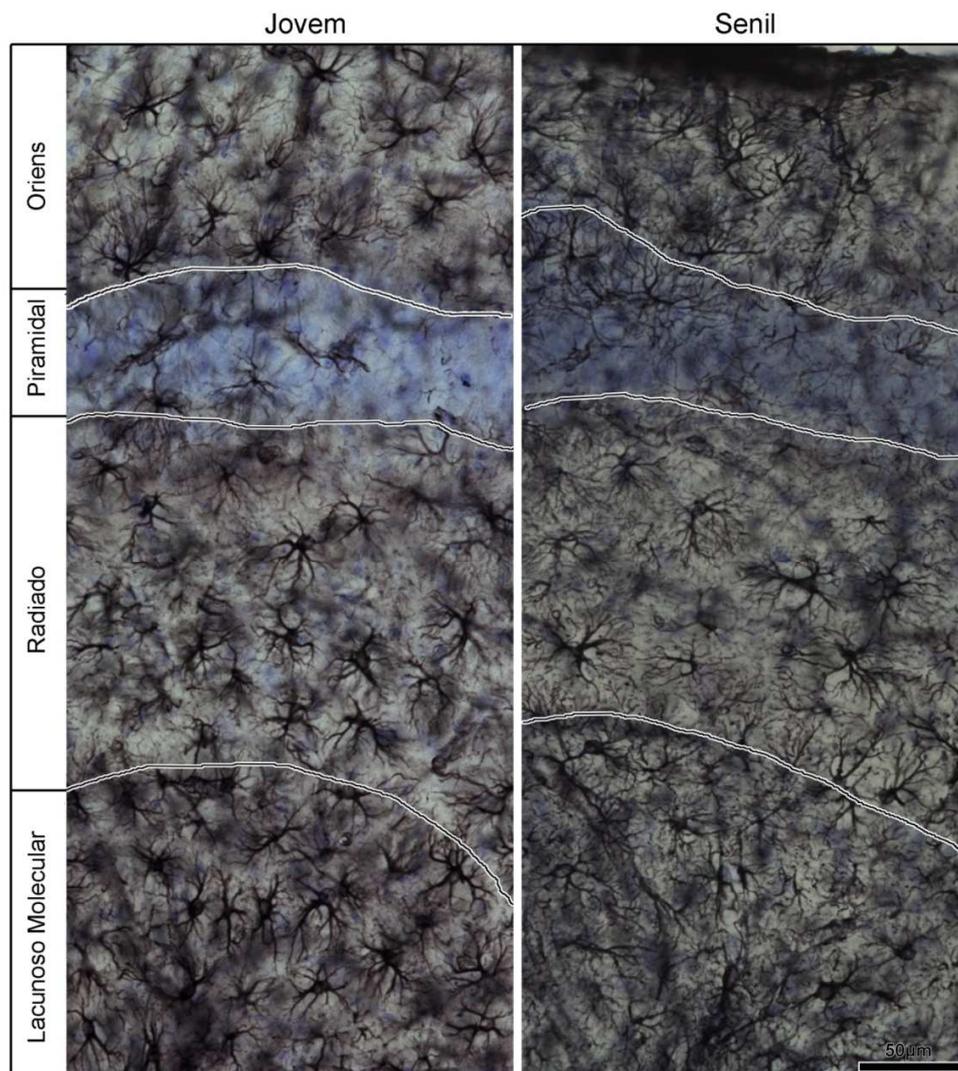


Figura 12: Fotomicrografias de secções imunomarcadas para GFAP ilustrando o padrão morfológico e a distribuição laminar em CA3 de animais dos grupos jovem e senil. As secções escolhidas para ilustração provieram de animais com estimativas estereológicas próximas ao valor médio do grupo. Escala = 50µm.

O envelhecimento alterou, entretanto o número de astrócitos de forma distinta nas diferentes camadas de CA3 tanto quanto afetou de forma diferencial as estimativas numéricas das porções ventral e dorsal. Em CA3 dorsal pôde ser observada significativa redução no número de astrócitos nas camadas oriens e lacunoso molecular do grupo senil em comparação ao grupo jovem. Por outro lado, a camada piramidal apresentou tendência, ainda que sem significância estatística ($p=0,07$), para astrocitose nos animais senis em comparação aos jovens. Já na parte ventral de CA3 a hipoplasia astrocítica ocorreu na camada lacunoso molecular. O estrato radiado não sofreu alteração significativa.

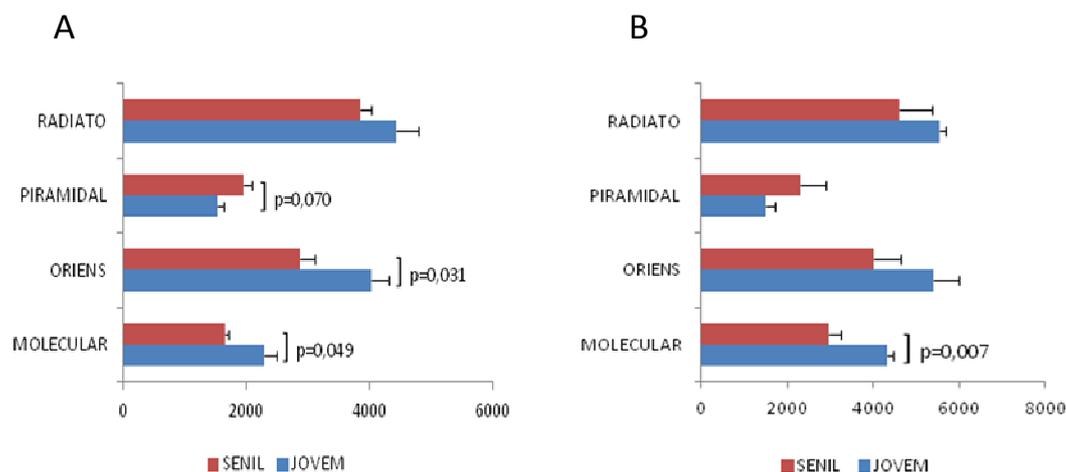


Figura 13: Média das estimativas do número de astrócitos em cada camada da região CA3 dorsal (A) e Ventral (B). Notar que ao compararmos os grupos experimentais jovens e velhos detectou-se que CA3 dorsal é mais impactado pelo envelhecimento apresentando significativa redução no número de astrócitos nas camadas oriens e lacunoso molecular e tendência para astrocitose na camada piramidal. O hipocampo ventral dos animais senis em comparação aos jovens apresentou redução na população de astrócitos limitada à camada lacunoso molecular.

As estimativas do número total de astrócitos de CA3 (dorsal+ ventral) indicam como esperado que haja hipoplasia significativa induzida pelo envelhecimento nas camadas oriens e lacunoso molecular sugerindo que as alterações na população de astrócitos afetam de forma diferenciada as diferentes camadas (Figura 14). Apesar disso, nenhuma diferença significativa foi observada em CA3 quando se considerou para comparação a soma de todas as camadas.

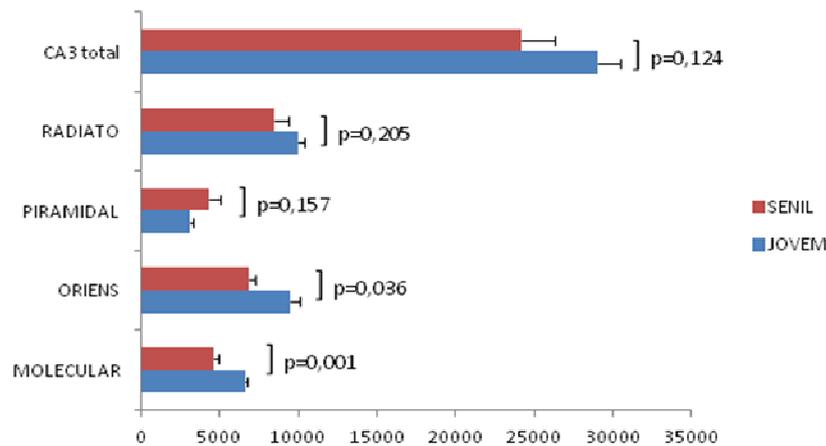


Figura 14: A estimativa do número total de astrócitos na região de CA3 como um todo não revelou significativa alteração no número de astrócitos ($p=0,124$). Entretanto, as estimativas numéricas médias em cada camada de CA3 revelaram maior sensibilidade das camadas oriens e lacunoso molecular ao envelhecimento.

Nas tabelas 4,5,6 e 7 são ilustrados detalhes das estimativas estereológicas para o número de astrócitos incluindo os valores individuais de cada animal e a média com respectivos desvios em cada grupo experimental. Note que existe diferença significativa no número total de astrócitos entre as camadas, independente da idade dos animais. Em todos os casos o coeficiente de variação biológica e metodológico esteve de acordo com estudos prévios e um índice maior do que 60% revelou que a variabilidade individual respondeu pela maior parte da variância da amostra.

Tabela 4: Resultados das estimativas de astrócitos na camada molecular de CA3.

Molecular							
<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção (μm)</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção (μm)</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
<i>Jovem 1</i>	27.5	6532.3	0.06	<i>Senil 1</i>	29.6	4713.7	0.06
<i>Jovem 7</i>	28.0	6239.0	0.06	<i>Senil 3</i>	29.3	4092.0	0.07
<i>Jovem 4</i>	29.4	6983.3	0.06	<i>Senil 5</i>	27.5	5053.8	0.06
<i>Jovem 5</i>	30.2	6641.9	0.06				
<i>Média</i>	28.8	6599.1	0.06	<i>Média</i>	28.8	4619.8	0.06
<i>D.P.</i>		307.4		<i>D.P.</i>		488	
<i>CV²</i>		0.002		<i>CV²</i>		0.01	
<i>CE²</i>		0.004		<i>CE²</i>		0.0048	
<i>CE²/CV²</i>		1.93		<i>CE²/CV²</i>		0.43	
<i>CVB²</i>		0.002		<i>CVB²</i>		0.0064	
<i>CVB² (% of CV²)</i>		-92.65				64%	

$CV^2=(D.P./Média)^2$; $CVB^2=CV^2-CE^2$ (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheaffer); CVB^2 , coeficiente de variação biológica). N, Número total de astrócitos estimado pelo fracionador óptico; D.P., desvio padrão

Uma exceção a essa regra geral foi detectada no caso da camada molecular dos animais jovens (Tabela 6) onde $CE^2/CV^2 = 1.93$ não atendeu a condição $CE^2/CV^2 < 0.5$. Nesse caso em particular, tanto a variação metodológica quanto a biológica não ultrapassaram 7%, caso em que a regra geral não faz sentido nem deve ser aplicada (SLOMIANKA e WEST, 2005).

Tabela 5: Resultados das estimativas de astrócitos no radiatum de CA3.

Radiado							
<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção (µm)</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção (µm)</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
<i>Jovem 1</i>	26.5	9301.6	0.04	<i>Senil 1</i>	29.3	10608.2	0.04
<i>Jovem 7</i>	27.0	9595.5	0.04	<i>Senil 3</i>	27.2	7154.4	0.05
<i>Jovem 4</i>	28.0	11140.1	0.04	<i>Senil 5</i>	26.8	7601.2	0.05
<i>Jovem 5</i>	29.9	10060.6	0.05				
<i>Média</i>	27.8	10024.5	0.04	<i>Média</i>	27.3	8.455	0.05
<i>D.P.</i>		806.738		<i>D.P.</i>		1878.4	
<i>CV²</i>		0.01		<i>CV²</i>		0.05	
<i>CE²</i>		0.002		<i>CE²</i>		0.002	
<i>CE²/CV²</i>		0.32		<i>CE²/CV²</i>		0.05	
<i>CVB²</i>		0.004		<i>CVB²</i>		0.046	
<i>CVB² (% of CV²)</i>		67.53		<i>CVB² (% of CV²)</i>		93.8%	

$CV^2 = (D.P./Média)^2$; $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheaffer); CVB^2 , coeficiente de variação biológica). N, Número total de astrócitos estimado pelo fracionador óptico; D.P., desvio padrão.

Tabela 6: Resultados das estimativas de astrócitos na piramidal de CA3

Piramidal							
<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção (µm)</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção (µm)</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
<i>Jovem 1</i>	25.1	2754.9	0.06	<i>Senil 1</i>	28.5	5876.3	0.05
<i>Jovem 7</i>	25.9	2747.5	0.06	<i>Senil 3</i>	27.7	3811.6	0.06
<i>Jovem 4</i>	27.9	3660.4	0.08	<i>Senil 5</i>	26.3	3125.8	0.06
<i>Jovem 5</i>	28.6	3024.7	0.06				
<i>Média</i>	26.9	3046.9	0.07	<i>Média</i>	26.9	4271.2	0.06
<i>D.P.</i>		428.8		<i>D.P.</i>		1.432	
<i>CV²</i>		0.02		<i>CV²</i>		0.11	
<i>CE²</i>		0.005		<i>CE²</i>		0.0040	
<i>CE²/CV²</i>		0.25		<i>CE²/CV²</i>		0.04	
<i>CVB²</i>		0.0148		<i>CVB²</i>		0.1083	
<i>CVB² (% of CV²)</i>		74.86%		<i>CVB² (% of CV²)</i>		98.45%	

$CV^2 = (D.P./Média)^2$; $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheaffer); CVB^2 , coeficiente de variação biológica). N, Número total de astrócitos estimado pelo fracionador óptico; D.P., desvio padrão

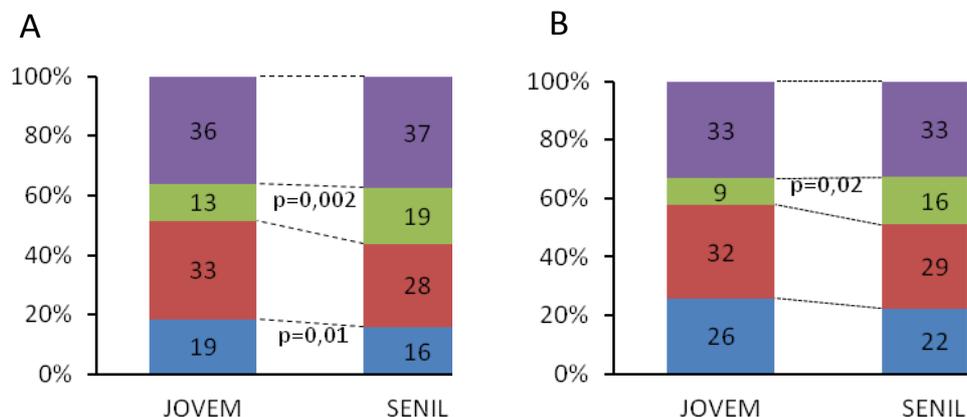
Tabela 7: Resultados das estimativas de astrócitos no oriens em CA3.

Oriens							
<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção (μm)</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção (μm)</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
<i>Jovem 1</i>	26.3	8474.0	0.04	<i>Senil 1</i>	29.2	7763.7	0.04
<i>Jovem 7</i>	28.4	8112.5	0.05	<i>Senil 3</i>	29.5	6615.9	0.04
<i>Jovem 4</i>	31.5	11043.6	0.04	<i>Senil 5</i>	27.2	6246.9	0.05
<i>Jovem 5</i>	30.3	10124.7	0.04				
<i>Média</i>	29.1	9438.7	0.04	<i>Média</i>	28.2	6.87	0.05
<i>D.P.</i>		1382.7		<i>D.P.</i>		791.07	
<i>CV²</i>		0.02		<i>CV²</i>		0.013	
<i>CE²</i>		0.0023		<i>CE²</i>		0.002	
<i>CE²/CV²</i>		0.11		<i>CE²/CV²</i>		0.20	
<i>CVB²</i>		0.0192		<i>CVB²</i>		0.0106	
<i>CVB² (% of CV²)</i>		89.43%		<i>CVB² (% of CV²)</i>		79.5%	

$CV^2 = (D.P./Média)^2$; $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheaffer); CVB^2 , coeficiente de variação biológica). N, Número total de neurônios estimado pelo fracionador óptico; D.P., desvio padrão

Para saber se ocorreram mudanças relativas na distribuição laminar de astrócitos nos animais senis foi calculado o percentual de astrócitos em cada camada de CA3 em função da estimativa total. Para cada estimativa individual multiplicava-se por 100 o número de astrócitos na camada escolhida e dividia-se o produto pelo número total de astrócitos em CA3 daquele indivíduo obtendo-se o percentual relativo de astrócitos em cada camada.

O percentual do número total de astrócitos localizados da camada piramidal do grupo senil foi significativamente maior do que o do grupo jovem em CA3 dorsal e ventral enquanto que no estrato lacunoso molecular de CA3 dorsal o envelhecimento reduziu essa proporção. Em CA3 como um todo, houve significativa redução na distribuição de astrócitos presentes no estrato oriens dos animais senis.



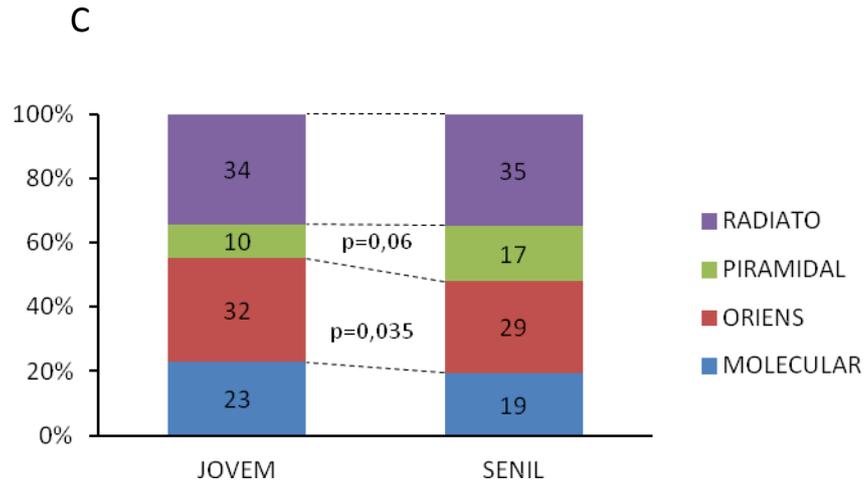


Figura 15: Alterações induzidas pelo envelhecimento na distribuição laminar dos astrócitos de CA3 podem ser avaliadas pelo aumento na proporção relativa do número de astrócitos na camada piramidal de CA3 dorsal (A) e ventral (B) e pela redução do número daqueles no lacunoso molecular de CA3 dorsal (A). Como um todo, CA3 apresentou significativa reorganização na distribuição laminar de astrócitos em função da idade com os animais senis apresentando significativa redução no percentual daqueles localizados na camada oriens mas apenas uma tendência (aumento não significativo) na camada piramidal (C).

Como nenhuma diferença significativa (teste T bi-caudal $p > 0,05$) foi detectada nos valores médios do volume laminar quando se comparou animais jovens e velhos, concluiu-se que o número de astrócitos em CA3 é afetado diretamente pelo envelhecimento.

A estatística multivariada (análise de conglomerados e análise discriminante), utilizando os diferentes parâmetros mensurados revelou clara distinção entre os grupos experimentais. Ou seja, o grupo senil e o jovem são separados em quadrantes distintos pela análise discriminante empregando como variáveis as estimativas estereológicas da distribuição laminar e o tempo relativo de exploração do objeto novo no teste de reconhecimento de objetos e isso é confirmado pela análise de conglomerados (Figura 14 A e B). Por outro lado o teste para averiguar a presença de correlação linear (Pearson) revelou que as estimativas do número de astrócitos na camada piramidal de CA3 estão inversamente relacionadas ao desempenho no teste de reconhecimento de forma. Ou seja, quanto maior o número de astrócitos na camada piramidal menor a discriminação da forma de objetos (Figura 14 C).

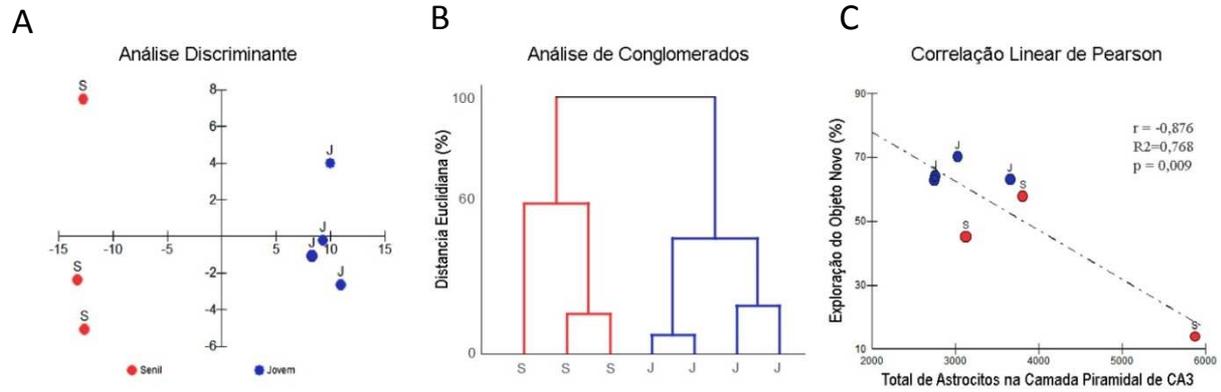


Figura 16: Análise multivariada e correlação de Pearson associando as estimativas do número de astrócitos na região de CA3 e o índice de discriminação da forma de objetos. A análise discriminante realizada com as estimativas estereológicas laminares de CA3 e o tempo relativo de exploração do objeto novo no teste de reconhecimento de objetos, separa claramente os indivíduos do grupo senil (círculos vermelhos) daqueles do grupo jovem (círculos azuis) (A). O mesmo resultado pode ser observado, utilizando-se as mesmas variáveis, quando aplicado o método de formação de conglomerados(B). Parece também existir correlação inversa no teste de Pearson entre o número de astrócitos na camada piramidal de CA3 e a capacidade de discriminar a forma de objetos, sendo o grupo senil menos eficiente nessa tarefa e apresentando maior número de astrócitos(C).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos o impacto do envelhecimento sobre o desempenho em testes de memória comparando as performances de camundongos fêmeas jovens e idosas da linhagem C57/Bl6. Além disso, estimamos o número total e a distribuição laminar dos astrócitos em CA3 investigando possíveis correlações com o desempenho nos testes cognitivos para reconhecimento da forma, da posição relativa e do momento em que objetos selecionados foram expostos aos sujeitos. Os resultados tanto nos testes comportamentais isolados quanto integrados (memória episódica) revelaram que o envelhecimento compromete o reconhecimento da forma, do lugar e do momento em que objetos selecionados são apresentados aos sujeitos, inviabilizando as respostas às três perguntas dos testes comportamentais: O quê? Onde e Quando? As análises estereológicas revelaram que o envelhecimento afetou a distribuição laminar com aumento na proporção relativa do número de astrócitos na camada piramidal de CA3 dorsal e ventral e redução do número daqueles no lacunoso molecular de CA3 dorsal. O número total de astrócitos em consequência apresentou significativa reorganização na distribuição laminar em função da idade com os animais senis apresentando redução no percentual daqueles localizados na camada oriens. Finalmente os estudos de correlação linear entre as estimativas do número dos astrócitos da camada piramidal e os testes comportamentais demonstraram correlação inversa: quanto mais astrócitos naquela camada menor o desempenho.

5.1 Declínio Cognitivo Senil, Plasticidade Sináptica e Distribuição Laminar dos Astrócitos em CA3

Nos testes de reconhecimento de objeto, de lugar e de tempo do presente trabalho encontramos incapacidade dos animais senis em reconhecer a identidade do objeto, o lugar e o tempo. Esses resultados coincidem com resultados anteriores (HOUSER et al 2002) que ao compararem ratos jovens de 6 meses e senis de 20 meses em testes de memória temporal e de objetos demonstraram que os animais senis perdem a capacidade de discriminar os objetos novos dos familiares, enquanto que os animais jovens notadamente preferiam os objetos novos.

Por outro lado, tarefas hipocampo-dependentes como aquelas relacionadas à lembrança da posição relativa dos objetos no espaço e.g. (o labirinto aquático de Morris) tem

sido associadas com ensaios eletrofisiológicos de animais senis centrados no estudo das propriedades da potenciação de longo prazo (LTP) e da depressão de longo prazo (LTD). Esses estudos revelaram que a senescência afeta algumas das suas propriedades como o limiar para sua ocorrência nos animais com declínio cognitivo, permanecendo entretanto inalteradas nos animais cognitivamente íntegros (BACH et al., 1999, TOMBAUGH et al., 2002, FOSTER e KUMAR, 2007). Em linha com esses resultados tem sido constatado amplamente a partir de testes comportamentais que a variabilidade individual é significativa tendo sido encontrado animais senis com e sem distúrbios no aprendizado espacial (ROSENZWEIG e BARNES, 2003).

A contribuição potencial dos astrócitos nesses processos é prontamente reconhecida pela sua participação na sinapse tripartite e por conta do fato de que eles respondem à atividade neuronal e aos neurotransmissores através da ativação de receptores metabotrópicos, podendo liberar gliotransmissores como o ATP, d-serina e glutamato que por sua vez agem em neurônios (HALASSA e HAYDON, 2010). O ATP derivado dos astrócitos modula a transmissão sináptica diretamente ou através de seu produto metabólico a adenosina enquanto que a d-serina modula a função do receptor do NMDA (HALASSA e HAYDON, 2010). Paralelamente tem sido demonstrado que os distúrbios da homeostase do cálcio durante o envelhecimento alteram a excitabilidade celular e a plasticidade sináptica, contribuindo para o declínio cognitivo dos animais senis (THIBAUT, GANT e LANDFIELD, 2007, KUMAR, BODHINATHAN e FOSTER, 2009). Como os astrócitos contribuem diretamente para a regulação da excitabilidade celular através do glutamato e de correntes de cálcio (SIMARD e NEDERGAARD, 2004) além de contribuir como o terceiro elemento da sinapse modulando a sua atividade e que o número de astrócitos dentro da região de CA3 do hipocampo está alterado nos animais velhos nós sugerimos que essa alteração pode estar contribuindo para os déficits cognitivos detectados no presente trabalho nos animais senis.

Em linha com esses achados estudos de lesão e sua correlação com a formação de memória de objeto, lugar e tempo de forma integrada (memória semelhante a episódica) revelaram que sua preservação depende da integridade funcional do hipocampo podendo ser seletivamente comprometida por lesões seletivas de CA3 ou por infusão de antagonistas de NMDA ou AMPA (DAUMAS, HALLEY e LASSALLE, 2004, EACOTT e NORMAN, 2004). Coerentemente (GILBERT e KESNER, 2003), ao submeterem ratos a uma lesão específica em CA3 reproduziram déficits cognitivos semelhantes aos descritos no presente trabalho. Resultados prévios (KESNER e WARTHEN, 2010) dão suporte adicional a essa interpretação ao realizar um estudo onde bloquearam os receptores de NMDA aplicando o

AP5 (um bloqueador farmacológico de NMDA) ou os receptores opióides de CA3 com naloxano. Os animais que receberam a aplicação do AP5 apresentaram déficit de memória espacial de curta duração enquanto que os animais que receberam naloxano tiveram baixo desempenho na tarefa de completamento visuo-espacial em comparação com os animais controle.

Assim, quando comparamos os resultados dos testes em animais com lesão na região de CA3 com os testes dos animais senis do presente trabalho, podemos perceber semelhanças quanto à perda da capacidade de memória de objeto, lugar e tempo. Com esses dados em mente e tendo sido detectado comprometimento da memória nos testes comportamentais é razoável supor que a região de CA3 é um dos alvos afetados por mudanças estruturais e funcionais associadas ao declínio cognitivo do envelhecimento.

5.2 Análise Estereológica dos Astrócitos em CA3

A quantidade de investigações que utilizaram métodos estereológicos aplicadas a CA3 em associação à testes comportamentais semelhantes as do presente estudo é escassa o que dificulta a análise comparativa dos resultados. É importante, entretanto realçar que outros estudos realizados em CA1 e no giro denteado com bases em análises estereológicas demonstraram um aumento na distribuição laminar de astrócitos naquelas regiões (MOUTON, 2002) e em particular na camada polimórfica e molecular do giro denteado do camundongo suíço albino (DINIZ, 2010). Tomando esses achados como referência e os do presente trabalho em CA3, sugerimos que os astrócitos de CA3 podem ser afetados de forma distinta pelo envelhecimento quando comparado aos astrócitos daquelas regiões.

Outros estudos realizados com animais da mesma linhagem dos utilizados no presente trabalho mas em outras regiões, parecem conflitantes entre si. Por exemplo (LONG et al., 1998) não encontram diferença significativa na quantidade de astrócitos no giro denteado e em CA1 ao comparar animais jovens (4-6 meses), adultos jovens (13-14 meses) e senis (27-28 meses). Em contrapartida demonstrou-se em outro estudo utilizando camundongos SAMP8 com envelhecimento acelerado (WU, ZHANG e YEW, 2005) haver um aumento na quantidade de astrócitos GFAP imunoreativos em todas as regiões do hipocampo, não se encontrando entretanto diferenças numéricas com outros imunomarcadores para astrócitos (GS-positive astrocytes e S100 beta). Nesse trabalho a estimativa média da densidade de astrócitos/mm³ em CA3 nos animais de 16 meses foi de cerca de 50.000/mm³ enquanto que nos de três meses foi de 35.000/mm³. Como os achados estereológicos do presente trabalho

revelaram que as estimativas do número de astrócitos em CA3 nos animais velhos foram significativamente menores do que aquelas dos animais jovens e essas diferenças foram associadas a um expressivo declínio cognitivo nos testes de memória resta investigar a fonte do conflito desses resultados. É importante realçar, entretanto, que a densidade de objetos de interesse em qualquer região do SNC é afetada diretamente pelo grau de fixação e de desidratação do tecido. Como o grau de retração tecidual após a fixação, parece ser diferente em animais jovens e velhos, a comparação direta dos resultados expressos em densidade com os do presente trabalho não tem sentido.

Um outro trabalho recente que merece destaque investigou diferenças regionais e laminares na distribuição de perfis antigênicos e na distribuição espacial de astrócitos no hipocampo murino da variedade C57BL/6J de dois e 10 meses de idade encontrando que a região dorsal do corno de Ammon apresentou aos 10 meses um número maior de astrócitos quando comparado aos animais de dois meses. Por outro lado, o número de astrócitos no stratum oriens do corno de Ammon mostrou significativo declínio nos animais de 10 meses. Apesar dessas diferenças regionais não houve diferença significativa no número total de astrócitos entre os camundongos jovens e velhos (JINNO, 2011). Dado que as idades de ambos os grupos (jovem e velho) são muito diferentes daquelas do presente trabalho, torna-se difícil a comparação direta dos resultados.

Assim, permanece por ser investigado se ou não tais contradições são consequência da utilização de metodologias diferentes, da utilização de linhagens e idades diferentes dos animais utilizados, ou das três possibilidades combinadas em maior ou menor grau.

5.3 Hormônios Sexuais e Astrócitos Hipocampais

Em anos recentes tem ficado evidente que os hormônios ovarianos, tais como, os estrógenos e a progesterona, modulam regiões do cérebro envolvidas com aprendizado e memória (MCEWEN et al., 1997, WOOLLEY, 1998) e que a perda do ciclo hormonal na meia idade tem sido associada à perda de memória e.g. (MARKOWSKA, 1999, SHERWIN, 1999). Além disso tem sido demonstrado que fêmeas e machos mostram vigorosas diferenças no declínio cognitivo associado ao envelhecimento principalmente em habilidades visuo-espaciais (MARTIN, WITTERT e BURNS, 2007) sendo as fêmeas mais suscetíveis aos efeitos cognitivos deletérios da apolipoproteína E4 (apoE4), um dos fatores de risco para a doença de Alzheimer (MORTENSEN e HOGH, 2001).

Em consonância, estudos prévios acerca dos efeitos de terapia hormonal de substituição empregando estrógenos e raloxifeno (um modulador que se liga seletivamente a receptores α e β de estrógenos) em camundongos fêmeas ovariectomizadas, revelaram que essas drogas reduziram de forma significativa o número de astrócitos em CA1 e no giro denteado quando comparadas ao grupo controle (LEI et al., 2003). Nenhuma informação entretanto foi disponibilizada para CA3 nesses ensaios tornando difícil a comparação com o presente trabalho. De qualquer modo, considerando que as fêmeas empregadas no presente trabalho tinham 20 meses de idade, e que a perda do ciclo estral se inicia em camundongos entre os 13 e 14 meses e se encerra entre os 24 e 25 meses (NELSON et al., 1995) e que não foram feitas dosagens para antecipar os níveis hormonais vigentes à época dos testes, é difícil assegurar se as fêmeas idosas mantinham ou não seus ciclos estrais. De qualquer modo tem sido demonstrado em ratas jovens que os ciclos estrais têm influência negligível sobre a memória de reconhecimento de objeto, lugar e tempo (FRYE, 1995, WARREN e JURASKA, 1997). Além disso, uma vez que camundongos fêmeas mantidas em cativeiro na mesma gaiola tendem a sincronizar seus ciclos estrais (SCHRADIN, KINAHAN e PILLAY, 2009), é razoável supor que a época dos testes comportamentais e do sacrifício, se todas tivessem preservado seus ciclos estrais, elas estariam no mesmo período do ciclo. Essas considerações tomadas em conjunto sugerem que não há como explicar nossos resultados a partir dos efeitos isolados de hormônios sexuais possivelmente diminuídos nas fêmeas velhas.

5.4 Limitações Técnicas não Estereológicas

Um dos alvos do presente trabalho foi estimar o número de astrócitos dentro de um determinado volume de tecido equivalente às camadas de CA3 afetadas pelo envelhecimento usando investigação estereológica sem viés.

Seguindo esses princípios, existem dois métodos estereológicos: o fracionador óptico já descrito e o método que estima o número total de células multiplicando a densidade média de células pelo volume da região de interesse (SCHMITZ e HOF, 2000). Em estudo recente, entretanto, ficou evidente que as estimativas do número total de objetos de interesse obtidas a partir do fracionador óptico, são do ponto de vista estatístico e do ponto de vista do esforço empreendido, mais eficientes do que as estimativas a partir da densidade e volume (SCHMITZ e HOF, 2000). Além disso, avaliou-se igualmente várias maneiras de se estimar o erro em amostras simuladas por computador de modo a encontrar uma maneira de calcular o

coeficiente de erro que mais se aproximasse do erro verdadeiro. Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras simuladas por computação, com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (GLASER e WILSON, 1998).

Por conta do fato de que o coeficiente de erro de Scheaffer representa a variação devida à incerteza metodológica intrínseca, é esperado e desejável que ele sempre contribua menos para a variação total do que a variação biológica. Isso é alcançado respeitando a relação: $CE^2/CV^2 < 0.5$, onde CE é o coeficiente de erro devido à incerteza metodológica intrínseca e $CV = \text{Desvio Padrão} / \text{Média}$. No presente trabalho a relação CE^2/CV^2 esteve sempre abaixo de 0.5, minimizando a probabilidade de erros procedimentais durante as contagens (SLOMIANKA e WEST, 2005). Tal como mencionado antes uma exceção a essa regra geral foi detectada no caso da camada molecular dos animais jovens (Tabela 6) onde $CE^2/CV^2 = 1.93$ não atendeu a condição $CE^2/CV^2 < 0.5$. Nesse caso em particular, tanto a variação metodológica quanto a biológica não ultrapassaram 7%, caso em que a regra geral não faz sentido nem deve ser aplicada (SLOMIANKA e WEST, 2005).

A outra maneira que se empregou para se avaliar os erros relacionados à escolha da matriz amostral foi o cálculo da variação biológica definida como: $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (onde CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica) expresso em valor percentual do coeficiente de variação. Considera-se que o coeficiente de erro é adequado sempre que ele contribui menos do que a variação biológica para o coeficiente global de variação.

Entretanto, mesmo com todos esses cuidados, a incerteza nas estimativas ainda permanece e é decorrente de outras fontes de erro como aqueles introduzidos pelos pré-supostos do observador acerca dos grupos experimentais, pelas alterações induzidas nas secções pelo processamento do tecido, pela ambiguidade no reconhecimento de áreas ou dos objetos de interesse e pela definição dos planos de foco superior e inferior da secção.

Corroborando essa última afirmação tem sido encontrado um número expressivo de trabalhos com diferenças significativas entre as estimativas estereológicas no hipocampo de roedores. A Tabela 8 ilustra um exemplo de tais resultados para o número de neurônios de CA3 do hipocampo de ratos Wistar.

Tabela 8: Resultados Comparativos de Estimativas Estereológicas do Número de Neurônios em CA3 do hipocampo de Ratos Wistar

Referência	Número Total de Neurônios	Idade pós natal (em dias)	Método Estereológico
Rasmussen et al., 1996	360000	75	Fracionador Óptico
Xavier et al., 1999	360000	*	Fracionador Óptico por Volume
West et al., 1991	250400	*	Fracionador Óptico
Hosseini-Sharifabad and Nyengaard, 2007	188000	60	Dissetor Óptico
Partadiredja and Bedi	212500	62	Dissetor Físico
Miki et al., 2005 (CA2+CA3)	149600	30	Dissetor Físico
Andrade et al., 1995	140000	180	Dissetor Físico

* Não informado no artigo.

Seria as diferenças encontradas entre as estimativas ilustradas na tabela 10 consequência de diferentes metodologias? Simples variação biológica? Ou ambigüidade na definição da região e dos objetos de interesse?

Da mesma forma que para CA3, o giro denteado do rato tem sido objeto de estudos estereológicos e diferenças importantes nas estimativas tem sido igualmente detectadas e.g. (NISHIMURA et al., 1995, PILEGAARD e LADEFOGED, 1996, GRADY et al., 2003). Esses resultados contraditórios, tal como indicado anteriormente podem resultar de diferenças nas metodologias aplicadas, de variações nos procedimentos histológicos, de protocolos de estereologia diferentes e de ambigüidades na definição dos objetos e das áreas de interesse (WEST, 1999, MANDARIM-DE-LACERDA, 2003, SCHMITZ e HOF, 2005). No caso específico da tabela 10, o elemento comum entre os diferentes trabalhos é a adoção da técnica de Nissl, uma técnica de coloração que cora indistintamente neurônios e glias, propiciando ambigüidade na definição dos objetos de interesse.

Infelizmente, os estudos estereológicos dedicados aos astrócitos de CA3 do camundongo são muito limitados para permitir um ensaio comparativo. De fato, apenas quatro trabalhos dedicados a CA3 empregam metodologias sem viés baseadas em procedimentos estereológicos para estimar o número de astrócitos no hipocampo de camundongos velhos (LONG et al., 1998, MOUTON et al., 2002, LEI et al., 2003, JINNO, 2011). Exceto pelo trabalho de (JINNO, 2011) que se limita a investigar camundongos de 3 e 10 meses, esses trabalhos fazem estimativas do número total de astrócitos de CA1 e CA3 como um todo, não se detendo na análise laminar detalhada, o que torna difícil sua comparação com os resultados do presente trabalho. De qualquer modo, para reduzir as possíveis fontes de erro, todos os dados do presente trabalho foram obtidos com o mesmo protocolo de processamento histológico (perfusão, imunomarcção, desidratação, contracoloração e diafanização) adotando o mesmo método estereológico, hardware e software. Para detectar possíveis variações no critério de identificação dos objetos de interesse, empregou-se um único tipo de anticorpo monoclonal para GFAP e realizou-se procedimentos de verificação dos resultados de contagem repetindo eventualmente a avaliação de uma mesma região por diferentes investigadores. Como resultado desses procedimentos as fontes não biológicas de variação foram minimizadas. Ver tabelas 6 a 9 para detalhes e para análise dessas questões consultar (MOUTON et al., 2002, SLOMIANKA e WEST, 2005).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Eram objetivos específicos do presente trabalho:

- Comparar as performances nos testes de memória espacial e de identidade de objetos entre os dois grupos.
- Estimar o número total e a distribuição laminar de astrócitos na região de CA3 do hipocampo de camundongos da linhagem C57/Bl6 de 6 e 20 meses.
- Testar a hipótese de possíveis relações entre declínio cognitivo associado ao envelhecimento, o número e a distribuição laminar de astrócitos em CA3.

Todos os objetivos delineados para a presente dissertação foram alcançados permitindo as seguintes conclusões:

- 1) O envelhecimento está associado à incapacidade de responder a três das perguntas essenciais envolvendo o reconhecimento de objetos nas quais o hipocampo está envolvido o quê?, onde? e quando? enquanto que apenas a localização espacial está comprometida nos animais jovens
- 2) O envelhecimento altera a distribuição laminar dos astrócitos de CA3 reduzindo o seu número de forma seletiva.
- 3) O envelhecimento altera a capacidade de discriminar a forma dos objetos estabelecendo correlação inversa no teste de Pearson entre o número de astrócitos na camada piramidal de CA3 e a capacidade de discriminar a forma de objetos, sendo o grupo senil menos eficiente nessa tarefa e apresentando maior número de astrócitos.

REFERÊNCIAS

ALBAYRAM, O., et al. Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.108, p.11256-11261, Jul 5.2011.

ALLEN, N.J., BARRES, B.A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. **Nature**, v.457, p.675-677, Feb 5.2009.

ALMEIDA, M., et al. Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes: behavioral and stereological analysis. **Bmc Neuroscience**, v.Submitted, 2011.

AMARAL, D.G., LAVENEX, P. **Hippocampal Neuroanatomy**, p.37-114, 2007.

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.

ARAÚJO, J.A., STUDZINSKI, C.M., MILGRAM, N.W. Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.29, p.411-422, Mar.2005.

AZAD, N.A., AL BUGAMI, M., LOY-ENGLISH, I. Gender differences in dementia risk factors. **Gen Med**, v.4, p.120-129, Jun.2007.

BACH, M.E., et al. Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, p.5280-5285, Apr 27.1999.

BALL, M.J. Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. **Acta Neuropathol**, v.37, p.111-118, Feb 28.1977.

BARILI, P., et al. Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review. **Mech Ageing Dev**, v.106, p.57-92, Dec 1.1998.

BAXTER, M.G., et al. Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. **Neuroscience**, v.89, p.771-779, Mar.1999.

BEN MENACHEM-ZIDON, O., et al. Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. **Brain Behav Immun**, Nov 17.2011.

- BERR C, B.B., ARNAUD J Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. *Etude du Vieillessement Arteriel. J. Am. Geriatr. Soc.*, v.48, p.1285–1291, 2000.
- BERTOLUCCI, P.H.F.C., P.; FORLENZA, OV Avaliação de memória. **Neuropsiquiatria geriátrica. São Paulo: Atheneu**, p.507-516, 2000.
- 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, p.973-985, Nov.2008.
- BONTEMPI, B., et al. SIB-1553A, (+/-)-4-[[2-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)ethyl]thio]phenol hydrochloride, a subtype-selective ligand for nicotinic acetylcholine receptors with putative cognitive-enhancing properties: effects on working and reference memory performances in aged rodents and nonhuman primates. **J Pharmacol Exp Ther**, v.299, p.297-306, Oct.2001.
- BONTHIUS, D.J., et al. Use of frozen sections to determine neuronal number in the murine hippocampus and neocortex using the optical disector and optical fractionator. **Brain Res Brain Res Protoc**, v.14, p.45-57, Nov.2004.
- BRUCKI, S., ROCHA, M. Category fluency test: effects of age, gender and education on total scores, clustering and switching in Brazilian Portuguese-speaking subjects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1771-1777, 2004.
- BURGER, C. Region-specific genetic alterations in the aging hippocampus: implications for cognitive aging. **Front Aging Neurosci**, v.2, p.140, 2010.
- BURKE, S.N., BARNES, C.A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nat Rev Neurosci**, v.7, p.30-40, Jan.2006.
- BURKE, S.N., BARNES, C.A. Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. **Trends Neurosci**, v.33, p.153-161, Mar.2010.
- BUSHONG, E.A., et al. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. **J Neurosci**, v.22, p.183-192, Jan 1.2002.
- CARVALHO, J.A.M., GARCIA, R.A. **The aging process in the Brazilian population: a demographic approach**, v.19, p.725-733, 2003.
- CASARRUBEA, M., SORBERA, F., CRESCIMANNO, G. Multivariate analysis of the modifications induced by an environmental acoustic cue on rat exploratory behavior. **Physiol Behav**, v.93, p.687-696, Mar 18.2008.

CASARRUBEA, M., SORBERA, F., CRESCIMANNO, G. Multivariate data handling in the study of rat behavior: an integrated approach. **Behav Res Methods**, v.41, p.772-781, Aug.2009.

CHARCHAT-FICHMAN, H., et al. [Decline of cognitive capacity during aging]. **Rev Bras Psiquiatr**, v.27, p.79-82, Mar.2005.

CHEN, P.E., et al. Behavioral deficits and subregion-specific suppression of LTP in mice expressing a population of mutant NMDA receptors throughout the hippocampus. **Learn Mem**, v.16, p.635-644, Oct.2009.

CHRISTOPHERSON, K.S., et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**, v.120, p.421-433, Feb 11.2005.

COHEN, J.E. Human population: the next half century. **Science**, v.302, p.1172-1175, Nov 14.2003.

CURCIO, C.A., HINDS, J.W. Stability of synaptic density and spine volume in dentate gyrus of aged rats. **Neurobiol Aging**, v.4, p.77-87, Spring.1983.

DAUMAS, S., HALLEY, H., LASSALLE, J.M. Disruption of hippocampal CA3 network: effects on episodic-like memory processing in C57BL/6J mice. **Eur J Neurosci**, v.20, p.597-600, Jul.2004.

DERE, E., HUSTON, J.P., DE SOUZA SILVA, M.A. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Res Brain Res Protoc**, v.16, p.10-19, Dec.2005a.

DERE, E., HUSTON, J.P., DE SOUZA SILVA, M.A. Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. **Neurobiol Learn Mem**, v.84, p.214-221, Nov.2005b.

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

DERE, E., et al. The case for episodic memory in animals. **Neurosci Biobehav Rev**, v.30, p.1206-1224, 2006.

DESGRANGES, B., KALPOUZOS, G., EUSTACHE, F. [Cerebral imaging in healthy aging: contrast with Alzheimer disease]. **Rev Neurol (Paris)**, v.164 Suppl 3, p.S102-107, May.2008.

DICKSTEIN, D.L., et al. Changes in the structural complexity of the aged brain. **Aging Cell**, v.6, p.275-284, Jun.2007.

DICZFALUSY, E. The demographic revolution and our common future. **Maturitas**, v.38, p.5-14; discussion 14-15, Feb 28.2001.

DINIZ, D. **Envelhecimento e Pobreza de Estímulos Sensoriomotores e Cognitivos alteram a Distribuição Laminar dos Astrócitos do Giro Denteado e afetam as Memórias Espacial e Episódica**, v.MSc, p.93, January, 29th, 2010. 2010.

DINIZ, D., et al. **Aging, environmental enrichment, object recognition and astrocyte plasticity in dentate gyrus**, p.in press, 2011.

DINIZ, D.G., et al. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **Eur J Neurosci**, v.32, p.509-519, Aug.2010.

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

DROGE, W., SCHIPPER, H.M. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. **Aging Cell**, v.6, p.361-370, Jun.2007.

EACOTT, M.J., NORMAN, G. Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? **J Neurosci**, v.24, p.1948-1953, Feb 25.2004.

ERICKSON, C.A., BARNES, C.A. The neurobiology of memory changes in normal aging. **Exp Gerontol**, v.38, p.61-69, Jan-Feb.2003.

ETO, R., et al. Age-related changes of calcineurin and Akt1/protein kinase Balpha (Akt1/PKBalpha) immunoreactivity in the mouse hippocampal CA1 sector: an immunohistochemical study. **Metab Brain Dis**, v.23, p.399-409, Dec.2008.

FELZIEN, L.K., et al. Increased chemokine gene expression during aging in the murine brain. **Brain Res**, v.890, p.137-146, Jan 26.2001.

FERRUCCI, L., GIALLAURIA, F., GURALNIK, J.M. Epidemiology of aging. **Radiol Clin North Am**, v.46, p.643-652, v, Jul.2008.

FOSTER, T.C., KUMAR, A. Susceptibility to induction of long-term depression is associated with impaired memory in aged Fischer 344 rats. **Neurobiol Learn Mem**, v.87, p.522-535, May.2007.

FRANCIS, P.T., et al. Neurotransmitters and second messengers in aging and Alzheimer's disease. **Ann N Y Acad Sci**, v.695, p.19-26, Sep 24.1993.

FRICK, K.M., et al. Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. **Learn Mem**, v.10, p.187-198, May-Jun.2003.

FRYE, C.A. Estrus-associated decrements in a water maze task are limited to acquisition. **Physiol Behav**, v.57, p.5-14, Jan.1995.

GIAUME, C., et al. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. **Nat Rev Neurosci**, v.11, p.87-99, Feb.2010.

GILBERT, P.E., KESNER, R.P. Localization of function within the dorsal hippocampus: the role of the CA3 subregion in paired-associate learning. **Behav Neurosci**, v.117, p.1385-1394, Dec.2003.

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

171, 1998.

GODBOUT, J.P., JOHNSON, R.W. Age and Neuroinflammation: A Lifetime of Psychoneuroimmune Consequences. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v.29, p.321-337, May.2009.

GRADY, M.S., et al. Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. **J Neurotrauma**, v.20, p.929-941, Oct.2003.

GREENE, J.G., BORGES, K., DINGLEDINE, R. Quantitative transcriptional neuroanatomy of the rat hippocampus: evidence for wide-ranging, pathway-specific heterogeneity among three principal cell layers. **Hippocampus**, v.19, p.253-264, Mar.2009.

HABER, M., ZHOU, L., MURAI, K.K. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. **J Neurosci**, v.26, p.8881-8891, Aug 30.2006.

HALASSA, M.M., et al. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. **J Neurosci**, v.27, p.6473-6477, Jun 13.2007.

HALASSA, M.M., HAYDON, P.G. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. **Annu Rev Physiol**, v.72, p.335-355, Mar 17.2010.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v.11, p.298-300, Jul.1956.

HEBB, D. On watching myself get old. **Psychol. Today**, v.November, p.15-23, 1978 November.1978.

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, p.412-424, May.2009.

IRWIN, I., et al. Nigrostriatal monoamine oxidase A and B in aging squirrel monkeys and C57BL/6 mice. **Neurobiol Aging**, v.18, p.235-241, Mar-Apr.1997.

JINNO, S. Regional and laminar differences in antigen profiles and spatial distributions of astrocytes in the mouse hippocampus, with reference to aging. **Neuroscience**, v.180, p.41-52, Apr 28.2011.

JINNO, S., et al. Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. **Glia**, v.55, p.1334-1347, Oct.2007.

JOURDAIN, P., et al. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. **Nat Neurosci**, v.10, p.331-339, Mar.2007.

KALARIA, R.N., et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. **Lancet Neurol**, v.7, p.812-826, Sep.2008.

KESNER, R.P. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. **Learning and Memory**, v.14, p.771-781, 2007.

KESNER, R.P., LEE, I., GILBERT, P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. **Rev Neurosci**, v.15, p.333-351, 2004.

KESNER, R.P., WARTHEN, D.K. Implications of CA3 NMDA and opiate receptors for spatial pattern completion in rats. **Hippocampus**, v.20, p.550-557, Apr.2010.

KRAMER, A.F., et al. Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**, v.400, p.418-419, Jul 29.1999.

KRAMER, J.H., et al. Longitudinal MRI and cognitive change in healthy elderly. **Neuropsychology**, v.21, p.412-418, Jul.2007.

KUMAR, A., BODHINATHAN, K., FOSTER, T.C. Susceptibility to Calcium Dysregulation during Brain Aging. **Front Aging Neurosci**, v.1, p.2, 2009.

LANE, A.E., et al. Sensory Processing Subtypes in Autism: Association with Adaptive Behavior. **J Autism Dev Disord**, Jul 31.2009.

LANGSTON, R.F., et al. The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. **Behav Brain Res**, v.215, p.275-291, Dec 31.2010.

LEE, S.Y., HAYDON, P.G. **Astrocytic glutamate targets NMDA receptors**. **J Physiol**, v.581, p.887-888, Jun 15.2007.

LEI, D.L., et al. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. **Neuroscience**, v.121, p.659-666, 2003.

LEIN, E.S., ZHAO, X., GAGE, F.H. Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization. **J Neurosci**, v.24, p.3879-3889, Apr 14.2004.

LEXELL, J. Evidence for nervous system degeneration with advancing age. **J Nutr**, v.127, p.1011S-1013S, May.1997.

LISMAN, J.E., OTMAKHOVA, N.A. Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. **Hippocampus**, v.11, p.551-568, 2001.

LONG, J.M., et al. Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. **Neurobiol Aging**, v.19, p.497-503, Sep-Oct.1998.

LORENTE DE NÓ, R. Studies of the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system.

. **J. Psychol. Neurol.**, p.113–177, 1934.

LUNENFELD, B. An Aging World--demographics and challenges. **Gynecol Endocrinol**, v.24, p.1-3, Jan.2008.

MACHADO, J.C., et al. Evaluation of cognitive decline and its relationship with socioeconomic characteristics of the elderly in Viçosa, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.10, p.592-605, 2007.

MAGISTRETTI, P.J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. **J Exp Biol**, v.209, p.2304-2311, Jun.2006.

MANCZAK, M., et al. Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. **J Neurochem**, v.92, p.494-504, Feb.2005.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v.75, p.469-486, Dec.2003.

MARKHAM, J.A., et al. Sexually dimorphic aging of dendritic morphology in CA1 of hippocampus. **Hippocampus**, v.15, p.97-103, 2005.

MARKOWSKA, A.L. Sex dimorphisms in the rate of age-related decline in spatial memory: relevance to alterations in the estrous cycle. **J Neurosci**, v.19, p.8122-8133, Sep 15.1999.

MARTIN, D.M., WITTERT, G., BURNS, N.R. Gonadal steroids and visuo-spatial abilities in adult males: implications for generalized age-related cognitive decline. **Aging Male**, v.10, p.17-29, Mar.2007.

MAYHEW, T.M., GUNDERSEN, H.J. If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **J Anat**, v.188 (Pt 1), p.1-15, Feb.1996.

MCEWEN, B.S., et al. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. **Neurology**, v.48, p.S8-15, May.1997.

MCGEER, P.L. The 12th J. A. F. Stevenson memorial lecture. Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system. **Can J Physiol Pharmacol**, v.62, p.741-754, Jul.1984.

MITTAL, K.R., LOGMANI, F.H. Age-related reduction in 8th cervical ventral nerve root myelinated fiber diameters and numbers in man. **J Gerontol**, v.42, p.8-10, Jan.1987.

MORA, F., SEGOVIA, G., DEL ARCO, A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. **Brain Res Rev**, v.55, p.78-88, Aug.2007.

MORTENSEN, E.L., HOGH, P. A gender difference in the association between APOE genotype and age-related cognitive decline. **Neurology**, v.57, p.89-95, Jul 10.2001.

MOUTON, P.R., et al. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. **Brain Res**, v.956, p.30-35, Nov 22.2002.

MURALI, G., PANNEERSELVAM, K.S., PANNEERSELVAM, C. Age-associated alterations of lipofuscin, membrane-bound ATPases and intracellular calcium in cortex, striatum and hippocampus of rat brain: protective role of glutathione monoester. **Int J Dev Neurosci**, v.26, p.211-215, Apr.2008.

MURRAY, C.J., LOPEZ, A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v.349, p.1498-1504, May 24.1997.

NADON, N.L. Of mice and monkeys: National Institute on Aging resources supporting the use of animal models in biogerontology research. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.61, p.813-815, Aug.2006.

NELSON, J.F., et al. Neuroendocrine involvement in aging: evidence from studies of reproductive aging and caloric restriction. **Neurobiol Aging**, v.16, p.837-843; discussion 855-836, Sep-Oct.1995.

NICHOLSON, D.A., et al. Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. **J Neurosci**, v.24, p.7648-7653, Sep 1.2004.

NISHIMURA, A., et al. Age-related decrease of serotonergic fibres and S-100 beta immunoreactivity in the rat dentate gyrus. **Neuroreport**, v.6, p.1445-1448, Jul 10.1995.

OSSOWSKA, K. Disturbances in neurotransmission processes in aging and age-related diseases. **Pol J Pharmacol**, v.45, p.109-131, Mar-Apr.1993.

PETIT-TABOUE, M.C., et al. Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping. **Neuroimage**, v.7, p.176-184, Apr.1998.

PILEGAARD, K., LADEFOGED, O. Total number of astrocytes in the molecular layer of the dentate gyrus of rats at different ages. **Anal Quant Cytol Histol**, v.18, p.279-285, Aug.1996.

POE, B.H., et al. Effects of age and insulin-like growth factor-1 on neuron and synapse numbers in area CA3 of hippocampus. **Neuroscience**, v.107, p.231-238, 2001.

RAMOS, L.R., VERAS, R.P., KALACHE, A. **Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira**, v.21, n.3, p.211-224, 1987.

RICHTER-LEVIN, G., SEGAL, M. Age-related cognitive deficits in rats are associated with a combined loss of cholinergic and serotonergic functions. **Ann N Y Acad Sci**, v.695, p.254-257, Sep 24.1993.

RICHTER-LEVIN, G., SEGAL, M. Serotonin, aging and cognitive functions of the hippocampus. **Rev Neurosci**, v.7, p.103-113, Apr-Jun.1996.

ROGALSKI, E.J., et al. Changes in parahippocampal white matter integrity in amnesic mild cognitive impairment: a diffusion tensor imaging study. **Behav Neurol**, v.21, p.51-61, 2009.

ROLLS, E.T., KESNER, R.P. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. **Prog Neurobiol**, v.79, p.1-48, May.2006.

ROSENZWEIG, E.S., BARNES, C.A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Prog Neurobiol**, v.69, p.143-179, Feb.2003.

ROTH, G.S. Changes in tissue responsiveness to hormones and neurotransmitters during aging. **Exp Gerontol**, v.30, p.361-368, May-Aug.1995.

ROTH, G.S., JOSEPH, J.A. Cellular and molecular mechanisms of impaired dopaminergic function during aging. **Ann N Y Acad Sci**, v.719, p.129-135, May 31.1994.

SALMINEN, A., et al. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. **Eur J Neurosci**, v.34, p.3-11, Jul.2011.

SCHMIDT, B., MARRONE, D.F., MARKUS, E.J. Disambiguating the similar: The dentate gyrus and pattern separation. **Behav Brain Res**, v.226, p.56-65, Jan 1.2012.

SCHMITZ, C., HOF, P.R. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. **J Chem Neuroanat**, v.20, p.93-114, Oct.2000.

SCHMITZ, C., HOF, P.R. Design-based stereology in neuroscience. **Neuroscience**, v.130, p.813-831, 2005.

SCHRADIN, C., KINAHAN, A.A., PILLAY, N. Cooperative breeding in groups of synchronously mating females and evolution of large testes to avoid sperm depletion in african striped mice. **Biol Reprod**, v.81, p.111-117, Jul.2009.

SHAFQAT, S. Alzheimer disease therapeutics: perspectives from the developing world. **J Alzheimers Dis**, v.15, p.285-287, Oct.2008.

SHERWIN, B.B. Can estrogen keep you smart? Evidence from clinical studies. **J Psychiatry Neurosci**, v.24, p.315-321, Sep.1999.

SIMARD, M., NEDERGAARD, M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. **Neuroscience**, v.129, p.877-896, 2004.

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

SMITH, C.D., et al. Brain structural alterations before mild cognitive impairment. **Neurology**, v.68, p.1268-1273, Apr 17.2007.

SMITH, T.D., et al. Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. **J Neurosci**, v.20, p.6587-6593, Sep 1.2000.

SOFRONIEW, M.V., VINTERS, H.V. **Astrocytes: biology and pathology**. **Acta Neuropathol**, v.119, p.7-35, Jan.2010.

STEMMELIN, J., et al. Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. **Neuroscience**, v.96, p.275-289, 2000.

SULZER, D., et al. Neuronal pigmented autophagic vacuoles: lipofuscin, neuromelanin, and ceroid as macroautophagic responses during aging and disease. **J Neurochem**, v.106, p.24-36, Jul.2008.

SWERDLOW, R.H. Pathogenesis of Alzheimer's disease. **Clin Interv Aging**, v.2, p.347-359, 2007.

THIBAUT, O., GANT, J.C., LANDFIELD, P.W. Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. **Aging Cell**, v.6, p.307-317, Jun.2007.

TOMBAUGH, G.C., et al. Theta-frequency synaptic potentiation in CA1 in vitro distinguishes cognitively impaired from unimpaired aged Fischer 344 rats. **J Neurosci**, v.22, p.9932-9940, Nov 15.2002.

TOMLINSON, B.E., IRVING, D. The numbers of limb motor neurons in the human lumbosacral cord throughout life. **J Neurol Sci**, v.34, p.213-219, Nov.1977.

TORRES-MUNOZ, J.E., et al. Gene expression profiles in microdissected neurons from human hippocampal subregions. **Brain Res Mol Brain Res**, v.127, p.105-114, Aug 23.2004.

TROEN, A.M., et al. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, p.12474-12479, Aug 26.2008.

UEMURA, E. Age-related changes in the subiculum of *Macaca mulatta*: synaptic density. **Exp Neurol**, v.87, p.403-411, Mar.1985.

ULLIAN, E.M., CHRISTOPHERSON, K.S., BARRES, B.A. Role for glia in synaptogenesis. **Glia**, v.47, p.209-216, Aug 15.2004.

VAN GROEN, T., MIETTINEN, P., KADISH, I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**, v.13, p.133-149, 2003.

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

WARREN, S.G., JURASKA, J.M. Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. **Behav Neurosci**, v.111, p.259-266, Apr.1997.

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

WEST, M.J. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. **Trends Neurosci**, v.22, p.51-61, Feb.1999.

WEST, M.J., SLOMIANKA, L., GUNDERSEN, H.J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat Rec**, v.231, p.482-497, Dec.1991.

WICK, G., et al. Diseases of aging. **Vaccine**, v.18, p.1567-1583, Feb 25.2000.

WITTER, M.P. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. **Prog Brain Res**, v.163, p.43-61, 2007.

WOOLLEY, C.S. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. **Horm Behav**, v.34, p.140-148, Oct.1998.

WU, Y., ZHANG, A.Q., YEW, D.T. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. **Neurochem Int**, v.46, p.565-574, Jun.2005.

YAMAZAKI, D., SAITOE, M. [cAMP/PKA signaling underlies age-related memory impairment]. **Brain Nerve**, v.60, p.717-724, Jul.2008.

ZHANG, X., ZHANG, J., CHEN, C. Long-term potentiation at hippocampal perforant path-dentate astrocyte synapses. **Biochem Biophys Res Commun**, v.383, p.326-330, Jun 5.2009.

ZHU, X., et al. Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. **Am J Alzheimers Dis Other Demen**, v.19, p.345-352, Nov-Dec.2004.

ANEXO 1



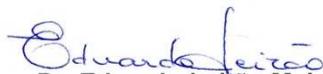
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



TERMO DE APROVAÇÃO

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

Belém, 12 de setembro de 2005


Dr. Eduardo Leitão Maia

COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / HJBB/UFPA