



**LANE COELHO VIANA**

**INFLUÊNCIAS DO TAMANHO DA NINHADA E DA ATIVIDADE  
FÍSICA SOBRE A PLASTICIDADE GLIAL NA FORMAÇÃO  
HIPOCAMPAL EM MODELO MURINO**

**BELÉM**

**2014**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROCIÊNCIAS E  
BIOLOGIA CELULAR



**INFLUÊNCIAS DO TAMANHO DA NINHADA E DA ATIVIDADE  
FÍSICA SOBRE A PLASTICIDADE GLIAL NA FORMAÇÃO  
HIPOCAMPAL EM MODELO MURINO**

**LANE COELHO VIANA**

**BELÉM  
2014**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROCIÊNCIAS E  
BIOLOGIA CELULAR



**LANE COELHO VIANA**

**INFLUÊNCIAS DO TAMANHO DA NINHADA E DA ATIVIDADE  
FÍSICA SOBRE A PLASTICIDADE GLIAL NA FORMAÇÃO  
HIPOCAMPAL EM MODELO MURINO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração em Neurociências

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

**BELÉM  
2014**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROCIÊNCIAS E  
BIOLOGIA CELULAR



## **INFLUÊNCIAS DO TAMANHO DA NINHADA E DA ATIVIDADE FÍSICA SOBRE A PLASTICIDADE GLIAL NA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL EM MODELO MURINO**

Lane Coelho Viana. Belém, Pará, UFPA/HUJBB, 2014.

Tese de Doutorado submetida  
como requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutor pelo Programa de  
Pós-Graduação em Neurociências e  
Biologia Celular-UFPA.

Composição da Comissão Examinadora:

Presidente:

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

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Membros:

**Prof. Dr. Cristovam Guerreiro Diniz**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Prof. Dr. Roseane Borner de Oliveira**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

## DEDICATÓRIA

*Em honra a todos os indivíduos que experimentaram a falta do cuidado parental, e  
àqueles que os amam.*

## AGRADECIMENTOS

Ao longo destes estudos nos últimos anos, percebi de forma marcante que sou o produto de uma combinação dos meus próprios esforços, das circunstâncias e da comunidade que me cerca. E apesar das dificuldades, que cabem a todo ser vivente, considero-me uma pessoa de muita sorte por estar encerrando esta fase. O crescimento pessoal e científico vivenciados nesse período são devidos, em grande parte, às pessoas que têm influenciado-me de diferentes formas. Sinto-me muito grata pelas oportunidades e lições que me proporcionaram que em suas várias faces definiram o traçado desse caminho e a intensidade dos esforços empregados nos últimos anos. Considero que agradecer não é tarefa fácil, nem justa, logo, para mim foi um desafio quase tão grande quanto escrever esta tese, utilizar estas poucas páginas para agradecer aos sujeitos envolvidos. Tentando não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida nessa fase e foram importantes para o fechamento do ciclo que o presente trabalho encerra. Agradeço aqui também, de modo particular, a algumas das pessoas que contribuíram para a construção deste trabalho.

- Ao meu orientador prof. Cristovam Wanderley Picanço Diniz, pela disponibilidade, pelo apoio e conhecimento que possibilitaram o amadurecimento dos conhecimentos e conceitos que levaram à execução e conclusão deste projeto;
- Ao prof. Rubem Guedes por fornecer tão gentilmente os animais que compuseram a primeira fase deste estudo;
- À prof. Eva Syková pela oportunidade, e por prestar toda a orientação e esclarecimentos necessários para meu desempenho durante a estada em seu laboratório;
- À prof. Lydia Vargova pela atenção, apoio acadêmico, pela valorização de meus esforços mesmo quando não frutíferos e por proporcionar um excelente ambiente de trabalho;

- Ao colega de trabalho e grande amigo Michal Cicanic pela paciência comigo no ensinamento das técnicas, por toda a gentil ajuda e por ser sempre tão prestativo e amável mesmo em nossas fases experimentais mais intensas e estressantes;
- À prof. Miroslava Anděrová e ao colega Tomáš Červinka pelo apoio no aprendizado da utilização da microscopia confocal;
- Aos colegas do Instituto de Neurociências e do Instituto de Medicina experimental em Praga pela simpatia e prestatividade, em especial aos colegas Lesia Dmitrenko e Ivan Voříšek pelo auxílio no aprendizado da construção dos meus eletrodos;
- Aos colegas do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção que auxiliaram na execução do presente trabalho, em especial à Fabíola Siqueira Mendes pelos esclarecimentos de minhas dúvidas em estatística;
- Ao CNPq pelo apoio financeiro sem o qual a realização deste trabalho não seria possível;
- Aos meus amigos de verdade que se fizeram fiéis companheiros nesta caminhada;
- Também àqueles que me oportunizaram lições ao melhor estilo *Xaro Xhoan Daxos*. Muito obrigada pelos ensinamentos, são sempre importantes para o crescimento;
- Ao amigo prof. Iracildo Pereira Castro pelo cuidado e apoio quando estive em depressão, sem sua ajuda naqueles dias negros provavelmente este trabalho não estaria sendo concluído hoje;
- E muito especialmente agradeço ao meu esposo Jakub Krejčí, pela paciência, amabilidade, companheirismo, cumplicidade e por todo o apoio moral e psicológico ao longo desses últimos quatro anos que incluíram amizade, namoro, noivado e casamento juntamente com os altos e baixos da execução deste trabalho. Obrigada também pela ajuda na confecção das imagens presentes neste manuscrito. Miluji tě.

*“Never forget what you are. The rest of the world will not. Wear it like armor, and it can never be used to hurt you”.*

**- George R.R. Martin, A game of Thrones**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACTH** – hormônio adrenocorticotrófico.

**AF** – Alexa Fluor.

**ApoER2** – apolipoprotein E receptor 2 (receptor 2 de apolipoproteína).

**ATP** – adenosina tri-fosfato.

**BDNF** – brain-derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado do encéfalo).

**CA1** – Corno de Amon 1.

**CA3** – Corno de Amon 3.

**COX -2** – Cioclooxigenase 2.

**CREB** – cAMP Responsive Element Binding (elemento ligante responsivo ao AMPc).

**CRH** – Corticotrophin-releasing hormone (hormônio liberador da corticotrofina).

**Dab1** – Disabled homologue 1 (homólogo desativado 1).

**DAPI** – 4',6-Diamidino-2-Phenylindole.

**GABA** – Gamma-aminobutyric acid (ácido gama-aminobutírico).

**GDNF** – Glial derived Neurotrophic Factor (fator neurotrófico derivado da glia).

**GFAP** – Glial fibrillary acidic protein (proteína ácida fibrilar glial).

**HPA** – hipotálamo – pituitária – adrenal.

**IEG** – Immediate early genes (genes de resposta imediata).

**IGF-1** – Insulin-like growth factor 1 (Fator de crescimento semelhante à insulina).

**IL-1 $\beta$**  – interleucina 1 $\beta$ .

**IL-6** – Interleucina 6.

**iNOS** - Inducible Nitric Oxide Synthase (sintase do óxido nítrico induzida).

**LPS** – lipopolissacarídeo.

**LTP** – Long-term potentiation (potenciação de longo prazo).

**NGFI-A** - nerve growth factor-inducible protein A (proteína A induzida por fator de crescimento neural).

**NMDA** – N-Methyl-D-aspartate (N-metil-D-aspartato).

**rGCs** – receptores glicocorticóides.

**ROS** – reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio).

**RTI-TMA** – real-time iontophoretic tetrametilamonium method (método de iontoforese de tetrametilamônio em tempo real).

**SNC** – sistema nervoso central.

**TMA** – tetrametilamônio.

**TNF- $\alpha$**  – Tumor necrosis factor  $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ).

**VEGF** – vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular).

**VLDLR** – Very-Low-Density Lipoprotein Receptor (receptor de lipoproteína de densidade muito baixa).

**VP** – vasopressina.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Características nutricionais da ração de laboratório utilizada para alimentação das nutrizes e crias .....	64
<b>Quadro 2.</b> Condições físicas dos subgrupos experimentais nas idades jovem, adulto e senescente. ....	64
<b>Quadro 3.</b> Parâmetros do treinamento físico dos subgrupos exercitados durante as cinco semanas de exercício .....	65
<b>Quadro 4.</b> Parâmetros morfométricos analisados nas micróglia .....	73
<b>Quadro 5.</b> Números de animais e secções dos quais foram obtidas as curvas de difusão para cada eixo em cada área estudada .....	126
<b>Quadro 6.</b> Anticorpos utilizados para reações imunohistoquímicas no presente trabalho.....	127
<b>Quadro 7.</b> Parâmetros para obtenção das imagens em microscópio confocal para análises .....	130
<b>Quadro 8.</b> Médias da apresentação dos comportamentos maternos por período de observação nas ninhadas grandes e pequenas .....	133
<b>Quadro 9.</b> Medidas de difusão realizadas em outros estudos utilizando o método RTI-TMA em tecido normal .....	169

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Período de crescimento encefálico rápido em humanos e ratos .....	26
<b>Figura 2.</b> Exemplos de comportamentos maternos característicos em roedores.....	31
<b>Figura 3.</b> Os circuitos de resposta ao estresse.....	34
<b>Figura 4.</b> Perfis morfológicos da micróglia. ....	54
<b>Figura 5.</b> Respostas inflamatórias pela ativação da micróglia no encéfalo.....	56
<b>Figura 6.</b> Diagrama esquemático da divisão dos subgrupos e procedimentos experimentais.....	66
<b>Figura 7.</b> Desenho esquemático do teste de reconhecimento de objeto e teste de memória espacial .....	68
<b>Figura 8.</b> Posicionamento da grade de contagem e distribuição sistemática das caixas de contagem sobre a área de interesse delimitada.....	71
<b>Figura 9.</b> Desenho esquemático de alguns parâmetros morfométricos analisados pelo programa NeuroLucida .....	74
<b>Figura 10.</b> Gráficos representativos das médias de peso corporal .....	77
<b>Figura 11.</b> Gráfico das médias de peso corporal dos animais sedentários e exercitados de ninhadas grandes e pequenas nos 90°, 155° e 600° dias pós-natais.....	78
<b>Figura 12.</b> Representações gráficas das estimativas da quantidade de micróglia no giro denteado de animais adultos e idosos.....	79
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografias representativas das médias de cada grupo experimental..	80
<b>Figura 14.</b> Padrão de distribuição da micróglia nas camadas do giro denteado dos grupos SS e SSS .....	81
<b>Figura 15.</b> Reconstruções tridimensionais das micróglia representativas para cada grupo experimental.....	82
<b>Figura 16.</b> Parâmetros morfométricos das micróglia médias .....	84
<b>Figura 17.</b> Número de células microgliais, morfometria, análise de cluster e análise discriminante associada à idade e ao tamanho da ninhada.....	85
<b>Figura 18.</b> Representações gráficas dos efeitos do aumento da ninhada e do envelhecimento sobre a morfologia microglial da camada molecular.....	86
<b>Figura 19.</b> Representação gráfica das médias dos tempos de exploração do teste de reconhecimento de objetos dos animais adultos e idosos.....	87

<b>Figura 20.</b> Representação gráfica dos tempos de exploração do teste de memória espacial dos animais experimentais adultos e idosos.....	88
<b>Figura 21.</b> Fotomicrografias de secções representativas das médias da quantidade de micróglia do giro dentado dos grupos experimentais.....	89
<b>Figura 22.</b> Representações gráficas das estimativas do número de micróglia no giro dentado de animais jovens e idosos em diferentes condições de exercício .....	90
<b>Figura 23.</b> Distribuição laminar percentual das células microgliais .....	92
<b>Figura 24.</b> Fotomicrografias de secções representativas das médias da quantidade de micróglia do giro dentado dos grupos experimentais jovens.....	93
<b>Figura 25.</b> Representações gráficas das médias do número de células microgliais .....	94
<b>Figura 26.</b> Gráficos mostrando a distribuição laminar das células microgliais.....	95
<b>Figura 27.</b> O modelo da sinapse tripartite. ....	97
<b>Figura 28.</b> Complexidade morfológica do astrócito revelada por dois tipos de marcação distintos.....	98
<b>Figura 29.</b> Diagrama esquemático das prováveis funções das células NG2 no encéfalo.....	104
<b>Figura 30.</b> Recuperação da laminação das células granulares no giro dentado dos camundongos <i>reeler</i> .....	107
<b>Figura 31.</b> Fatores que afetam a difusão de uma molécula no espaço extracelular.....	113
<b>Figura 32.</b> Períodos diários de observação do comportamento materno .....	117
<b>Figura 33.</b> Comportamentos maternos observados durante a fase de amamentação...	119
<b>Figura 34.</b> Planilha de registro de cuidado materno.....	120
<b>Figura 35.</b> Esquema experimental da segunda fase.....	121
<b>Figura 36.</b> Modelo do conjunto experimental utilizado para registro dos parâmetros difusionais no espaço extracelular e curvas representativas de difusão de TMA+.....	123
<b>Figura 37.</b> Posicionamento padrão dos eletrodos para o registro das curvas de difusão.....	125
<b>Figura 38.</b> Obtenção das imagens para morfometria confocal nas secções imunomarcadas para células NG-2 positivas e astrócitos.....	128
<b>Figura 39.</b> Áreas hipocámpais nas quais foram obtidas as imagens para análise no presente estudo.....	129

<b>Figura 40.</b> Projeções tridimensionais de fotomicrografias obtidas em microscópio confocal para cálculo de área, contagem total de células e contagem das células de interesse para as secções imunomarcadas para GFAP, NG2 e reelina.....	131
<b>Figura 41.</b> Médias dos comportamentos de lambidas e inclinação alta + lambidas das ratas de ninhadas grandes e ninhadas pequenas.....	134
<b>Figura 42.</b> Valores dos parâmetros difusionais obtidos para cada eixo ortogonal no giro denteado e em CA1 .....	136
<b>Figura 43.</b> Curvas médias de difusão obtidas através do método de iontoforese de tetrametilamônio em tempo real para os animais de ninhadas pequenas e grandes.....	137
<b>Figura 44.</b> Representações gráficas das médias das frações de volume extracelular no giro denteado e CA1 .....	138
<b>Figura 45.</b> Gráficos das médias das tortuosidades no giro denteado e CA1.....	139
<b>Figura 46.</b> Médias da área ocupada por astrócitos no giro denteado e em CA1 .....	140
<b>Figura 47.</b> Quantificações astrocíticas por morfometria confocal na camada molecular do giro denteado .....	142
<b>Figura 48.</b> Quantificações dos astrócitos na camada polimórfica do giro denteado.....	143
<b>Figura 49.</b> Quantificações astrocíticas por morfometria confocal no estrato radiado de CA1.....	144
<b>Figura 50.</b> Áreas de superfície ocupadas pelas células NG2 positivas no giro denteado e em CA1.....	145
<b>Figura 51.</b> Quantificações das células NG2 positivas na camada molecular do giro denteado .....	147
<b>Figura 52.</b> Quantificações das células NG2 positivas na camada polimórfica do giro denteado.....	148
<b>Figura 53.</b> Quantificações das células NG2 positivas no estrato radiado de CA1.....	149
<b>Figura 54.</b> Quantificações das células reelina positivas na camada molecular do giro denteado .....	150
<b>Figura 55.</b> Quantificações das células reelina positivas na camada polimórfica do giro denteado.....	151
<b>Figura 56.</b> Quantificações das células reelina positivas na região de CA1.....	152

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO I</b> – Taxonomia e dados biológicos do rato.....	219
<b>ANEXO II</b> – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal acerca do projeto.....	222
<b>ANEXO III</b> – Tabelas com os dados estereológicos das contagens de células microgliais para todos os grupos experimentais.....	224
<b>ANEXO IV</b> – Artigo científico relacionado ao CAPÍTULO II Seção 4.3 deste manuscrito, publicado na revista Neuroscience 238 (2013) 280–296.....	237
<b>ANEXO V</b> – Artigo científico relacionado ao CAPÍTULO II Seção 4.4 deste manuscrito, em processo de correções para submissão.....	255

## RESUMO

Estudos anteriores demonstraram efeitos importantes do estresse perinatal no desempenho cognitivo na vida adulta e durante o envelhecimento. Entretanto permanece por ser estudado em detalhe como o exercício físico em diferentes fases da vida contribui para reduzir esses déficits. Isso é particularmente verdadeiro quando se trata de documentar as alterações da matriz extracelular e das células da glia, largamente ignoradas nesses estudos. Assim o objetivo geral do presente trabalho é o de investigar as possíveis influências do tamanho da ninhada e da atividade física sobre a memória de reconhecimento de objetos na vida adulta e possíveis alterações associadas à plasticidade glial e da matriz extracelular da formação hipocampal em modelo murino. Para alcançar esses objetivos alteramos o tamanho da ninhada de ratos Wistar de modo a acentuar o grau de competição entre os filhotes por tetas funcionais e diminuir a quantidade de cuidado materno por indivíduo. Durante o período de aleitamento quantificamos o cuidado materno em ninhadas de diferentes tamanhos. Em várias janelas temporais submetemos grupos selecionados de sujeitos ao exercício em esteira durante 5 semanas adotando o mesmo protocolo de treinamento. Após o exercício alguns grupos de animais adultos e senis foram submetidos ao teste de memória de reconhecimento de objetos que é dependente do hipocampo, sendo sacrificados e processados para imunohistoquímica seletiva para micróglia. Outros grupos de animais adultos não submetidos aos testes comportamentais foram igualmente sacrificados sendo um dos hemisférios empregado para registro de parâmetros difusionais no hipocampo enquanto que o outro foi empregado para imunohistoquímicas seletivas para astrócitos, células NG2 e reelina. Encontramos que o aumento do tamanho da ninhada está relacionado à redução do cuidado materno, ao declínio cognitivo, à proliferação e alteração da morfologia microglial, astrocitária e de células NG2 positivas, assim como às alterações nos padrões de difusão encontradas no tecido hipocampal. Além disso que tais alterações podem ser revertidas pelo menos de forma parcial pela atividade física e que esse efeito é tanto maior quanto mais jovem é o sujeito. O envelhecimento agrava as alterações morfológicas microgliais induzidas pelo aumento do tamanho da ninhada e reduz o desempenho nos testes de memória de reconhecimento de objeto. Os mecanismos moleculares associados a esses efeitos permanecem por ser investigados.

Palavras-Chave: tamanho da ninhada, micróglia, astrócitos, células NG2, reelina, exercício, difusão extracelular.

## ABSTRACT

Previous studies have shown significant effects of perinatal stress on cognitive performance in adulthood and during aging. However remains to be studied in detail as exercise at different stages of life helps to reduce these deficits. This is particularly true if we consider previous descriptions of extracellular matrix and glial cell changes, largely ignored in these studies. Thus, the aim of the present report is to investigate possible influences of litter size and physical activity on object recognition memory at adulthood and whether or not these influences affect glial plasticity and extracellular matrix of the hippocampal formation. To that end, we changed the litter size of Wistar rats to accentuate the degree of competition among siblings by functional teats and decrease the amount of maternal care per individual. During the suckling period, we have quantified the maternal care in litters of different sizes. At various time windows we submitted selected subjects to physical exercise on a treadmill, for 5 weeks, adopting the same training protocol. After exercise, some groups of adults and senile animals were submitted to the hippocampal-dependent object recognition memory test, sacrificed, and processed for selective microglia immunolabeling. Other groups of adult animals not subjected to behavioral tests were also euthanized and had one hemisphere used to record diffusional parameters in the hippocampal parenchyma while the other was used for selective immunolabeling to detect astrocytes, NG2 cells and reelin. We found that an increase in litter size was related to the reduction of maternal care, cognitive decline, altered morphology and proliferation of microglia, astrocytes and NG2 cells, as well as to a change in diffusion patterns in the hippocampal stroma. We also demonstrated that these changes may be reversed, at least partially, by physical activity and the extent of these beneficial effects are more pronounced in younger subjects. Finally, we demonstrated that ageing exacerbates microglial morphological changes induced by increased litter size and reduces memory performance. The molecular mechanisms associated to these effects remain to be investigated.

Keywords : litter size, microglia, astrocytes, NG2 cells reelin, exercise, extracellular diffusion.

## SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	22
<b>1. A importância do tamanho da ninhada e suas consequências sobre as circunstâncias ambientais do neonato</b> .....	24
<i>1.1- As condições ambientais no período perinatal e suas influências sobre o desenvolvimento encefálico do neonato</i> .....	24
<i>1.2- O cuidado materno e padrões comportamentais relacionados</i> .....	26
<i>1.3- O cuidado materno, o tamanho da ninhada e os mecanismos neuroendócrinos de resposta ao estresse</i> .....	32
<i>1.4- O período de hiporresponsividade ao estresse e a importância do cuidado materno para sua manutenção</i> .....	36
<i>1.5- O modelo experimental de manipulação do tamanho da ninhada, a amamentação, os níveis de estresse e o comportamento da fêmea: consequências para o desenvolvimento dos filhotes</i> .....	37
<b>2. Hipocampo, cognição, intervenções ambientais e arquitetura tecidual</b> .....	41
<i>2.1- O hipocampo e as relações entre desempenho cognitivo, cuidado materno e envelhecimento</i> .....	41
<i>2.2- A atividade física como fator de proteção e recuperação das alterações induzidas por fatores ambientais perinatais no encéfalo</i> .....	43
<i>2.3- Plasticidade glial e da matriz extracelular e suas relações com o tamanho da ninhada, o exercício e o envelhecimento</i> .....	47
<b>II. ALTERAÇÕES MICROGLIAIS NO GIRO DENTEADO DE RATOS ADULTOS E IDOSOS: ANÁLISES ESTEREOLÓGICAS E MORFOMETRIA TRIDIMENSIONAL</b> .....	50
<b>1. Introdução</b> .....	50
<i>1.1- O Envelhecimento e o Sistema Nervoso</i> .....	50
<i>1.2- As células microgliais: da homeostase à patogênese em função de alterações ambientais</i> .....	53
<i>1.3- A morfologia quantitativa: Estimativas numéricas sem viés e reconstruções tridimensionais</i> .....	59

<b>2. Objetivos</b> .....	62
<b>3. Material e métodos</b> .....	63
<b>3.1- Grupos Experimentais</b> .....	63
<b>3.2- Testes comportamentais</b> .....	65
3.2.1- <i>Habituação ao Aparato</i> .....	67
3.2.2- <i>Habituação aos objetos</i> .....	67
3.2.3- <i>Testes</i> .....	67
3.2.4- <i>Teste de reconhecimento de objeto</i> .....	67
3.2.5- <i>Teste de memória espacial</i> .....	68
<b>3.3- Processamento histológico</b> .....	69
<b>3.4- Microscopia e o fracionador óptico</b> .....	70
<b>3.5- Reconstruções tridimensionais das células microgliais do giro denteado</b> .....	72
<b>3.6- Análises estatísticas</b> .....	74
<b>4. Resultados</b> .....	76
<b>4.1 - Observações da progressão do crescimento e maturação somática: comparações do ganho de peso no período pós-natal em ambas as fases experimentais</b> .....	76
4.1.1- <i>Pesos corporais dos animais</i> .....	76
<b>4.2 – Alterações microgliais induzidas por alterações no tamanho da ninhada, envelhecimento e exercício em diferentes janelas temporais e suas correlações comportamentais</b> .....	78
<b>4.3– Efeitos do tamanho da ninhada e do envelhecimento sobre o número e morfologia de micróglia no giro denteado (Artigo: Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: Stereological analysis and three dimensional morphometry – Neuroscience 2013)</b> .....	79
4.3.1- <i>Quantificação das células microgliais no giro denteado</i> .....	79
4.3.2- <i>Distribuição laminar da micróglia nas camadas do giro denteado</i> .....	80
4.3.3- <i>Análise morfométrica da micróglia na camada molecular do giro denteado</i> .....	81
<b>4.4 - Efeitos do exercício físico sobre as alterações microgliais no giro denteado induzidas por manipulações no tamanho da ninhada e pelo envelhecimento. (Artigo: Litter size and sedentary lifestyle affect aging cognitive decline and microglial number in the rat dentate gyrus – em processo de submissão)</b> .....	86
4.4.1- <i>Testes de memória hipocampo-dependentes</i> .....	86

4.4.2- <i>Teste de reconhecimento de objeto</i> .....	87
4.4.3- <i>Teste de memória espacial</i> .....	88
4.4.4- <i>Quantificação das células microgliais no giro dentado</i> .....	88
4.4.5- <i>Distribuição laminar da micróglia nas camadas do giro dentado</i> .....	91
<b>4.5 - Efeitos do exercício físico em diferentes janelas temporais sobre as alterações microgliais no giro dentado induzidas por manipulações no tamanho da ninhada. (Artigo: Treadmill exercise at different time windows differently affects the pattern of microglial proliferation in the dentate gyrus in adult Wistar rats submitted to changes in litter size during lactation – Artigo em processo de redação)</b> .....	92
4.5.1- <i>Estimativas da quantidade de células microgliais no giro dentado</i> .....	92
4.5.2- <i>Distribuição laminar das células microgliais no giro dentado</i> .....	95
<b>III- ALTERAÇÕES GLIAIS, DE MATRIZ EXTRACELULAR E NOS PARÂMETROS DIFUSIONAIS DO ESPAÇO EXTRACELULAR NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS</b> .....	96
<b>1.Introdução</b> .....	96
<i>1.1- Astrócitos: conceitos, funções e alterações morfofisiológicas induzidas por variáveis ambientais</i> .....	96
<i>1.2- As células NG2- positivas: antigos conceitos, novas funções e futuras perspectivas</i> .....	101
<i>1.3- Alterações na matriz extracelular, influências ambientais e consequências funcionais: o papel da reelina</i> .....	105
<i>1.4- Alterações gliais e de matriz extracelular no encéfalo: Parâmetros difusionais e suas relações com alterações morfológicas e funcionais</i> .....	108
<b>2.Objetivos</b> .....	115
<b>3.Material e Métodos</b> .....	116
<i>3.1- Grupos Experimentais</i> .....	116
<i>3.2- Observação do cuidado materno</i> .....	116
<i>3.3- Pesagem dos Animais e Exercício Físico</i> .....	121
<i>3.4- Medidas dos padrões difusionais da matriz extracelular</i> .....	122
<i>3.5- Imunohistoquímica</i> .....	126
<i>3.6- Morfometria confocal</i> .....	127
<i>3.7- Análises estatísticas</i> .....	132

<b>4.Resultados</b> .....	133
<b>4.1 - Influência do tamanho da ninhada e do exercício tardio sobre elementos gliais e de matriz extracelular e suas relações com os parâmetros difusionais da matriz extracelular do giro dentado de ratos adultos (Artigo: Influence of litter size and late exercise on glial elements and extracellular matrix: relations with the diffusion parameters of the extracellular matrix of the dentate gyrus of adult rats – Artigo em processo de redação)</b> .....	133
4.1.1- <i>Observações comportamentais: o cuidado materno</i> .....	133
4.1.2- <i>Parâmetros difusionais do espaço extracelular</i> .....	135
- <i>Anisotropia</i> .....	135
- <i>Curvas difusionais</i> .....	136
- <i>Fração de volume extracelular</i> .....	137
- <i>Tortuosidade</i> .....	138
4.1.3- <i>Morfometria confocal</i> .....	139
4.1.4- <i>Área de superfície dos astrócitos</i> .....	139
4.1.5- <i>Quantificação dos astrócitos e do total de células</i> .....	140
4.1.6- <i>Área de superfície das células NG2 positivas</i> .....	145
4.1.7- <i>Quantificação das células NG2 positivas e do total de células</i> .....	146
4.1.8- <i>Quantificação das células reelina positivas</i> .....	150
<b>IV. DISCUSSÃO</b> .....	153
<b>1- Tamanho da ninhada, crescimento e maturação somática</b> .....	153
<b>2- Tamanho da ninhada e alterações no cuidado materno</b> .....	158
<b>3- Tamanho da ninhada, envelhecimento, exercício e desempenho cognitivo</b> .....	159
<b>4- Tamanho da ninhada, envelhecimento, exercício e desempenho cognitivo: correlações com alterações microgliais</b> .....	160
<b>5- Alterações nos parâmetros difusionais do espaço extracelular induzidos pelo tamanho da ninhada e exercício físico</b> .....	166
<b>6- Tamanho da ninhada e exercício físico: Alterações gliais e de matriz extracelular detectadas por morfometria confocal</b> .....	170
<b>7- Limitações técnicas</b> .....	174
<b>CONCLUSÕES</b> .....	177
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	178
<b>ANEXOS</b> .....	219

## I. INTRODUÇÃO GERAL

Este documento reúne dois grandes ensaios experimentais realizados em sequência, o primeiro no Brasil (UFPA e UFPE) e o segundo em Praga (Univerzita Karlova v Praze/UEM). Os estudos em Praga foram preliminarmente limitados no tempo em função da duração máxima de um ano da concessão da bolsa de Doutorado Sanduiche. Essa limitação impôs a seleção de perguntas para o período no exterior compatíveis com o período da concessão do benefício. De qualquer modo procurou-se nessa fase explorar as potencialidades de melhor infraestrutura diversificando as ferramentas de análise. Assim, os ensaios em Praga foram realizados apenas em animais jovens e envolveram quantificação dos cuidados maternos, análise quantitativa bidimensional para área e número de astrócitos, NG2 e reelina assim como registro de parâmetros difusionais do parênquima hipocampal. Os ensaios experimentais realizados no Brasil embora menos diversificados em suas ferramentas analíticas permitiram a aplicação de testes comportamentais e estudos de neuropatologia quantitativa em ratos jovens e velhos empregando estereologia e reconstrução tridimensional da micróglia.

O texto reflete essas limitações e sua organização sequencial tenta distinguir claramente as contribuições de cada conjunto de estudos separados no tempo e no espaço e contando com infraestruturas bastante diferentes.

Na primeira etapa realizada no Brasil foram usadas as instalações do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, no Hospital Universitário João de Barros Barreto, e a orientação do Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz. Os esforços e o foco dessa fase foram voltados para os efeitos a longo prazo das condições perinatais adversas induzidas pelo aumento do tamanho da ninhada e sua possível recuperação pela adoção de programa de exercício físico na vida adulta em diferentes janelas temporais. Parte dos resultados da primeira fase desses estudos já foram publicados (Viana et al, 2013). Em linhas gerais nesse primeiro manuscrito demonstramos pela primeira vez que o tamanho da ninhada e o envelhecimento alteram o número, a distribuição laminar e a morfologia da população microglial do giro denteado, e essas alterações são acompanhadas de prejuízos no desempenho cognitivo.

Na segunda etapa realizada em Praga, foram utilizadas as instalações do Laboratório do Departamento de Neurociências do Instituto de Medicina Experimental da Charles University em Praga, e a orientação da Prof. Dra. Eva Syková, tendo como foco os efeitos em longo prazo das condições perinatais adversas e do exercício físico tardio sobre elementos da matriz extracelular, astrócitos, células NG2 e sua possível associação com as propriedades difusionais do espaço extracelular. Nesse ensaio caracterizamos pela primeira vez as propriedades difusionais *in vitro* do giro denteado e de CA1 de ratos Wistar, bem como as alterações difusionais associadas às condições perinatais adversas e ao exercício físico. Além disso investigamos possível associação de tais alterações com o padrão de proliferação de células NG2 e reelin-positivas, ainda não descritos na literatura.

É importante considerar que em ambas as fases, apesar dos focos em aspectos morfofuncionais distintos e da utilização de técnicas diferenciadas de acordo com as facilidades oferecidas em cada um dos laboratórios, um objetivo principal norteou todo o desenvolvimento dessas pesquisas: descrever a importância dos eventos perinatais para o estabelecimento do status cognitivo tardio e para a integridade da matriz extracelular e da glia na vida adulta e explorar a possibilidade de usar o exercício físico para minimizar as influências deletérias associadas à redução do cuidado materno.

Dessa forma, o texto se inicia com uma Introdução Geral que descreve a fundamentação teórica do trabalho comum a ambas as fases. Os itens subsequentes tratam de cada uma das fases da pesquisa separadamente, com seus respectivos referenciais teóricos, metodologia e resultados. A Discussão entretanto tenta integrar os efeitos convergentes observados em cada uma das fases, analisando, comparando e debatendo cada um dos ensaios bem como estabelecendo as possíveis relações entre os dados obtidos definindo os limites metodológicos de cada abordagem experimental.

## **1- A importância do tamanho da ninhada e suas consequências sobre as circunstâncias ambientais do neonato.**

### ***1.1- As condições ambientais no período perinatal e suas influências sobre o desenvolvimento encefálico do neonato.***

Há algumas décadas o conceito de que as experiências nas primeiras fases de vida influenciam em longo prazo o funcionamento do encéfalo vem sendo extensamente estudado e discutido. Desses estudos reconhece-se que os programas genéticos que determinam a sequência e os níveis de expressão de genes neuronais específicos podem ser modificados pelas experiências vividas durante os períodos críticos de desenvolvimento (Meaney, 2001; Roth et al, 2009; Dang et al, 2011; Blaze e Roth, 2013; Blaze et al, 2013).

Portanto já se toma como certo que um ambiente hostil no início da vida pode afetar o desenvolvimento do sistema nervoso e induzir alterações comportamentais, e a partir de ensaios experimentais em modelos animais há evidências de que mecanismos epigenéticos desempenham um papel crítico nesse processo. De fato o nível de estresse materno pré-natal, a redução do cuidado materno pós-natal, as condições nutricionais nos períodos pré- e pós-natal e a alteração dos níveis de competição em função do tamanho da ninhada podem levar a alterações de longo prazo na resposta ao estresse, na plasticidade neuronal e glial e no comportamento (Gudsnuk e Champagne, 2011; Cabrera et al, 2013).

Essas mudanças prejudiciais se estabelecem sobretudo durante as primeiras fases do desenvolvimento, quando o sistema nervoso é mais suscetível a mudanças ambientais. A extensão e a duração desses déficits depende da intensidade e da fase do desenvolvimento em que se instalam (Archer, 2011). De todas as janelas do desenvolvimento, o período de desenvolvimento cerebral rápido, descrito na literatura como *Brain Growth Spurt* (Dobbing e Sands, 1971; Dobbing e Sands, 1979; Morgane et al, 2002) é a mais vulnerável. Durante esse período, o sistema nervoso em desenvolvimento passa por mudanças em todas as escalas e isso inclui neurogênese, gliogênese, migração celular, mielinização, proliferação e ramificação de dendritos e

axônios e estabelecimento de sinapses no cérebro em desenvolvimento, possibilitando alterações em uma miríade de processos reguladores e de expressão genética que controlam nas várias escalas as transformações associadas (Dobbing, 1971; Dobbing, 1974; Dobbing e Sands, 1979).

Dentre os fatores ambientais adversos destacam-se a nutrição inadequada, alto nível de competição entre os filhotes por tetas funcionais e redução do cuidado materno. Estes fatores podem influenciar o desenvolvimento do encéfalo, que é geneticamente programado para crescer mais rápido do que o restante do organismo (Dobbing e Sands, 1973; Morgane et al, 2002; Laus et al, 2011).

Há entre as diversas espécies de mamíferos uma grande diferença com relação à janela temporal na qual o período de desenvolvimento encefálico rápido acontece. Em humanos ele possui uma fase pré-natal e uma pós-natal, estendendo-se desde os últimos três meses de vida intrauterina até a metade do terceiro ano de vida pós-natal. Em roedores esse período é predominantemente pós-natal, com seu pico ocorrendo por volta dos 14 dias de vida pós-natal, seguido de uma desaceleração gradativa dos eventos plásticos até o 21º dia pós-natal, coincidindo com o período de amamentação (Dobbing, 1974; Dobbing e Sands, 1979) (Figura 1).

As sequências de eventos plásticos que ocorrem no sistema nervoso no início do desenvolvimento são função da expressão gênica, porém essa regulação genética pode sofrer alterações por fatores epigenéticos, que podem perdurar por toda a vida, especialmente se tais fatores ocorrem nas fases mais vulneráveis (Archer, 2011; Blaze et al, 2013). Apesar da importância dos fatores ambientais no desenvolvimento encefálico ser consensual, e grande parte das alterações neuronais já ter sido documentada os efeitos em longo prazo dessas alterações no cérebro adulto e envelhecido sobre os elementos gliais, de matriz extracelular e sobre os parâmetros difusionais do espaço extracelular não são conhecidos.

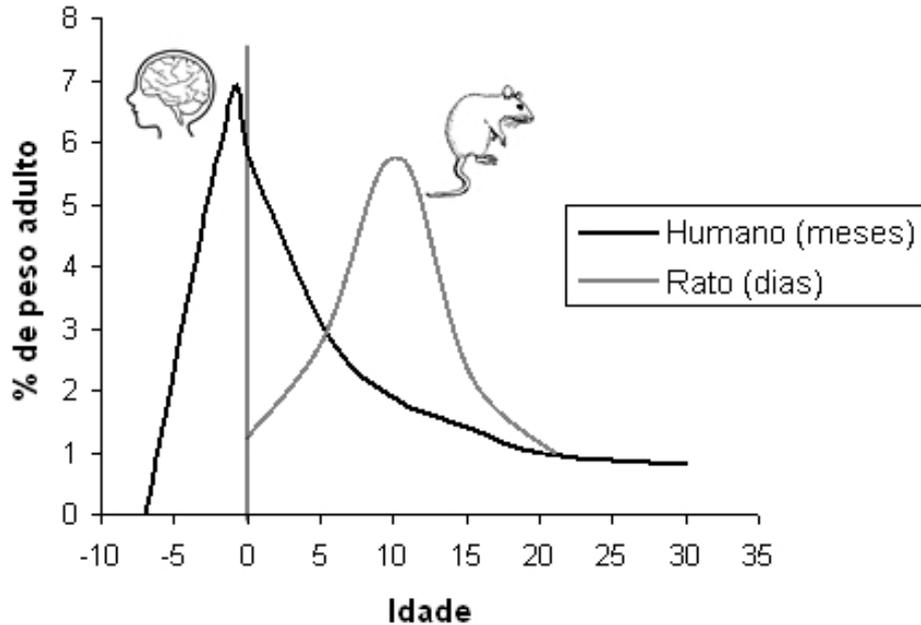


Figura 1. Período de crescimento encefálico rápido em humanos e ratos. O marco 0 no eixo da idade marca o momento do nascimento. Observe que em humanos (medido em meses) o pico do desenvolvimento encefálico é predominantemente pré-natal, enquanto que em ratos (medido em dias) acontece por volta da segunda semana pós-natal. Adaptado de (Dobbing, 1974).

Em resumo, os fatores que interferem no desenvolvimento encefálico podem ser classificados em três categorias: perfil genético, fatores ambientais e nutrição cujas alterações isoladas ou combinadas podem levar a disfunções no desenvolvimento e que se manifestam por alterações morfofuncionais em diferentes escalas com repercussões comportamentais permanentes ou transitórias (Katz e Davies, 1982; Borba et al, 2000; Rocha-de-Melo et al, 2004).

### ***1.2- O cuidado materno e padrões comportamentais relacionados.***

Para a maior parte das espécies de vertebrados, os cuidados recebidos por parte de um ou ambos os pais durante as primeiras fases de vida constituem um fator crítico para a sobrevivência e o desenvolvimento das crias. Uma forte ligação da prole com a mãe é característica para muitas espécies. De fato, uma relação estável entre progenitores e progênie é essencial para a sobrevivência dos filhotes particularmente em

espécies cujos nascituros são muito dependentes nas primeiras fases de vida, como é o caso dos humanos (Moriceau e Sullivan, 2005)

Os padrões comportamentais relacionados ao ato de cuidar podem ser classificados como diretos (alimentar, carregar, limpar, arrumar) ou indiretos (defender território, construir ninhos, buscar alimento), podendo ser exibidos por um ou ambos os progenitores (Michel e Tyler, 2007; Bonsall e Klug, 2011). Nos mamíferos, entretanto, as mães são as principais cuidadoras. Durante o desenvolvimento inicial, mãe e filhote podem ser considerados uma unidade biológica. Os cuidados maternos e os períodos intercalados de amamentação são mediados por fatores hormonais e pela complexa inter-relação entre a sinalização materna e dos filhotes (Pryce et al, 2001). O ambiente proporcionado nessa fase pode produzir impactos que influenciam respostas metabólicas para o resto da vida.

Nos mamíferos, a mãe é a fonte nutricional exclusiva do infante nas primeiras fases de vida. No entanto, a relação complexa mãe-infante vai além do simples suprimento das necessidades nutricionais. A mãe representa nesse período a fonte primordial de estímulos térmicos, somatossensoriais olfatórios, visuais e auditivos, indispensáveis ao desenvolvimento dos sistemas neurais (Moore et al, 1997).

Todos os comportamentos maternos são desencadeados como resultado da liberação orquestrada de hormônios durante as fases reprodutivas. Sob a influência dos hormônios maternos, os comportamentos característicos de cuidado em relação à prole se expressam antes mesmo do nascimento, e à medida que os mesmos emergem do canal de parto (Hayes e De Vries, 2007; Kinsley e Amory-Meyer, 2011; Olazabal et al, 2013). Tipicamente, ratas parem ninhadas que variam entre 6 a 16 filhotes, com aproximadamente 50% de machos e de fêmeas (Rees et al, 2005). Geralmente, na primeira hora após o parto, após a limpeza dos filhotes, a mãe os organiza no ninho e adota as posturas características do cuidado materno, sem necessidade de qualquer experiência prévia envolvendo filhotes (Fleming e Rosenblatt, 1974; Bridges, 1996). De fato, a incubação dos hormônios presentes nessa fase no encéfalo de ratas virgens é suficiente para desencadear tais comportamentos (Prilusky, 1981). A manutenção do comportamento materno em relação à prole, todavia, é sustentado através dos *inputs* sensoriais, e.g. estímulo de sucção, provenientes dos filhotes no período pós-parto (Li e

Fleming, 2003). Mecanismos motivacionais também parecem ser importantes para a manutenção e as variações no comportamento materno (Olazabal et al, 2013).

A relação mãe-filhote no período pós-parto é tida como uma relação tipicamente simbiótica. Em roedores, a relação da mãe com sua prole envolve a participação de ambas as partes. Uma vez decorrido o parto sob influências hormonais, os comportamentos de cuidado materno são bastante intensos nas primeiras semanas. Até o 10º dia pós-natal, a circuitaria neural dos ratos apresenta adaptações peculiares para o desenvolvimento de um forte apego pela mãe, independentemente da qualidade do cuidado materno recebido (Moriceau e Sullivan, 2005; Landers e Sullivan, 2012). À medida que os filhotes vão se aproximando do desmame, os comportamentos de cuidado materno tendem a reduzir sua apresentação e frequência, com o desmame ocorrendo normalmente entre o 21º e o 30º dia pós-natal (Whishaw e Kolb, 2004). O desmame é caracterizado pela redução dramática do tempo que os filhotes permanecem no ninho e pelo afastamento da mãe quando os filhotes aproximam-se na tentativa de alcançar as tetas. Durante o período de lactação, os filhotes ficam gradativamente mais independentes, e após a segunda semana de vida a alimentação dos mesmos deixa de ser composta exclusivamente do leite materno, comendo inicialmente migalhas ao redor da boca e no pelo da mãe, e posteriormente distanciando-se do ninho e alimentando-se de ração (Whishaw e Kolb, 2004; Rees et al, 2005).

As variações no comportamento materno em roedores refletem-se nas diferenças no lambar, carregar e amamentar os filhotes com o dorso arcado, bem como arrumá-los reunindo-os debaixo de seu corpo. Esse conjunto de comportamentos maternos tem sido descrito na literatura pela sigla LG-ABN (*Licking and Grooming & Arched-Back Nursing*) (Fish et al, 2004), e os padrões comportamentais nessa fase podem ser transmitidos entre gerações (Francis et al, 1999). Dentro e entre as linhagens de ratos e camundongos, as fêmeas lactantes apresentam uma série de cuidados com frequências que variam consideravelmente (Champagne et al, 2003; Shoji e Kato, 2006) Uriarte e colaboradores observaram tais variações em ratas da linhagem Wistar (Uriarte et al, 2007).

O cuidado materno-filial pode ser estudado através do exame dos componentes do cuidado materno, que incluem diversos comportamentos tais como a construção do ninho, lambar, carregar os filhotes, cobri-los com o corpo, e as posturas características

da amamentação. Esses comportamentos são amplamente observados nos protocolos de classificação comportamental do cuidado materno (Meaney, 2001; Uriarte et al, 2007) e podem ser facilmente identificados por um observador atento. Uma descrição mais detalhada dos principais comportamentos maternos está apresentada a seguir:

- *Recuperação/recolhimento de filhotes.*

Consiste no comportamento da mãe em carregar o filhote para o ninho ou trocar todos os filhotes de local, onde será construído o novo ninho. Quando separados de suas mães, os filhotes emitem sinais olfativos, visuais e auditivos para a mãe que responde recolhendo-os de volta ao ninho (Wilkins et al, 1997). Após a recolhida, a mãe geralmente os lambe e os cobre com o corpo, o que é muito importante para a proteção e regulação da temperatura corporal dos mesmos (Cantoni e Brown, 1997). Esse comportamento é observado de forma mais frequente após o parto, quando os filhotes tendem a ficar espalhados ao redor do ninho. Testes utilizando este comportamento medem o nível de motivação maternal da fêmea (Stolzenberg et al, 2012).

- *Lambidas.*

O comportamento de lambida dos filhotes consiste em uma fonte importante de estímulos sensoriais, influenciando na emocionalidade (Pittet et al, 2013), responsividade ao estresse (Francis et al, 1999), aspectos cognitivos (Bagot et al, 2009) e fisiológicos (Meaney et al, 1993). A lambida pode ser dividida em corporal ou anogenital. A lambida corporal ocorre durante diversos momentos, enquanto a anogenital tende a ocorrer durante a amamentação, com os filhotes em decúbito dorsal (Figura 2). Os filhotes participam ativamente na interação da lambida anogenital, e apresentam extensão dos membros inferiores em resposta ao estímulo de lambida. Os machos são geralmente mais lambidos que as fêmeas, provavelmente pelo fato de responderem mais rapidamente à estimulação materna que as fêmeas, ou porque eles possuem um odor diferente (Moore e Morelli, 1979; Moore e Chadwick-Dias, 1986).

*- Posturas de amamentação.*

As posturas cifóticas características da amamentação têm como objetivo facilitar o acesso dos filhotes às tetas, além de regular sua temperatura e protegê-los de elementos externos. Estas posturas apresentam certas variações, podendo a fêmea apresentar-se quiescente ou ativamente lambendo os filhotes e reorganizando o ninho enquanto os filhotes mamam. Geralmente quando a estimulação fornecida pelos filhotes é suficiente, a fêmea geralmente aquiesce em posição inclinada, com as patas estendidas e a coluna arqueada (Moore et al, 1997; Whishaw e Kolb, 2004). Apesar da fêmea permanecer em repouso nessa postura, é comum observar a realização da lambida anogenital quando das posições inclinadas. Dependendo do grau de arqueamento da coluna, as posturas inclinadas são divididas em inclinação alta e inclinação baixa. Uma terceira posição, um pouco menos frequente, é a posição supina. Nesta, a fêmea encontra-se em decúbito lateral ou dorsal, fornecendo aos filhotes acesso às tetas. A quantidade e a duração da apresentação das posturas de amamentação diárias tende a declinar a partir da metade do período de lactação em diante, acompanhando o decréscimo na produção do leite, à medida em que os filhotes tornam-se mais independentes (Numan e Insel, 2003).

*- Construção do ninho.*

É um comportamento tipicamente observado durante o período pós-parto e a lactação. Consiste no deslocamento de material por parte da fêmea, geralmente para um canto, para a construção do ninho. Algumas vezes, antes do parto a fêmea já apresenta este comportamento desencadeado por influência hormonal. Nas primeiras semanas, a mudança da posição do ninho é mais frequente, reduzindo gradativamente até o desmame, onde o ninho deixa de ser construído pela fêmea.

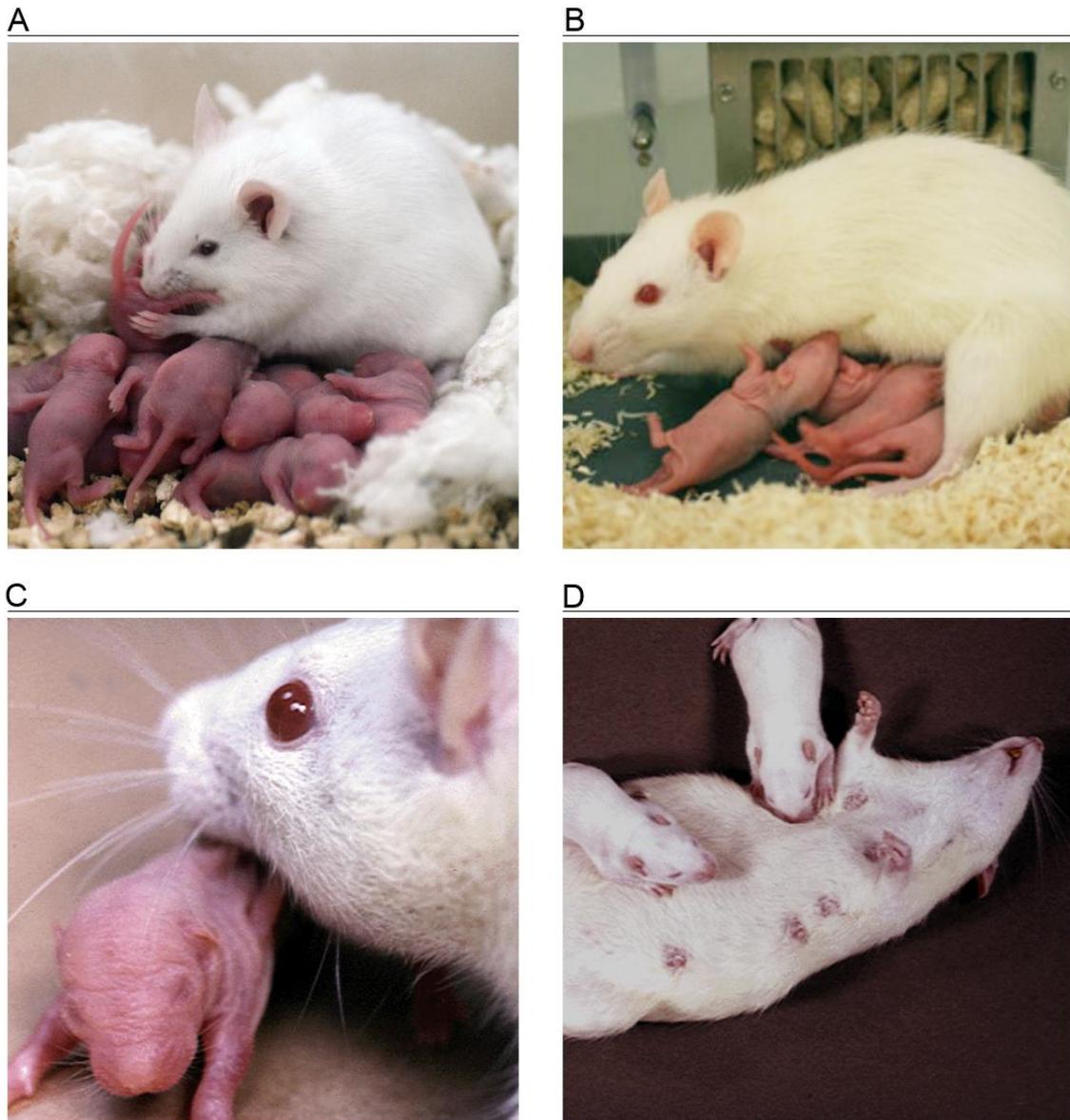


Figura 2. Exemplos de comportamentos maternos característicos em roedores. A) postura de amamentação acompanhada de lambida anogenital; B) postura de amamentação com inclinação alta; C) recolhida de filhote; D) posição supina de amamentação.

Nas primeiras semanas após o parto, os mecanismos hormonais são responsáveis pela ocorrência dos comportamentos maternos. Posteriormente, mecanismos de memória relacionados às experiências com os filhotes mantêm a manifestação comportamental (Numan e Insel, 2003).

### ***1.3- O cuidado materno, o tamanho da ninhada e os mecanismos neuroendócrinos de resposta ao estresse.***

O ambiente social e familiar, bem como o contato mãe-filho são capazes de moderar o impacto da predisposição genética para desenvolver desordens relacionadas ao estresse (Leiderman e Seashore, 1975; Tyrka et al, 2008; Dageville et al, 2011). Os mecanismos de retroalimentação negativa ao estresse são em parte regulados pela interação mãe-filhote, sendo prejudicados pela privação dos cuidados maternos (Meaney et al, 1993).

Variações no cuidado materno são capazes de regular as respostas do sistema neuroendócrino a fatores estressores na vida adulta (Levine, 2001; Tyrka et al, 2008; Coutellier et al, 2009). A deficiência no cuidado materno acarreta uma hiper-responsividade ao estresse, deixando os indivíduos submetidos a essa condição mais susceptíveis a doenças e alterações comportamentais quando adultos (Engert et al, 2010; Korosi e Baram, 2010; Korosi et al, 2010).

A manutenção da homeostase nos mamíferos ocorre pela ação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que funciona em conjunto com os neurônios noradrenérgicos do sistema nervoso central. Essas estruturas são controladas pelos núcleos do sistema nervoso autônomo e pelo sistema límbico. Os estímulos estressores convergem para os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo gerando a ativação do eixo HPA, através da liberação de hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e vasopressina (VP) pelos neurônios hipotalâmicos (Matteri et al, 2000). CRH e VP estimulando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior, o que por sua vez induz a liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos, corticosterona em ratos) pelo córtex adrenal (Figura 3). Os glicocorticoides agem em diversos tecidos-alvo, e potencializam a síntese e ação das catecolaminas (Teixeira et al, 2008).

A ativação do eixo HPA é essencial para a manutenção da vida, porém sua inativação também exerce um papel muito importante na manutenção do funcionamento do organismo. Quando mantidos em concentrações suficientes, os glicocorticóides estão relacionados a mecanismos de manutenção da homeostase. Entretanto, a exposição

contínua a elevadas concentrações desses hormônios representa risco para o organismo. Exposição crônica a níveis elevados de glicocorticóides resultam no catabolismo de proteínas, supressão dos processos anabólicos, hiperglicemia, imunossupressão, depressão, distúrbios do sistema nervoso central, redução do volume hipocampal e prejuízo do desempenho cognitivo (Meaney et al, 1993; McEwen e Sapolsky, 1995).

A inativação das respostas de estresse no eixo HPA acontece numa alça de retroalimentação negativa onde os glicocorticóides inibem a liberação do ACTH, reduzindo as concentrações de RNAm para a expressão de CRH e inibição do núcleo paraventricular do hipotálamo (Meaney et al, 1993). Aparentemente, as células gliais estão envolvidas nesses mecanismos, pois exercem um papel importante na modulação da ativação dos neurônios magnocelulares do sistema neuroendócrino, e essa regulação glial participa da coordenação da atividade da população neural nas respostas a circunstâncias fisiológicas variadas (Tasker et al, 2011).

O hipocampo apresenta papel significativo no controle das respostas fisiológicas ao estresse (Figura 3). Ele representa um alvo primário para a ação dos corticosteroides no sistema nervoso central (McEwen et al, 1968; Jankord e Herman, 2008). Existem projeções multissinápticas entre o hipocampo e o núcleo paraventricular do hipotálamo que estão envolvidas no controle da atividade do eixo HPA (Fink, 2010). A inibição das respostas do eixo HPA pelo hipocampo parece dar-se principalmente por mecanismos que envolvem a retroalimentação negativa da corticosterona. A ativação dos receptores de corticosterona no hipocampo inicia o feedback através de projeções inibitórias que reduzem a atividade do sistema HPA aos níveis basais (Brown et al, 1999; Fink, 2010).

Uma das consequências da interação mãe-filhote é a inibição funcional dessas vias neurais que são responsáveis pela ativação da cascata neuroendócrina requerida para evocar uma resposta do ACTH (van Oers et al, 1998). Os receptores glicocorticoides no hipocampo parecem ser os principais elementos envolvidos nesses mecanismos. Quando ativados por uma quantidade suficiente dos seus ligantes, os receptores glicocorticoides iniciam uma cascata de sinais através do hipocampo que desativam os circuitos de estresse, reduzindo a produção de corticosterona/cortisol. Ratos e humanos com níveis mais elevados de receptores glicocorticóides detectam mais facilmente a substância e recuperam mais rapidamente suas respostas endócrinas aos níveis basais em situações de estresse (Weaver et al, 2004; Weaver, 2007).

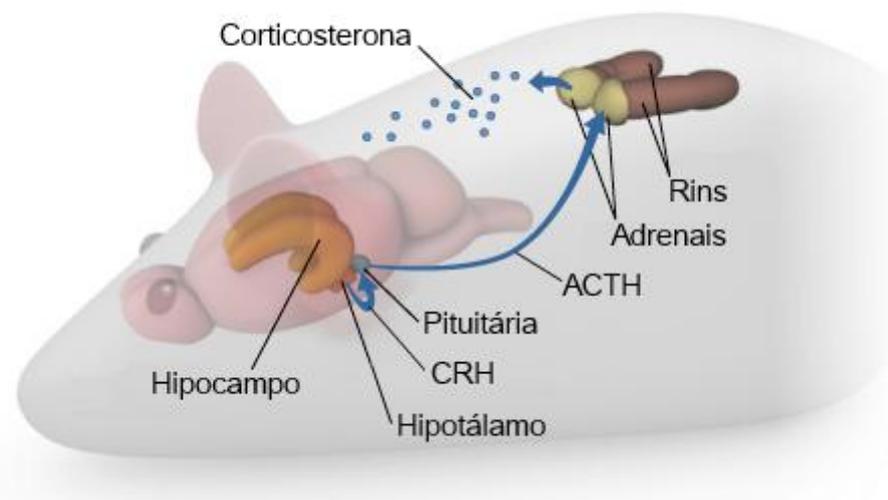


Figura 3. Os circuitos de resposta ao estresse. Os estímulos estressores são transmitidos pelos diversos córtices primários e associativos ao hipotálamo, que envia sinais à hipófise através do CRH. Esta libera o ACTH que sinaliza às glândulas adrenais para a liberação de glicocorticóides e adrenalina (não mostrada). Os receptores hipocampais detectam o cortisol através de seus receptores e enviam sinais inibitórios ao hipotálamo reduzindo as respostas do circuito. Adaptado de (Genetic\_Science\_Learning\_Center, 2014).

Recentemente, Meaney e colaboradores demonstraram que o cuidado materno está diretamente relacionado ao padrão de expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo, através da redução da taxa de metilação dos genes codificadores desses receptores associado ao aumento da acetilação das histonas relacionadas a essas sequências (Meaney, 2001; Meaney e Szyf, 2005). O aumento da expressão dos receptores glicocorticóides está correlacionada à expressão da proteína A induzida por fator de crescimento neural (NGFI-A: *nerve growth factor-inducible protein A*), que apresenta um sítio de ligação no exon 1 do gene codificador dos receptores glicocorticóides. A expressão da proteína NGFI-A é elevada nos animais que recebem maior quantidade de cuidados maternos, aparentemente por mecanismos envolvendo a liberação de serotonina, que ocorre em grandes quantidades em resposta à lambida anogenital. A liberação de serotonina aumenta a expressão de NGFIA, com consequente aumento da expressão dos receptores glicocorticóides (Laplante et al, 2002; Andrews et al, 2004; Hellstrom et al, 2004; Hellstrom et al, 2012).

Assim, o comportamento materno tem capacidade de suprimir e servir como fonte reguladora da resposta de estresse do filhote. Durante o período pós-natal, a mãe parece ativamente inibir o eixo HPA nos filhotes. Segundo Levine (Levine, 2000), o

comportamento de lambe a prole no sentido anogenital exerce controle inibitório sobre a liberação de ACTH no filhote, bem como o aleitamento também reduz as concentrações de corticosterona.

Essas manipulações que alteram o comportamento materno durante os períodos críticos de desenvolvimento podem modificar permanentemente o nível de responsividade do eixo HPA, aparentemente pela alteração da expressão de alguns genes, que predizem o perfil fenotípico no adulto e idoso. É importante acrescentar que estudos com adoção cruzada demonstraram que essas mudanças fenotípicas são relacionadas ao nível de cuidado materno recebido no período pós-parto e não a fatores genéticos ou pré-natais (Francis et al, 1999; Champagne et al, 2003). De fato, Lonstein e colaboradores demonstraram que o cuidado materno provoca o aumento da expressão de c-Fos no encéfalo de ratos. O gene c-Fos faz parte de uma família de genes de resposta imediata (IEG: *immediate-early genes*), que são ativados imediatamente após um estímulo em particular e iniciam uma cascata de eventos neurais, podendo ser utilizados como marcadores da excitação neural ou para identificar as alterações desencadeadas por um determinado estímulo (Lonstein e De Vries, 2000; Lonstein et al, 2000).

Em humanos, diversos estudos indicam que a qualidade da vida familiar na infância influencia a vulnerabilidade do adulto ao estresse e a doenças (Zavaschi et al, 2002; Tyrka et al, 2008; Engert et al, 2010). Crianças vítimas de abuso durante a infância são mais susceptíveis à doenças, e crianças criadas com pais negligentes apresentam um maior risco de desenvolvimento de depressão na vida adulta (Blowby, 1952; Rey, 1995). A relação entre os eventos ocorridos nas primeiras fases de vida e a saúde do adulto parecem ser, ao menos em parte, mediadas pela influência dos cuidados dos pais no desenvolvimento dos sistemas neurais que servem de base para a expressão das respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse (Korosi et al, 2010; Walker, 2010).

#### ***1.4- O período de hiporresponsividade ao estresse e a importância do cuidado materno para sua manutenção.***

No rato, animal de interesse para o presente trabalho, durante o período de desenvolvimento encefálico rápido, que coincide com o período de lactação, existe uma janela temporal no qual os níveis basais de CRH hipotalâmico, de ACTH hipofisário e de corticosterona no plasma são baixos. Este período, que ocorre durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal é denominado período hiporresponsivo ao estresse. Durante esse período, um estímulo que resultaria no adulto em um aumento das concentrações dos hormônios relacionados ao estresse, não é capaz de gerar tal resposta no infante (Levine, 2001). Nesse período a responsividade do eixo HPA a fatores estressores é mínima, sendo atribuída à grande eficácia da retroalimentação negativa exercida pela corticosterona principalmente sobre o hipocampo (Vazquez et al, 1996; Galeeva et al, 2006). Existem evidências de que esse período também exista em humanos (Silveira et al, 2007). Diversos experimentos têm demonstrado que fatores maternos são críticos para a regulação da responsividade do eixo HPA do filhote e manutenção do período de hiporresponsividade (Levine, 1994; Rhees et al, 2001).

O período de hiporresponsividade ao estresse é crítico para o desenvolvimento neural, durante o qual processos de crescimento e morte celular, divisão, diferenciação, migração neuronal e glial e sinaptogênese ocorrem e constituem o substrato morfofuncional do período de crescimento rápido do encéfalo (Gonzalez et al, 1994). Essa hiporresponsividade a fatores estressantes permite o desenvolvimento de tais eventos na ausência de secreção de altos níveis de glicocorticóides, que acarretariam redução no padrão mitótico, da mielinização e da diferenciação, prejudicando o funcionamento normal do encéfalo (Levine, 1994; Levine, 2001; Sanchez, 2006).

Aparentemente, a manutenção do nível de hiporresponsividade do eixo HPA no neonato está diretamente relacionado ao nível de cuidado materno recebido pelo animal (Korosi et al, 2010). Existem diversos protocolos experimentais que podem induzir alterações para mais ou para menos no nível de responsividade ao estresse do filhote, e geralmente estes protocolos estão centrados na alteração do nível de cuidado materno ofertado (de Kloet et al, 1996; Enthoven et al, 2008).

Períodos curtos de privação materna causam um aumento do cuidado materno subsequente, com maior estimulação sensorial, causando efeito modulatório no eixo HPA. Como resultado, animais que sofrem privação materna por curtos períodos apresentam aumento da resistência ao estresse e à diminuição da capacidade cognitiva quando adultos (Pryce et al, 2001; Pryce e Feldon, 2003). Entretanto, períodos prolongados de privação ou redução do cuidado materno geram a interrupção do período de hiporresponsividade ao estresse, causando um aumento inapropriado dos níveis de corticosterona, sendo observadas diferentes alterações neurobiológicas que, por ocorrerem no período crítico de desenvolvimento, podem ser duradouras apresentando-se como fator de risco ao desenvolvimento de patologias na vida adulta (Schmidt et al, 2004). De Kloet e colaboradores (de Kloet et al, 1996) demonstraram que tais fatores são críticos para o funcionamento dos receptores de corticosterona e podem alterar o fenótipo dos sistemas dopaminérgicos na vida adulta. Tais dados corroboram os achados de Van Hasselt (van Hasselt et al, 2012) que observaram que as variações individuais de cuidado materno recebidos por animais de uma mesma ninhada estão relacionados com as alterações dos comportamentos sociais dos mesmos durante a adolescência.

### ***1.5- O modelo experimental de manipulação do tamanho da ninhada, a amamentação, os níveis de estresse e o comportamento da fêmea: consequências para o desenvolvimento dos filhotes.***

Um dos métodos experimentais mais simples para induzir uma redução nos cuidados maternos, na oferta de leite e promover um aumento dramático nos níveis de estresse em uma ninhada consiste na manipulação da quantidade de filhotes nela contida. O aumento do tamanho da ninhada acarreta consequências diretas em diversos fatores que não necessariamente estão ligados a alterações nutricionais, e que afetam o desenvolvimento da prole, a saber: aumento da competição pelo acesso ao leite materno, redução da quantidade de cuidados maternos individuais recebidos por filhote e aumento dos níveis de estresse aos quais os animais são submetidos.

A amamentação é elemento chave na sobrevivência e desenvolvimento dos infantes, sendo o leite o alimento exclusivo dos filhotes especialmente durante as duas primeiras semanas de vida. Considerando a quantidade de tetas e a produtividade diferenciada das mesmas (USP, 2003; Santos et al, 2010), nas ninhadas maiores cria-se um ciclo onde os animais mais fortes garantem acesso às tetas, o que faz com que permaneçam sendo os mais fortes. Em casos extremos essa competição pode ser fatal (Cameron, 1973; Stockley e Parker, 2002; Zhang et al, 2011).

O tamanho da ninhada nesses animais pode representar diferenças no desenvolvimento dos mesmos. Especialmente em ninhadas maiores, a competição pelo acesso ao leite materno tende a ser maior podendo alterar os padrões de desenvolvimento individuais. As fêmeas de rato e camundongo possuem 10 tetas, sendo que duas das tetas superiores não produzem leite (Santos et al, 2010). Assim, em ninhadas acima de oito filhotes o número de tetas não é suficiente para a quantidade de filhotes.

Em fêmeas normais, o desempenho comportamental e de lactação parecem sofrer influências do tamanho da ninhada (Grotta e Ader, 1969; Grotta, 1973). Observações diretas do comportamento durante a fase de amamentação em camundongos, demonstraram que as fêmeas com ninhadas pequenas gastam mais tempo no ninho com os filhotes comparado às fêmeas com ninhadas grandes, que passam mais tempo alimentando-se, provavelmente por causa do aumento nas exigências nutricionais para amamentar uma ninhada maior (Priestnall, 1972).

Apesar dessas diferenças, o aumento do tamanho da ninhada não necessariamente significa a indução de um quadro de desnutrição (Chahoud e Paumgarten, 2009; Bulfin et al, 2011). Existem evidências indicando que a produção de leite da mãe é regulada pelo tamanho da ninhada, sendo assim aumentado em ninhadas com maior número de filhotes como consequência da maior quantidade de estímulos sensoriais de sucção das mamas e estímulos tácteis provenientes do contato com os filhotes (Yagil et al, 1976; Russell, 1980). Estudos detalhados acerca do gasto energético da mãe em função do tamanho da ninhada demonstraram, utilizando ninhadas pequenas (seis filhotes) e grandes (doze filhotes), que a demanda de energia da mãe é aumentada nas ninhadas maiores tanto pelo aumento da quantidade de leite como pela manutenção da qualidade do mesmo (concentrações de proteínas, lactose e ácidos

graxos de cadeia longa), tendo seu pico entre o nono e o décimo sexto dia de lactação (Russell, 1980; Kounig et al, 2009). Entretanto, apesar desse aumento, Kounig e colaboradores (Kounig et al, 2009) demonstraram que essa regulação é imperfeita. Quando o tamanho da ninhada foi aumentado de seis para doze filhotes, a quantidade de leite produzido aumentou apenas 44%, e o conteúdo energético do mesmo aumentou apenas 30%. Da mesma forma, a eficiência na conversão de energia em biomassa foi maior nas ninhadas menores (51%) quando comparado com as ninhadas maiores (36%). Igualmente importante é lembrar da composição relativa do leite materno, em especial os ácidos graxos de cadeia longa que podem ser alterados em sua composição centesimal em situações extremas, afetando o desenvolvimento adequado das redes neurais (Janssen e Kiliaan, 2013).

Essas diferenças refletem-se na desaceleração do crescimento e no reduzido peso corporal dos animais das ninhadas maiores ao desmame. Esses dados corroboram outros estudos, alguns deles previamente realizados em nosso laboratório, onde animais criados em ninhadas maiores apresentaram não somente redução significativa do peso corporal como também alterações em diversas áreas encefálicas (Picanço-Diniz et al, 1998; Borba et al, 2000; Rocha-de-Melo et al, 2004; Maia et al, 2006; Viana et al, 2007). Outros autores também demonstraram previamente que a quantidade de leite materno obtido por filhote e o ganho de peso da ninhada são inversamente proporcionais ao tamanho da mesma (Kumaresan et al, 1967; Epstein, 1978; Hudson et al, 2011).

A quantidade de leite e o esforço empregado para garantir o acesso à teta durante o período de desenvolvimento encefálico rápido são fatores que apresentam forte influência na função encefálica durante a vida adulta. Existem evidências de que os constituintes do leite materno promovem o desenvolvimento das estruturas encefálicas, e a quantidade de leite recebido pelo infante pode se refletir no seu desempenho cognitivo futuro (Michaelsen et al, 2009; Isaacs et al, 2010).

Por simples observação do número de filhotes por mãe nas ninhadas grandes, podemos sugerir que a demanda por cuidados maternos individuais dobra nessas ninhadas. Como a demanda energética obriga a nutriz a reduzir os cuidados para prover mais tempo à busca por alimento em resposta a demanda nutricional aumentada pelo número aumentado de filhotes, a redução dos cuidados maternos por filhote em

ninhadas grandes é inevitável (Grota e Ader, 1969; Grota e Ader, 1969; Priestnall, 1972; Grota, 1973).

Entretanto, muitos dos ensaios realizados com o objetivo de observar a influência do cuidado materno sobre o desenvolvimento dos filhotes têm utilizado como modelo experimental fêmeas que apresentam alterações no comportamento materno, com comportamentos extremos de maior ou menor frequência de cuidados com os filhotes (Meaney, 2001; Champagne et al, 2003). Todavia, observações realizadas acerca do comportamento de fêmeas de *Rattus norvegicus* demonstram que a frequência nos cuidados de lambar, carregar, amamentar com o dorso arcado e outros cuidados maternos característicos dessa espécie seguem um padrão estatístico de distribuição normal entre as fêmeas (Grota e Ader, 1969; Ader e Grota, 1970; Meaney, 2001). Em função desse padrão de distribuição as fêmeas que tem sido objeto de estudos frequentes e que apresentam altos e baixos índices de tais cuidados são as duas extremidades desse contínuo (Champagne et al, 2001). Tomadas essas observações em conjunto é razoável supor que a trilogia, cuidado materno, competição entre irmãos e a oferta adequada de leite materno pode ser alterada, alterando-se simplesmente o número de filhotes por nutriz e que as influências dessas alterações podem ser medidas em curto e longo prazos utilizando-se diferentes ensaios em diferentes níveis de interesse: do molecular ao comportamental.

## **2. Hipocampo, cognição, intervenções ambientais e arquitetura tecidual.**

### ***2.1- O hipocampo e as relações entre desempenho cognitivo, cuidado materno e envelhecimento.***

Uma das principais estruturas encefálicas afetadas pelas condições adversas nas primeiras fases de vida é o hipocampo, uma estrutura localizada profundamente no lobo temporal medial que tem funções importantes nos processos cognitivos e de formação da memória (Sweatt, 2004; Solari e Stoner, 2011). A integridade do hipocampo é essencial para a formação de certos tipos de memória e aprendizado. Sua participação nos processos cognitivos entretanto vai muito além do seu papel já reconhecido de estrutura essencial para consolidação das memórias do tempo presente (Levy et al, 2004; Squire, 2004; Squire et al, 2004; Sweatt, 2004), que em geral são afetadas à medida em que o envelhecimento se instala. Embora ainda se desconheça muito da neurobiologia do envelhecimento e dos mecanismos que comprometem o desempenho cognitivo nesse período da vida, pesquisas recentes baseadas nas diferenças individuais estão ajudando a distinguir os limites entre o normal e patológico (Hedden e Gabrieli, 2004).

A plasticidade hipocampal pode ser alterada pelas experiências indutoras de estresse ou de enriquecimento ambiental com consequências para a estrutura e função. Em ratos, onde as fêmeas são as únicas cuidadoras da ninhada, a redução do cuidado materno está associada à alterações na neurogênese e na sobrevivência neuronal no hipocampo adulto e redução no desempenho em testes cognitivos (Oitzl et al, 2000; Bredy et al, 2003; Mirescu et al, 2004). Da mesma forma, o aumento do cuidado materno no rato promove sinaptogênese e melhora do desempenho cognitivo em testes de aprendizado espacial (Liu et al, 2000).

Estudos prévios mostram que a redução do cuidado materno leva a alterações morfológicas e funcionais de neurônios do giro denteado de ratos, com redução da complexidade de ramos dendríticos e redução da potenciação de longa duração (LTP) quando comparados com animais que receberam cuidado materno regular (Champagne et al, 2008; Bagot et al, 2009). As alterações comportamentais e cognitivas dos

indivíduos submetidos a condições adversas nas primeiras fases de vida, especialmente com relação à função hipocampal, possuem bases moleculares ainda não totalmente elucidadas, entretanto diversos trabalhos identificaram que tais condições levam especialmente a alterações na expressão de diversos genes, afetando a produção de substâncias neuroativas como neuropeptídeo Y, BDNF e receptores de glicocorticóides (Husum et al, 2002; Nassar et al, 2011; van Hasselt et al, 2012).

Além das funções na consolidação da memória, o hipocampo também apresenta papel significativo no controle das respostas fisiológicas ao estresse. O hipocampo representa um alvo primário para a ação dos corticosteroides no sistema nervoso central (McEwen et al, 1968). Existem projeções multissinápticas entre o hipocampo e o núcleo paraventricular do hipotálamo que estão envolvidas no controle da atividade do eixo HPA (Fink, 2010). A inibição das respostas do eixo HPA pelo hipocampo parece dar-se principalmente por mecanismos que envolvem a retroalimentação negativa da corticosterona. A ativação dos receptores de corticosterona no hipocampo inicia o feedback através de projeções inibitórias que reduzem a atividade do sistema HPA aos níveis basais (Brown et al, 1999; Fink, 2010).

Evidências experimentais indicam que as alterações dos níveis de corticosterona produzidos pela atividade do eixo HPA podem alterar o padrão elétrico dos neurônios nas regiões CA1 e CA3, e que eletroestimulações nessas regiões exercem alterações no padrão de atividade do núcleo paraventricular do hipotálamo (Mandell et al, 1963; Birnstiel et al, 1995). Além disso, Brady e colaboradores observaram que a destruição das células granulares do giro denteado produz alterações nos níveis de RNAm para CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo, bem como na expressão dos receptores de corticoides no hipocampo (Brady et al, 1992). Esses resultados demonstram que as diferentes áreas da formação hipocampal são importantes na regulação do funcionamento do eixo HPA nas respostas a fatores ambientais de estresse. Outras evidências demonstram que o CRH pode agir como um neurotransmissor ou neuromodulador em circuitos extra-hipotalâmicos que incluem áreas como o hipocampo (Carrasco e Van de Kar, 2003).

O aumento nos níveis de corticosteroides pode acarretar alterações negativas no hipocampo e diversos experimentos em modelos animais demonstraram que um excesso de corticosteroides pode causar alterações algumas vezes irreversíveis na estrutura

hipocampal e no desempenho cognitivo (Lupien e McEwen, 1997; Brown et al, 1999; Schwabe, 2013). Um conjunto de funções cognitivas envolvendo raciocínio indutivo, orientação espacial, velocidade perceptual, capacidade numérica, capacidade verbal e memória episódica parecem mostrar perdas que guardam estreita correlação com o envelhecimento (Hedden e Gabrieli, 2004), e os níveis plasmáticos de glicocorticóides tendem a aumentar durante o envelhecimento, estando correlacionados com a perda da memória espacial (Yau et al, 2011; Yau e Seckl, 2012).

Anacker e colaboradores demonstraram que os glicocorticóides estão envolvidos na regulação da neurogênese hipocampal em ratos, com efeitos dependentes do receptor glicocorticoide (Anacker et al, 2013). Os glicocorticoides também regulam a expressão e sinalização de BDNF no hipocampo, induzindo alterações na plasticidade estrutural e funcional (Suri e Vaidya, 2013). A exposição crônica a níveis elevados de glicocorticoides induz danos celulares aos neurônios, atrofia dendrítica, reduz a neurogênese hipocampal e prejudica a plasticidade sináptica (Baek et al, 2011). Estes efeitos estão relacionados aos cuidados maternos recebidos no período perinatal. Animais que receberam cuidado materno reduzido apresentam aumento significativo nas taxas de morte neuronal no giro denteado, com consequente redução do desempenho cognitivo (Baek et al, 2011). Outros estudos demonstram que os cuidados maternos exercem efeitos nos comportamentos do adulto, estando relacionados com a regulação de diversos genes no hipocampo (Weaver et al, 2006).

Assim, o hipocampo figura como uma das principais estruturas encefálicas afetadas pelas experiências nas primeiras fases de vida.

## ***2.2- A atividade física como fator de proteção e recuperação das alterações induzidas por fatores ambientais perinatais no encéfalo.***

A ação da atividade física como fator neuroprotetor tem sido bastante evidenciada na redução de déficits na função encefálica decorrentes de condições adversas nas primeiras fases de vida (Viana et al, 2007), bem como no aumento do desempenho cognitivo mesmo em condições normais (Chang et al, 2011). Na esfera do comportamento humano, numerosos estudos sugerem que a atividade física afeta o

comportamento, e a realização de medidas de desempenho cognitivo em função do exercício tem revelado correlações estreitas entre exercício físico e função cerebral, em diversas fases de vida (Tomporowski, 2003; Pontifex et al, 2009; Tomporowski et al, 2011).

Bredy e colaboradores (Bredy et al, 2003; Bredy et al, 2004) demonstraram que o enriquecimento ambiental pode recuperar parcialmente os efeitos deletérios decorrentes da redução do cuidado materno nas primeiras fases de vida sobre o desempenho em testes cognitivos como no teste de reconhecimento de objetos e teste de orientação espacial, porém sem recuperação dos níveis de ligação dos receptores NMDA ou da LTP hipocampal. Baek e colaboradores demonstraram que o exercício em esteira recupera os padrões de proliferação neural em ratos privados dos cuidados maternos (Baek et al, 2012). O enriquecimento ambiental, caracterizado por oportunidades variadas de atividade física e estímulos sensoriais diversos, pode representar uma mudança compensatória nas fases subsequentes ao dano, reduzindo o efeito da redução dos cuidados maternos e da subnutrição nas primeiras fases de vida no desempenho em testes cognitivos de labirinto aquático e de reconhecimento de objetos na vida adulta (van Praag et al, 2000; Bredy et al, 2003; Viana et al, 2007). Estudos com animais experimentais submetidos a ambientes enriquecidos demonstraram que o treinamento de diferentes experiências motoras resulta em mudanças neuroquímicas no encéfalo, com modificações na espessura cortical, contatos sinápticos, espinhas e ramos dendríticos, levando a um aumento de plasticidade induzida por estimulação (Black et al, 1990; Rosenzweig e Bennett, 1996).

Em roedores, há um vasto conjunto de dados que suportam igualmente a hipótese de que o exercício pode melhorar aspectos cognitivos e capacidade discriminativa em testes de aprendizado e memória espacial, latência de fuga, assim como reduz o declínio da atividade física espontânea observada no envelhecimento (Spiriduso e Farrar, 1981; Fordyce e Farrar, 1991; Fordyce e Wehner, 1993; van Praag et al, 1999). Numerosos estudos clínicos e epidemiológicos em humanos revelaram que o declínio cognitivo associado ao envelhecimento ou demências, pode estar associado à inatividade (Buckner, 2004), e que atividades lúdicas, treinamento educacional, interação social e exercício físico, na demência, parecem retardar o declínio cognitivo (Fratiglioni et al, 2004). Estudos com animais experimentais submetidos a ambientes enriquecidos demonstraram que o treinamento de diferentes experiências motoras

resulta em mudanças neuroquímicas no encéfalo, com modificações na espessura cortical, contatos sinápticos, espinhas dendríticas e ramificação, levando a um aumento de plasticidade induzida por estimulação (Black et al, 1990; Rosenzweig e Bennett, 1996; Anderson et al, 2002).

Estudos empregando diversas modalidades de exercício físico e testes cognitivos hipocampo-dependentes têm relatado uma relação direta entre atividade física e melhora da função hipocampal na cognição, mesmo em animais envelhecidos ou com prejuízos hipocampais induzidos por diversas condições experimentais (van Praag et al, 1999; Anderson et al, 2000; Torres et al, 2006; Aguiar et al, 2011). O exercício físico representa uma estratégia eficaz na melhora da navegação espacial e formação de memória, bem como da plasticidade hipocampal e neurogênese em ratos, sendo acompanhado por aumentos da ativação de complexos enzimáticos como serina/treonina proteína cinase (AKT), proteína CREB, sinaptofisina e aumento dos níveis de fatores neurotróficos como BDNF e VEGF (Fabel et al, 2003; Aguiar et al, 2011).

Em experimentos com animais submetidos a condições de estresse perinatal, Maniam e Morris (Maniam e Morris, 2010) observaram que o exercício físico normalizou a expressão de receptores de glicocorticoides e de serotonina, bem como os níveis de BDNF, reduzidos pelas condições adversas perinatais. Outros autores demonstraram que o exercício físico influencia não somente o desempenho em testes hipocampo-dependentes, mas auxilia na recuperação das funções hipocampais no controle das respostas de estresse pelo eixo HPA mediadas pelos receptores hipocampais de glicocorticoides (Zheng et al, 2006; Hwang et al, 2011).

A atividade física regular representa uma estratégia comportamental de fácil implementação para melhorar a plasticidade sináptica e a função cognitiva, bem como fator de recuperação dos danos causados pelas condições adversas nas primeiras fases de vida. A prática regular de exercícios aeróbicos melhora o desempenho cognitivo tanto em humanos quanto em outras espécies, induzindo mudanças plásticas no sistema nervoso central, especialmente observado por indução de aumento na neurogênese e angiogênese. Esses efeitos aparecem rapidamente após o início da prática regular de exercícios. Aparentemente, logo na primeira semana de atividade são observadas alterações nos níveis de apoptose, angiogênese e neurogênese no hipocampo e cerebelo

(Kerr e Swain, 2011). O aumento da neurogênese hipocampal parece ser uma consequência imediata do exercício no hipocampo, e o suporte metabólico adicional para esse aumento é suprido pelo aumento na angiogênese. Esses fatores, juntamente com as alterações nas taxas de apoptose sugerem um rápido aumento de plasticidade induzido pela atividade física (Kerr e Swain, 2011).

Kramer e colaboradores demonstraram uma correlação entre exercício aeróbico, fluxo sanguíneo cerebral e melhora das funções metabólicas e neuroquímicas que suportam as funções executivas de memória de trabalho, memória de curto e longo prazo, orientação espacial e diversos processos cognitivos (Kramer et al, 2005). Em contrapartida, os mecanismos básicos que dão suporte a essas transformações são ainda em grande extensão desconhecidos. Estudos realizados em nosso laboratório revelaram que a atividade física, além de alterar a expressão de enzimas envolvidas com o processo de LTP no hipocampo, cerebelo e estriado ainda induzem uma recuperação dos níveis das mesmas em animais submetidos a condições adversas durante a amamentação (Torres et al, 2006; Viana et al, 2007).

Também foi observado aumento da densidade óptica medida após imunomarcagem para sinaptofisina e do número de sinapses avaliado por microscopia eletrônica no lobo paramediano do cerebelo em animais submetidos à atividade física acrobática, o que sugere que o aprendizado motor de novas tarefas pode modificar regiões específicas do encéfalo com maior intensidade do que em animais que se submetem a exercícios padronizados repetitivos, ou que não se exercitam (Black et al, 1990; Anderson et al, 1994; Anderson et al, 1996; Torres et al, 2006).

Age também na regulação da produção de fatores de crescimento e sobrevivência neuronal e alguns outros mecanismos, que são refletidos na redução do déficit cognitivo característico do processo de envelhecimento (Chae e Kim, 2009; Nichol et al, 2009). Em estudos utilizando modelos experimentais semelhantes ao Alzheimer o exercício físico reduziu as respostas inflamatórias, havendo redução de astrócitos e micróglia ativada, redução da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , COX-2 e iNOS (Leem et al, 2011).

Existe boa correlação entre envelhecimento, declínio da atividade física, declínio das funções cognitivas e alterações neurais e gliais. Diversos elementos gliais e de matriz extracelular sofrem alterações induzidas pelo exercício, evidenciando a

existência de diversos mecanismos interligados envolvidos nas consequências do treinamento físico sobre o funcionamento das redes neurais (Li et al, 2005; Ehninger et al, 2011; Kohman et al, 2012; Seo et al, 2013).

Alvarez-López e colaboradores demonstraram que o exercício modula a expressão gênica durante o envelhecimento. Analisando a expressão de diversos genes, os autores identificaram dezenas de genes que são modulados pelo exercício e genes relacionados ao envelhecimento que alteram seus padrões de expressão em resposta ao exercício (Alvarez-Lopez et al, 2013).

Todavia, a modalidade, a duração e a intensidade do exercício parece influenciar a função encefálica, podendo em níveis muito intensos e duradouros promover níveis de estresse durante o treinamento que pioram o desempenho cognitivo. As modalidades de exercício forçado figuram, em diversos estudos, como prejudiciais, induzindo exacerbação de processos inflamatórios (Cook et al, 2013). Outros estudos, entretanto, indicam que o exercício forçado, mas não o voluntário, é mais efetivo na promoção de fatores neuroprotetores (Hayes et al, 2008), bem como na função de induzir resistência ao estresse (Greenwood et al, 2013).

Do conjunto de evidências torna-se claro portanto que ainda permanece por ser investigado em detalhe de que forma o exercício pode influenciar o status cognitivo alterado pelo estresse perinatal, particularmente quando o foco de investigação está voltado para a micróglia, a matriz extracelular e a capacidade de difusão de substâncias neuroativas no parênquima cerebral adulto e envelhecido.

### ***2.3- Plasticidade glial e da matriz extracelular e suas relações com o tamanho da ninhada, o exercício e o envelhecimento.***

Nos mamíferos, o sistema nervoso central consiste de neurônios, que representam cerca de 10% dos elementos celulares, e células gliais, que representam os 90% restantes. O nome “glia” deriva de *nervenkitt* ou *nerve glue*, como proposto originalmente por Rudolf Virchow em 1856, para revisão ver (Garcia-Marin et al, 2007).

Classicamente, as células da glia têm sido relatadas como células não-excitáveis que promovem suporte neural estrutural e funcional, com funções básicas envolvendo a nutrição e o suporte físico aos neurônios. Entretanto, como resultados de diversas pesquisas *in vivo* e *in vitro*, o papel das células gliais se estende a operações funcionais muito mais amplas do que o previamente anunciado. Atualmente torna-se cada vez mais evidente que as células gliais apresentam interações dinâmicas com os neurônios, podendo modular o funcionamento neuronal por diversos mecanismos (Haydon, 2001; Ullian et al, 2001; Auld e Robitaille, 2003).

Diversas propriedades das células gliais já documentadas sugerem que apesar dessas células não apresentarem propriedades de transmissão elétrica de sinais como os neurônios, participam ativamente no processamento das funções cognitivas complexas que requerem ampla integração espacial e regulação temporal em longo prazo. Astrócitos, oligodendrócitos e micróglia apresentam propriedades que podem influenciar os mecanismos relacionados ao aprendizado e memória, podendo alterar a velocidade de condução dos axônios, modular a transmissão sináptica, expressar e alterar os padrões de difusão e concentrações de substâncias neuroativas (Chvatal e Sykova, 2000; Fields et al, 2013). A elucidação das funções da glia vem auxiliando na busca das respostas à questões ainda não completamente esclarecidas acerca dos mecanismos celulares envolvidos nos processos cognitivos previamente descritos como sendo atributo exclusivo da rede neuronal.

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, as células gliais guiam o crescimento axonal e a migração neuronal e participam ativamente da sinaptogênese auxiliando no estabelecimento e na modulação das conexões sinápticas. As células gliais que estão associadas a contatos sinápticos são tipicamente sensíveis à atividade sináptica, bem como agem modulando a atividade da mesma, num mecanismo de feedback neurônio-glia que envolve controle da liberação e captação de neurotransmissores, bem como de substâncias neurotróficas liberadas pelas próprias células gliais (Pfrieger e Barres, 1997; Haydon, 2001; Ullian et al, 2001; Angulo et al, 2004; Dityatev e Rusakov, 2011).

Além da capacidade glial em responder e modular a neurotransmissão, as células gliais parecem ainda regular a quantidade de sinapses (Ullian et al, 2001; Tremblay e Majewska, 2011). Estudos empregando análises quânticas (quantidade de

neurotransmissores/número de vesículas sinápticas excitadas), imunomarcção, microscopia eletrônica e registro eletrofisiológico demonstraram que poucas sinapses formam-se na ausência de células gliais e estas são funcionalmente imaturas. A micróglia juntamente com os astrócitos é capaz de aumentar o número de sinapses funcionais, o que é consistente com dados que demonstram que o aumento da gliogênese coincide com o aumento do número de sinapses no desenvolvimento e que a atividade sináptica é regulada em grande escala por sinalização não neuronal (Hartley et al, 1999; Bogen et al, 2008; Korn et al, 2011; Tremblay e Majewska, 2011; Jones et al, 2012). Pflieger e Barres demonstraram que neurônios desenvolvidos em meio de cultura exclusivo de neurônios formam sinapses ineficientes, e que as células gliais são imprescindíveis para que estas células tornem-se totalmente funcionais. No mesmo estudo foi observado que as células gliais aumentam a liberação quântica de neurotransmissores pelos terminais sinápticos, independentemente dos potenciais de ação evocados nesses neurônios, sem afetar a sobrevivência neuronal (Pflieger e Barres, 1997).

Nas primeiras fases de vida, a presença da mãe é um fator importante para a manutenção dos padrões de desenvolvimento em neurônios e células gliais. Em animais separados da mãe por um período de 24 horas, Zhang e colaboradores observaram que a morte de células neurais e gliais em áreas como o córtex cerebral, córtex cerebelar e em diversos tratos de substância branca praticamente dobraram em relação aos padrões observados em animais com a presença regular da mãe (Zhang et al, 2002).

Durante o envelhecimento ocorre um aumento das células gliais no encéfalo, observado por aumento da imunoreatividade para marcadores microgliais e astrocíticos. Um leve padrão neuroinflamatório é observado durante o envelhecimento normal, sendo aumentado consideravelmente quando o processo de envelhecimento é acompanhado por alterações patológicas. O aparecimento dessas alterações gliais coincide com os déficits na plasticidade neural e função cognitiva (Vehmas et al, 2003; Streit et al, 2004; Bilbo, 2010; Gemma et al, 2010). A capacidade das células gliais de responder à sinalização por esteroides (incluindo os glicocorticoides) apresenta-se também alterada pelo envelhecimento (Nichols, 1999).

## **II. ALTERAÇÕES MICROGLIAIS NO GIRO DENTEADO NA FASE ADULTA E NO ENVELHECIMENTO: ANÁLISES ESTEREOLÓGICAS E MORFOMETRIA TRIDIMENSIONAL.**

*Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital  
Universitário João de Barros Barreto, UFPA & Departamento de Nutrição, UFPE.*

### **1.Introdução**

#### ***1.1- O Envelhecimento e o Sistema Nervoso.***

O envelhecimento é um processo multifatorial, lento, gradativo e irreversível, que acarreta a degeneração da função e estrutura dos sistemas orgânicos e células. Os fatores ambientais aos quais o indivíduo foi submetido ao longo da vida, seja nos períodos iniciais de desenvolvimento, seja na vida adulta, são elementos cruciais na determinação da função encefálica no envelhecimento (Jiang et al, 2008; Meydani e Wu, 2008; Wu et al, 2008; Wu e Meydani, 2008).

Os efeitos do processo de envelhecimento sobre o encéfalo acarretam mudanças estruturais e funcionais (Petit-Taboue et al, 1998; Mora et al, 2007; Desgranges et al, 2008; Mora, 2013), que já são estudadas há décadas. Desde a década de 50, diversos autores já haviam desenvolvido pesquisas demonstrando um processo de involução senil do encéfalo, sendo observadas como principais características a redução do volume encefálico e do volume de substância cinzenta em relação ao volume de substância branca, assim como mudanças histológicas, com redução no número de células, alterações dendríticas e na densidade sináptica, associadas à perda cognitiva senil (Dekaban, 1978; Dickstein et al, 2007; Piguet et al, 2009; Mustafa et al, 2012).

Estudos em humanos demonstraram modificações funcionais significativas nas funções cognitivas dependentes do córtex pré-frontal e do hipocampo resultantes do processo de envelhecimento, com déficits de funções executivas e redução da memória

de trabalho (Kramer et al, 1999; Kramer et al, 2007; Kerchner et al, 2013). A perda cognitiva e o declínio da memória que acometem os idosos são explicados por alterações estruturais e bioquímicas que comprometem a função neuronal e glial. Perda significativa da substância branca em até 8%, atrofia neuronal, acúmulo de radicais livres, diminuição do número de sinapses, alterações sinápticas com declínio de neurotransmissores, de receptores, de vesículas sinápticas e diminuição de fatores neurotróficos responsáveis pela plasticidade, alterações na proliferação e morfologia de células gliais são exemplos de fatores que estão diretamente relacionados ao envelhecimento encefálico (Petit-Taboue et al, 1998; Segovia et al, 2001; Riddle et al, 2003; Burke e Barnes, 2006; Desgranges et al, 2008; Tichauer et al, 2013).

Existe uma proposição de que os fatores que produzem a neurodegeneração característica do processo senil o fazem através de processos diferentes, que culminam em uma cascata comum de sinalização que resulta na morte celular (Thal et al, 2004; Rossini et al, 2007). Durante o envelhecimento são observadas alterações morfológicas e no padrão de proliferação microglial havendo uma relação direta entre o padrão de microgliose e a degeneração neuronal (Lee et al, 2010; Hasegawa-Ishii et al, 2011). Essas perdas celulares no sistema nervoso central podem se manifestar como disfunções comportamentais, relacionadas à função de importantes estruturas encefálicas como o córtex pré-frontal e o hipocampo (Charchat-Fichman et al, 2005; Keller, 2006). O sistema fronto-estriatal exhibe perdas neuroquímicas concentradas em dopamina, serotonina e noradrenalina com diminuição do volume da substância branca (Haug e Eggers, 1991; Terry et al, 2000). Dados obtidos por diversos autores apontam para diferentes tipos de disfunções sinápticas associadas às alterações na neurotransmissão e em componentes de sistemas de tradução de sinais (Smith et al, 2007; Eto et al, 2008; Yamazaki e Saito, 2008). Recentemente foi demonstrado que as células microgliais estão envolvidas na modulação da plasticidade sináptica através de interações dinâmicas com os neurônios (Ji et al, 2013; Siskova e Tremblay, 2013). Aparentemente, em condições fisiológicas normais, as células microgliais estabelecem contatos com os neurônios e parecem regular a formação de sinapses através de processos de sinalização envolvendo fatores como o BDNF (Parkhurst et al, 2013). Entretanto, durante o envelhecimento, a indução de microgliose pelos danos teciduais característicos parece impedir as células microgliais de desenvolver suas funções normais, induzindo-as a um estado de ativação crônica inflamatória (Chugh et al, 2013). Existem evidências que tais

alterações e suas consequências para a plasticidade sináptica podem estar envolvidas nos déficits cognitivos observados durante o envelhecimento (Azevedo et al, 2013; Eyo e Wu, 2013; Fields et al, 2013; Marin e Kipnis, 2013).

Muitos sistemas de neurotransmissores têm seu funcionamento normal afetado durante o envelhecimento como, por exemplo, os sistemas 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 nos processos de aprendizado e memória (Richter-Levin e Segal, 1993; Richter-Levin e Segal, 1996; Baxter et al, 1999; Araujo et al, 2005; Gibbs et al, 2009).

Esses sistemas de neurotransmissores estão envolvidos nas respostas ao estresse. Neurônios CRH do núcleo paraventricular no hipotálamo são estimulados por serotonina e acetilcolina, e inibidos por glicocorticóides, GABA, ACTH e peptídeos opióides (Stratakis e Chrousos, 1995). Foi demonstrado também que o CRH pode modular a atividade dos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos (Curtis et al, 1995; Price et al, 1998; Curtis et al, 2006). Tais achados podem estabelecer uma ligação entre cuidados maternos nas fases perinatais, responsividade ao estresse e declínio cognitivo durante o envelhecimento. Em humanos foi observada uma relação entre níveis de estresse e declínio cognitivo em indivíduos idosos (Aggarwal et al, 2014).

Observações anteriores demonstraram que os níveis encefálicos de serotonina encontram-se alterados no envelhecimento, tanto em seres humanos quanto em animais de laboratório (Luine e Hearn, 1990; Steinbusch et al, 1990; Meltzer et al, 1998; Messripour e Mesripour, 2013). Estudos em diversos modelos experimentais têm demonstrado um envolvimento do sistema serotoninérgico nas disfunções cognitivas relacionadas ao envelhecimento (Fontana et al, 1995; Thomas e O'Brien, 2008). O cuidado materno altera os níveis de serotonina no encéfalo e pode estar envolvido em tais consequências nas fases mais tardias (Meaney, 2001).

A proposta de que alterações celulares provocadas por fatores ambientais e/ou genéticos durante as fases iniciais da vida podem acelerar a progressão de processos neurodegenerativos com disfunções cognitivas, associadas ou não à sintomas de

demência ganha um corpo crescente de evidências refletindo a importância da compreensão dos mecanismos associados a tais fatores para a elaboração de estratégias de prevenção e tratamento (Troulinaki e Tavernarakis, 2005; Keller, 2006; Liddell et al, 2007; Traykov et al, 2007).

### ***1.2- As células microgliais: da homeostase à patogênese em função de alterações ambientais.***

As células microgliais representam o sistema imune inato no parênquima encefálico, sendo os macrófagos residentes do sistema nervoso central. Apresentam papel crítico em lesões e doenças neurodegenerativas. São encontradas ubiquamente distribuídas e apresentam diferentes morfologias de acordo com a situação fisiológica do tecido (Streit et al, 1988; Ling e Wong, 1993).

A micróglia exibe basicamente três tipos distintos de morfologia (Figura 4): ramificada (micróglia em repouso), intermediária (micróglia primeiramente ativada – *primed micróglia*) e amebóide (micróglia ativada). No encéfalo normal, as células microgliais encontram-se em um estágio de repouso dinâmico, onde exibem pequeno corpo celular ovoide e processos altamente ramificados que parecem interagir através de seus processos com neurônios, astrócitos e células endoteliais (Nimmerjahn et al, 2005). As micróglia ramificadas formam uma rede de células imunofetoras em potencial, e podem responder rapidamente a estímulos lesivos diferenciando-se na forma amebóide ou ativada, sendo que esta diferenciação envolve uma forma intermediária, também denominada de micróglia primeiramente ativada (Billiards et al, 2006; Beynon e Walker, 2012). O perfil morfológico da micróglia primeiramente ativada parece envolver um estágio primário recentemente descrito (Figura 4), onde ocorre um aumento do número de ramos provocado pela liberação de ATP e glutamato no espaço extracelular (Fontainhas et al, 2011).

As atividades microgliais durante o desenvolvimento do encéfalo ainda não são totalmente exploradas, entretanto sabe-se que agem nesse período como fagócitos, responsáveis pela remoção de corpos apoptóticos (Roth e D'Sa, 2001; Streit, 2001). Aparentemente, além da remoção dos corpos apoptóticos, a micróglia parece estar

envolvida também na indução da apoptose nesse estágio (Frade e Barde, 1998; Srinivasan et al, 2004). É importante lembrar que os padrões apoptóticos durante o desenvolvimento são essenciais para a eficiência dos fenômenos regressivos e proliferativos característicos dessa etapa, e não induzem uma ativação microglial em larga escala, diferentemente daqueles padrões apoptóticos e de ativação microglial encontrados em quadros neurodegenerativos agudos e crônicos (Graeber e Streit, 1990; LeBlanc, 2005; Graham et al, 2011; Kaneko et al, 2012), ou induzidos por condições adversas.

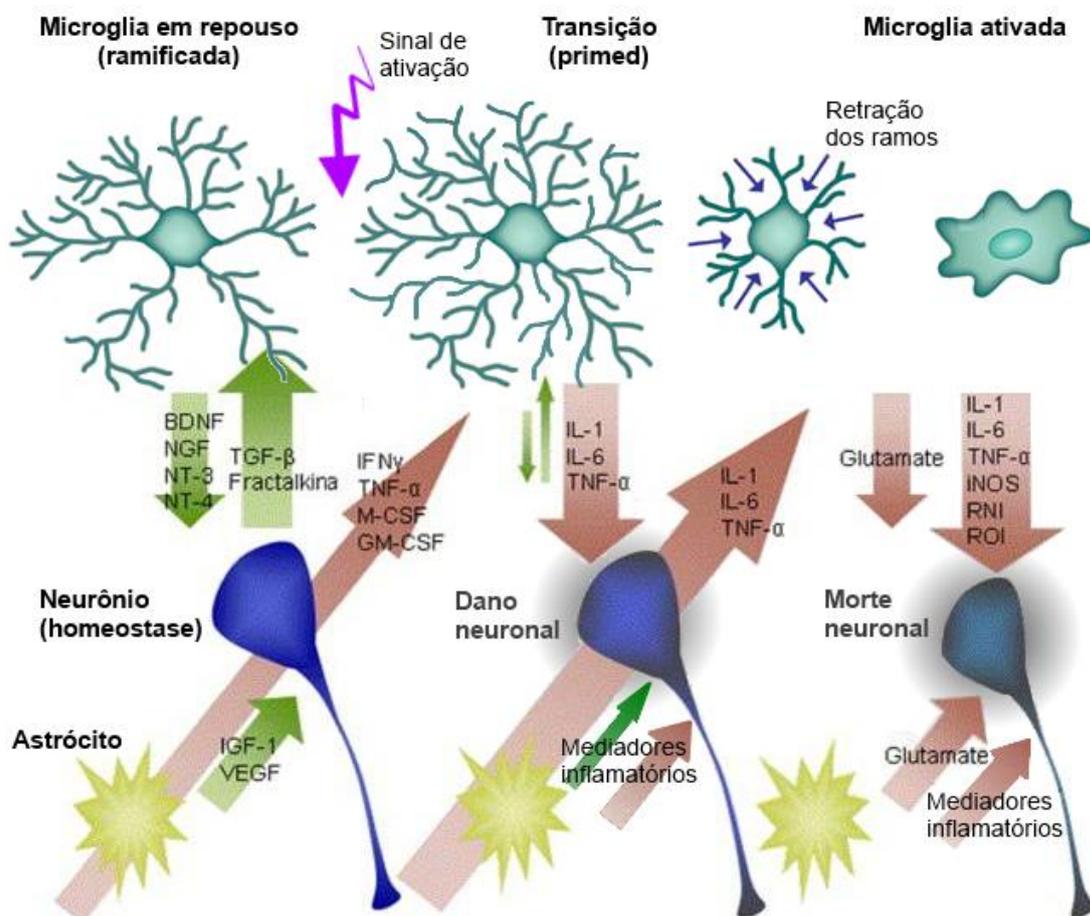


Figura 4. Perfis morfológicos da micróglia. Sob condições fisiológicas normais, a micróglia em repouso apresenta um fenótipo caracterizado por sua morfologia ramificada (à esquerda) e expressão de fatores pró-neurogênicos. Após qualquer perturbação da homeostase, a micróglia rapidamente altera seu fenótipo para um estado primeiramente ativado, com aumento do corpo celular e redução dos ramos (centro), e expressão de fatores pró-inflamatórios. De acordo com Fontainhas (Fontainhas et al, 2011), um fenótipo intermediário com aumento do número de ramos precede esse estado. Na persistência do distúrbio homeostático ela adquire o fenótipo ameboide (à direita), com capacidade migratória e fagocítica e expressão dramática de fatores pró-inflamatórios que participam da indução da morte neuronal. Adaptado de (Olah et al, 2011).

A ativação microglial no encéfalo geralmente decorre da liberação de substâncias pelos neurônios lesionados, que incluem citocinas, produtos de oxidação e outras substâncias neuroativas (Biber et al, 2007; Kaneko et al, 2012). Seja durante o desenvolvimento ou em fases mais tardias, qualquer estímulo potencialmente lesivo pode provocar a ativação das células microgliais, que sofrem rápidas alterações morfológicas, com aumento do tamanho do corpo celular, assumindo uma forma amebóide e modificando seu imunofenótipo, exibindo função fagocítica, e aumentando o metabolismo respiratório e a expressão de antígenos de superfície e a produção de citocinas, quimiocina e espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo exercer papel tanto reparador como lesivo (Polazzi e Contestabile, 2002; Garden e Moller, 2006). Quando ativada, a micróglia pode atuar como célula apresentadora de antígeno e agir no recrutamento de células imunitárias periféricas da resposta inata (macrófagos e neutrófilos) e adaptativa (linfócitos T e B), ampliando a cascata da resposta inflamatória no encéfalo (Streit et al, 1988; Walsh et al, 2014) (Figura 5). Essa ativação apesar de ser inicialmente benéfica, quando prolongada pode liberar substâncias tóxicas que agravam o quadro de morte celular no tecido (Bruce-Keller, 1999; Billiards et al, 2006).

A relação entre as células microgliais e os neurônios faz-se muito importante na compreensão tanto dos mecanismos de resposta inflamatória quanto da plasticidade neural no sistema nervoso (Ling et al, 2001; Polazzi e Contestabile, 2002). Pelo fato de as células microgliais responderem rapidamente a danos neuronais e apresentarem efeitos dramáticos sobre a função de neurônios e outras células gliais (Walsh et al, 2014), é importante compreender o papel dessas células e suas alterações sobre a cascata multicelular relacionada à plasticidade sináptica e aos danos ao encéfalo.

Existem diversas evidências que apontam para a participação microglial na modulação sináptica. Essas células integram inputs neuronais, e podem ainda liberar neurotransmissores que modulam a atividade sináptica (Haydon, 2001; Auld e Robitaille, 2003). No encéfalo maduro, a micróglia pode responder a mudanças na atividade sensorial e influenciar a atividade neuronal, bem como parece monitorar a integridade das funções sinápticas, e durante o desenvolvimento as interações entre as células microgliais e os neurônios parecem ser importantes na modelação de circuitos neurais importantes para as funções cognitivas, para revisão ver (Wake et al, 2012). Todavia, tais funções são dependentes do estado fisiológico da micróglia no tecido, sendo desempenhadas pela micróglia ramificada. Quando ativada, a micróglia parece

exercer função contrária, levando à perda sináptica e déficits de memória (Azevedo et al, 2013; Chugh et al, 2013).

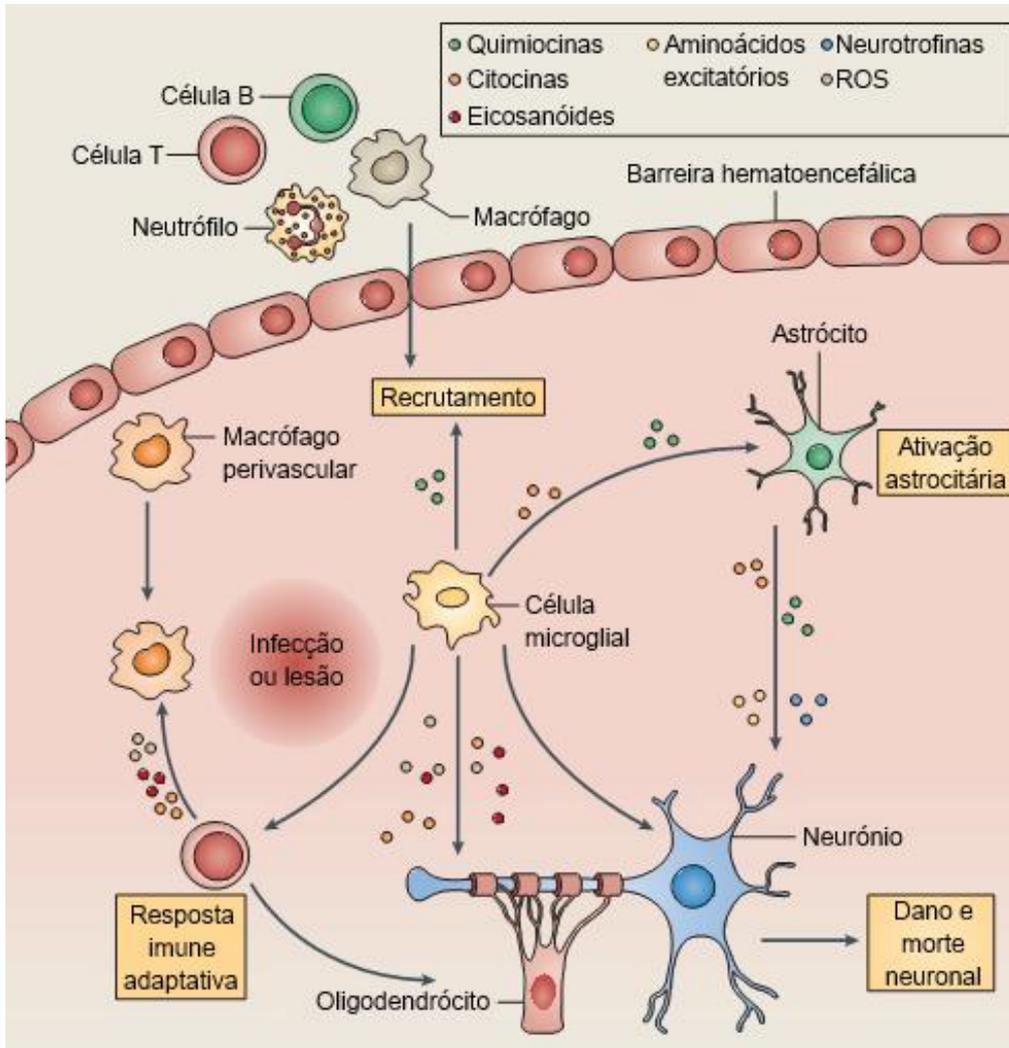


Figura 5. Respostas inflamatórias pela ativação da micróglia no encéfalo. A ativação imune inata no SNC pode ser iniciada localmente e levar a alterações no microambiente do tecido. A micróglia comanda as células imunitárias da resposta inata no SNC, recrutando os macrófagos derivados do SNC. A expressão de citocinas, quimiocinas e ROS promove o recrutamento de células imunitárias inatas e adaptativas periféricas para o sítio da lesão, e a ativação de células gliais próximas, o que pode causar a morte celular neuronal e de oligodendrócitos em algumas circunstâncias. Adaptado de (Walsh et al, 2014).

Devido à presença de moléculas sinalizadoras que podem interagir tanto com neurônios como com células microgliais, a comunicação entre estes tipos celulares pode envolver mecanismos bidirecionais (Eyo e Wu, 2013). Aparentemente, a liberação de microvesículas pelas células microgliais pode afetar a atividade sináptica através da

amplificação de pequenos potenciais de ação (Antonucci et al, 2012). A atividade microglial persistente modula a transmissão sináptica e o funcionamento neuronal em níveis basais tanto diretamente quanto pela interação com astrócitos, parecendo influenciar também a interface neurônio-astrócito nas sinapses (Pascual et al, 2011).

Mais recentemente foram descritos mecanismos dependentes de atividade através dos quais a micróglia participa do redesenho sináptico em tempo real no encéfalo. Esses mecanismos envolvem a formação, modificação e eliminação de estruturas sinápticas, com regulação do espaço extracelular perissináptico, contato com espinhas dendríticas e fagocitose de sinapses, terminais axonais e espinhas dendríticas e expressão de BDNF microglial (Tremblay e Majewska, 2011; Beynon e Walker, 2012; Schafer et al, 2012; Tremblay, 2012; Parkhurst et al, 2013). Tomados juntos, esses dados indicam que a micróglia apresenta funções importantes no aprendizado e memória (Marin e Kipnis, 2013).

Alterações microgliais são comumente observadas em diversas condições adversas ao sistema nervoso central, especialmente durante o envelhecimento e acompanhando o curso do desenvolvimento das doenças neurodegenerativas, sendo a interação neurônio glia amplamente estudada como um potencial alvo terapêutico para a neurodegeneração (Long et al, 1998; Streit et al, 2004; Streit, 2005; Conde e Streit, 2006; Wasserman et al, 2008; Streit et al, 2009). Assim como alterações ambientais e fisiológicas desfavoráveis podem aumentar o padrão das alterações microgliais, condições ambientais favoráveis parecem afetar positivamente esses padrões, sendo observadas alterações na morfologia e quantidade de micróglia e astrócitos induzidas pelo exercício físico sobre o envelhecimento normal e patológico. Um exemplo dessas alterações são os achados de Kohman e colaboradores, que demonstraram que no giro denteado do hipocampo de ratos envelhecidos o exercício físico reduziu a quantidade de células microgliais, e as células microgliais presentes no hipocampo dos animais submetidos à atividade física apresentaram uma maior expressão de IGF-1, um fator importante para a sobrevivência neuronal, sugerindo um padrão neuroprotetor da micróglia dos grupos exercitados quando comparados com os animais inativos, ou seja, nesses animais o exercício físico não somente atenuou o padrão de divisão microglial como também promoveu a expressão de um fenótipo proneurogênico (Kohman et al, 2011).

Apesar do papel da micróglia no desenvolvimento e nas respostas a condições desfavoráveis ser relativamente bem conhecido, as alterações microgliais induzidas por condições perinatais adversas, entretanto, ainda não foram relatadas detalhadamente. Todavia, o aumento dos níveis de hormônios relacionados ao estresse influencia os padrões de ativação microglial, especialmente no córtex frontal e hipocampo (Kelly et al, 2012). Estudos demonstraram que animais submetidos a estresse no período pré-natal apresentam alterações microgliais no hipocampo quando adultos, com aumento de citocinas inflamatórias e do número de células microgliais apresentando padrão morfológico característico de micróglia ativada (Diz-Chaves et al, 2012).

Frank e colaboradores demonstraram que fatores estressores podem causar alterações nos padrões inflamatórios no encéfalo, com redução de glicoproteínas neuronais responsáveis pela manutenção da micróglia em estado de repouso e aumento de ativação microglial no hipocampo (Frank et al, 2007). Outros estudos demonstraram o envolvimento das células microgliais nas respostas inflamatórias induzidas por estresse, aparentemente envolvendo os receptores de glicocorticóides, que são expressos nas células microgliais (Wang et al, 2002; Stevens et al, 2003) e parecem apresentar importante papel no processo de alteração da micróglia em repouso para um estado de micróglia ativada (Wang et al, 2003; Du et al, 2010; Frank et al, 2012).

Considerando que a redução dos cuidados maternos induz a redução de expressão dos receptores glicocorticóides (Szyf et al, 2005; Hellstrom et al, 2012; Zhang et al, 2013), podemos presumir que animais que recebem reduzido cuidado materno apresentam maior susceptibilidade à ativação microglial induzida por fatores estressores. Dessa forma, as células microgliais podem representar o substrato neuroimune para a potenciação do estado pró-inflamatório induzido por estresse no sistema nervoso central, que pode influenciar processos modulatórios importantes para aprendizado, memória, plasticidade neural e sinaptogênese (Yirmiya e Goshen, 2011).

### ***1.3- A morfologia quantitativa: Estimativas numéricas sem viés e reconstruções tridimensionais.***

A regra geral em análises qualitativas é encontrar palavras descritivas tais como menores, maiores, mais largas, menos frequentes, mais frequentes, diferente, similar, ausência ou presença que em geral são suficientes para os propósitos investigados (Schmitz e Hof, 2005). Entretanto, outros estudos que geram análises quantitativas e expressam valores numéricos sobre contagem de células, densidades, áreas e volumes apresentam resultados controversos que se devem a suposições prévias acerca do tecido e da geometria das células e de suas distribuições no plano da secção (Geinisman et al, 1995; Mayhew e Gundersen, 1996).

Esses estudos quantitativos eventualmente introduzem vieses de amostragem e/ou erros sistemáticos cuja magnitude é impossível de ser apreciada, qualquer que seja a resolução da análise: óptica (Mayhew e Gundersen, 1996; Gardella et al, 2003; Mandarim-de-Lacerda, 2003; Howard e Reed, 2005), confocal (Peterson, 1999; Kubinova e Janacek, 2001) ou eletrônica (Fiala e Harris, 2001; Nyengaard e Gundersen, 2006). A análise microscópica em qualquer nível é uma ferramenta analítica poderosa para se descrever formas normais e anormais de tecidos biológicos particularmente se for possível gerar números a partir de secções histológicas. Entretanto é necessário considerar que quando um microscópio é utilizado para analisar a estrutura de interesse é inevitável, na maioria dos experimentos, que apenas uma pequena fração da área de interesse original seja de fato analisada em detalhe (Howard e Reed, 2005; Schmitz e Hof, 2005). Para contornar tais vieses empregam-se técnicas estereológicas que estimam o número total dos objetos contidos em uma dada região de interesse através de coleta de informação aleatória e sistemática multiplicando-se o número de elementos de interesse registrados pelos valores de probabilidade da amostra e.g. (West, 2002).

O termo sem viés é utilizado para definir sistemas de amostragem que são independentes das propriedades do tecido onde as dimensões da sonda (caixa de contagem) e os parâmetros amostrais a ela associados (número e intervalo entre elas) são definidos a priori, desprezando-se a coleta de dados acerca do tamanho, forma e orientação espacial da área a ser investigada (Glaser e Glaser, 2000).

Assim, os números estimados a partir da amostragem podem ser expressos em valores relativos ou absolutos indicando volume, número, conectividade, distribuição espacial e tamanho das estruturas biológicas, sem conhecimento prévio da geometria das células ou do tecido a ser investigado e.g. (Glaser e Glaser, 2000; West, 2002; Schmitz e Hof, 2005).

Dentre todos os procedimentos utilizados para estimar o número total de objetos de interesse dentro de uma determinada região ou camada, o fracionador óptico é o que tem sido usado com mais frequência, pois combina as propriedades da sonda tridimensional para contagem dos elementos de interesse (o dissecor óptico) com o sistema de amostragem sistemática e aleatória (o fracionador) removendo vieses amostrais e pressuposições (West et al, 1991).

No presente trabalho foi estimado o número de micróglia dentro de um determinado volume de tecido, o giro denteado, usando investigação estereológica sem vies. Em estereologia são utilizadas caixas de contagem virtuais (sondas estereológicas) aplicadas a uma série ordenada de secções histológicas obtidas das regiões de interesse. É possível seccionar opticamente as secções histológicas usando objetivas de grande abertura numérica para produzir imagens de baixa profundidade de foco. O plano de foco (ou secção óptica) pode ser deslocado através de distâncias conhecidas através da espessura da secção produzindo planos de foco contínuos através dos quais a contagem é feita de acordo com as regras de contagem do dissecor escolhido. Na prática o que acontece é a inclusão na contagem de objetos novos que entram em foco (ou saem de foco) enquanto descemos ou subimos dentro da caixa de contagem de volume conhecido.

Um dos mais recentes avanços envolvendo o dissecor óptico é a combinação do dissecor óptico com o fracionador de amostras. Esta combinação é conhecida na literatura como fracionador óptico (West, 2002), e 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 contagem de objetos (redes perineuronais no presente trabalho), em uma amostra sistemática uniforme que constitui uma fração conhecida do volume da região sendo analisada. Isto é feito através de amostragem sistemática de uma fração conhecida da espessura da secção, de uma fração conhecida

da área seccional e de uma fração conhecida do número de secções que incluem a região de interesse.

As reconstruções tridimensionais visam a obtenção de representações geométricas da estrutura de objetos. Foram popularizadas com o desenvolvimento das facilidades computacionais e apresentam importância crescente nas áreas científicas. Informações acerca da geometria tridimensional de um determinado objeto podem ser obtidas por diversos métodos, como varredura a laser, sonares, tomografia, ressonância magnética e fotografias seriadas em pares estéreo (Aguilar et al, 2013).

As reconstruções tridimensionais das células fornecem dados para análises qualitativas e quantitativas (Aguilar et al, 2013). Tais dados têm contribuído para a compreensão das alterações morfológicas em doenças neurodegenerativas, desenvolvimento, injúria e outras condições de importância para as investigações em neurociências. Apesar de existirem diversas ferramentas para a obtenção e análise desses dados, poucos fornecem a possibilidade de definições exatas da topografia das células, o que requer ferramentas poderosas de análise.

A ferramenta utilizada nas reconstruções tridimensionais das micróglia no presente trabalho consiste em um sistema para a aquisição de medidas a partir das posições e diâmetros de pontos obtidos por um computador conectado ao microscópio de modo a controlar os movimentos e posições do espécime em análise nos três eixos ortogonais, gerando uma descrição da estrutura espacial da célula em análise. Assim, torna-se possível a realização de análises morfométricas detalhadas de células neurais e gliais, com a quantificação do número de dendritos, axônios, nós, sinapses, espinhas, o comprimento, a altura, o volume, a complexidade e a extensão desses ramos, área e volume do soma. Esse sistema permite a criação e análise de reconstruções realistas de células, permitindo a observação da distribuição espacial de arborizações, com a obtenção de medidas significativas e quantificáveis a partir das imagens do microscópio, o que fornece precisões micrométricas constituindo assim uma ferramenta analítica de alta precisão para estudos de morfometria fina (Glaser e Glaser, 1990).

## **2. Objetivos**

- Descrever as alterações de memória de reconhecimento de objeto induzidas pela alteração do tamanho da ninhada, atividade física e envelhecimento através de testes hipocampo-dependentes;

- Descrever e quantificar as alterações na proliferação e morfologia microglial induzidas pela alteração no tamanho da ninhada e pelo envelhecimento no giro denteado de ratos jovens e senescentes;

- Observar a influência da atividade física durante o envelhecimento sobre as alterações microgliais induzidas por alteração do tamanho da ninhada;

- Observar a influência do exercício em diferentes janelas temporais sobre as alterações microgliais induzidas por alteração do tamanho da ninhada no adulto;

- Analisar as relações entre as alterações microgliais observadas no adulto e no idoso e o desempenho observado nos testes cognitivos.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1- Grupos Experimentais.

Foram utilizados 60 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, provenientes do biotério da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética Institucional no Cuidado Animal da Universidade Federal de Pernambuco (ANEXO 2), e executados de acordo com o guia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (National Institute of Health – NIH/USA), “Princípios para o cuidado de animais de laboratório” (Principles of Laboratory Animal Care).

As fêmeas alimentadas *ad libitum* com ração própria para roedores de laboratório (Nuvilab - Purinado Brasil® Ltda), cuja descrição nutricional está relacionada no quadro 1, foram mantidas em gaiolas padrão (51 × 35.5 × 18.5 cm) em grupos de 2 ou 3, em um ciclo claro-escuro de 12/12h (luzes ligadas às 6h) em temperatura ambiente (23 ± 1°C), umidade relativa do ar 55±10%. Após o acasalamento e período de gestação, as fêmeas deram à luz ninhadas médias de 7 a 12 animais. Ao 2º dia de vida pós-natal, a fim de alterar o padrão de cuidado materno recebido pelos filhotes bem como o nível de competição dentro da ninhada, foi estabelecido o protocolo de alteração do tamanho da ninhada já utilizado anteriormente em nosso laboratório (Torres et al, 2006; Viana et al, 2007). Este consiste em agrupar os filhotes em ninhadas menores (6 filhotes por nutriz) ou maiores (12 filhotes por nutriz).

A fim de evitar influências genéticas sobre os resultados experimentais, filhotes provenientes de 4 a 6 ninhadas (machos e fêmeas), nascidos no mesmo dia, foram misturados em um grande grupo e posteriormente distribuídos de forma randômica entre as nutrizas formando as ninhadas grandes e pequenas. Os animais permaneceram nessas condições durante os primeiros vinte e um dias de vida, que consistem no período de lactação em ratos. Ao final do período de lactação somente os machos foram selecionados para os experimentos.

<b>ALIMENTO COMPLETO PARA CAMUNDONGOS E RATOS – NUVILAB – CR1</b>					
<b>Níveis de Garantia</b>		<b>Vitaminas</b>		<b>Microelementos Minerais</b>	
Umidade	12,50%	A	UI 12.000	Ferro	mg 50,00
Proteína Bruta	22,00%	D <sub>3</sub>	UI 1.800	Zinco	mg 60,00
Extrato Etéreo	4,00%	E	mg 30,00	Cobre	mg 10,00
Material Mineral	10,00%	K <sub>3</sub>	mg 3,00	Iodo	mg 2,00
Matéria Fibrosa	8,00%	B <sub>1</sub>	mg 5,00	Manganês	mg 60,00
Cálcio	1,40%	B <sub>2</sub>	mg 6,00	Selênio	mg 0,05
Fósforo	0,80%	B <sub>6</sub>	mg 7,00	Cobalto	mg 1,5
Indicação: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – USA.		B <sub>12</sub>	mg 20,00		
		niacina	mg 6,00	<b>Aminoácidos Aditivos</b>	
		pantotenato	mg 20,00	DL-metionina	mg 300,00
		folato	mg 1,00	Lisina	mg 100,00
		biotina	mg 0,05		
		colina	mg 600,00	Antioxidante	mg 100,00

Quadro 1. Características nutricionais da ração de laboratório utilizada para alimentação das nutrízes e crias. Nuvilab – CR1 – Purina do Brasil® Ltda.

Após o desmame, os animais foram separados e mantidos em gaiolas padrão em grupos de 2 ou 3 animais, nas condições de temperatura, umidade e ciclo claro/escuro descritas acima. Posteriormente, foram separados em subgrupos exercitados ou sedentários, aos 4 meses ou aos 23 meses. Dessa forma, foram obtidos os subgrupos descritos no quadro 2, de acordo com a fase na qual os animais foram submetidos ao período de exercício e sacrificados para análise do padrão de expressão microglial no giro denteado e hipocampo.

<b>GRUPO</b>	<b>JANELA TEMPORAL</b>		
	<b>JOVEM (21D)</b>	<b>ADULTO (4M)</b>	<b>SENESCENTE(23M)</b>
<b>SS</b>	SEDENTÁRIO	SEDENTÁRIO	-
<b>SE</b>	SEDENTÁRIO	EXERCITADO	-
<b>ES</b>	EXERCITADO	SEDENTÁRIO	-
<b>EE</b>	EXERCITADO	EXERCITADO	-
<b>SSS</b>	SEDENTÁRIO	SEDENTÁRIO	SEDENTÁRIO
<b>SSE</b>	SEDENTÁRIO	SEDENTÁRIO	EXERCITADO

Quadro 2. Condições físicas dos subgrupos experimentais nas idades jovem, adulto e senescente.

O treinamento físico dos animais foi realizado durante 5 semanas, nas quais os animais dos subgrupos exercitados foram submetidos a exercícios diários em padrão de esforço crescente na esteira (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil), de acordo com os parâmetros descritos no quadro 3, enquanto que os animais sedentários foram manipulados da mesma forma, deixados o mesmo período de tempo, entretanto na esteira desligada.

	1 <sup>a</sup> SEMANA	2 <sup>a</sup> SEMANA	3 <sup>a</sup> SEMANA	4 <sup>a</sup> SEMANA	5 <sup>a</sup> SEMANA
<b>DURAÇÃO DA SESSÃO</b>	30 MIN	30 MIN	30 MIN	45 MIN	45 MIN
<b>NÚM. DE SESSÕES SEMANAIS</b>	5	5	5	3	2
<b>VELOCIDADE</b>	5 m/min	10 m/min	15 m/min	25 m/min	25 m/min

Quadro 3. Parâmetros do treinamento físico dos subgrupos exercitados durante as cinco semanas de exercício.

### **3.2- Testes comportamentais.**

Após o período de exercícios, todos os animais adultos (4 m) e senescentes (23m) independente da condição experimental, foram submetidos a testes de memória espacial e de reconhecimento de objetos. Para os testes foi utilizado um aparato que consiste em uma caixa de madeira em formato circular (diâmetro=1m) feito em madeira pintada e envernizada. A parte inferior foi demarcada com linhas para distinguir quatro quadrantes na arena circular. A luminância medida no centro da caixa era de 2,4cd/m<sup>2</sup>.

Os testes foram realizados durante cinco dias consecutivos, sendo o primeiro dia de testes utilizado para habituação e exploração do aparato pelo animal, seguido de dois dias para a habituação aos objetos, e dois dias de testes: um dia para o teste de reconhecimento de objeto e um dia para o teste de memória espacial. Nestes dias os dados de tempo de exploração dos objetos foram coletados. A figura 6 mostra um diagrama do desenho experimental ao qual os animais foram submetidos no presente estudo.

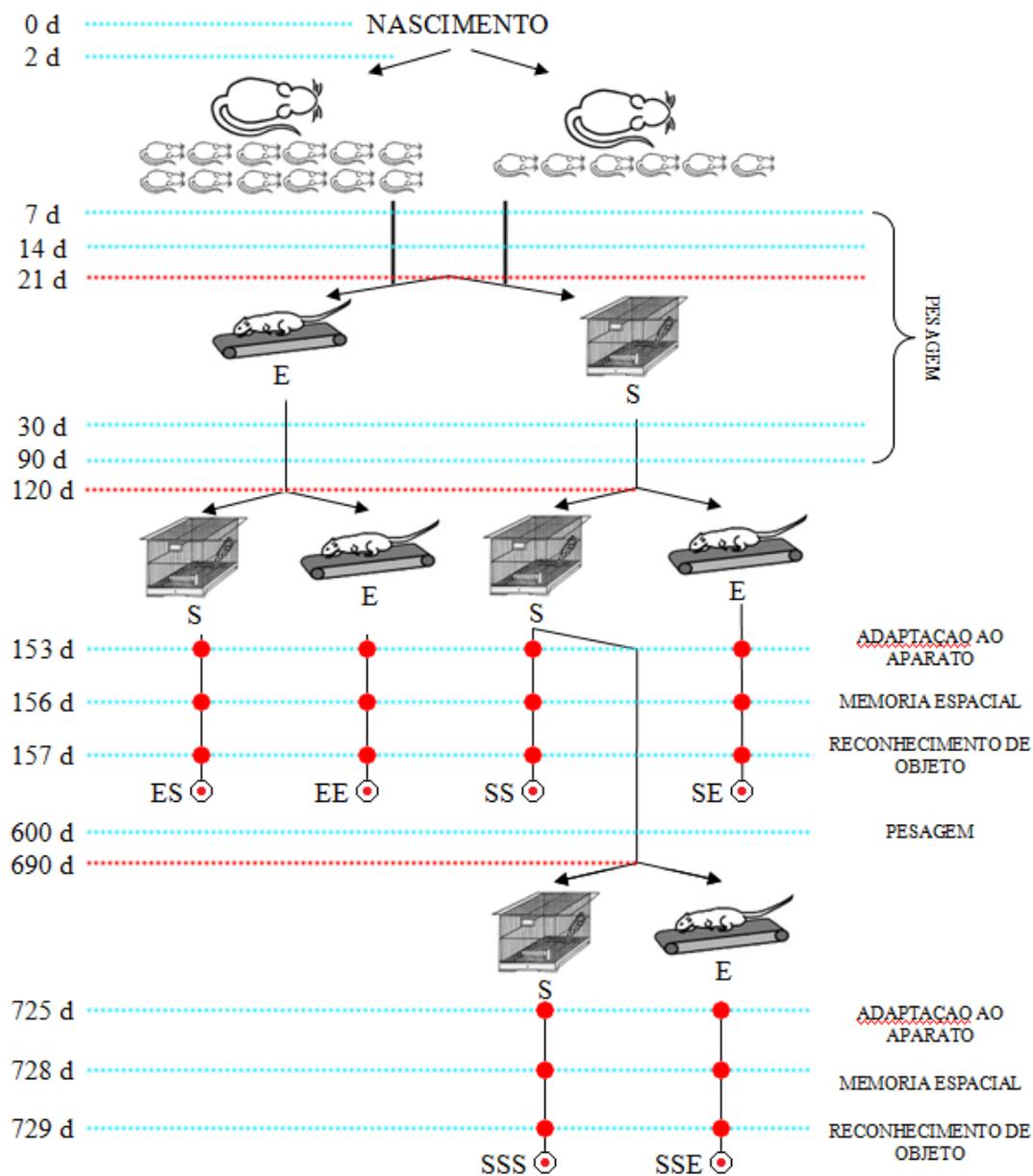


Figura 6. Diagrama esquemático da divisão dos subgrupos e dos procedimentos experimentais. E: exercitados; S; sedentários; ⊙: perfusão, craniotomia e processamento histológico do encéfalo. ES, EE, SS, SE, SSS, SSE: subgrupos obtidos ao final dos períodos experimentais, de acordo com as fases nas quais foram exercitados ou permaneceram em condição de sedentarismo. Para cada subgrupo cerca de metade dos animais são provenientes de ninhadas grandes, e a outra metade de ninhadas pequenas.

### *3.2.1- Habituação ao Aparato.*

Nessa fase, cada animal foi posicionado no centro da arena, sem nenhum dos objetos utilizados para os testes, sendo deixados livres por 5 minutos para exploração.

### *3.2.2 - Habituação aos objetos.*

Cada um dos animais foi colocado na arena contendo dois objetos idênticos, posicionados nos mesmos quadrantes da arena, sendo deixados livres para explorá-los por 5 minutos, durante 3 sessões, com intervalos de 50 minutos entre as mesmas, em dois dias consecutivos. Os objetos utilizados nesta fase não foram reutilizados durante os testes. Esta fase foi utilizada ainda para detectar possíveis preferências dos animais por um dado objeto ou localização, o que poderia surgir como fonte de erro.

### *3.2.3- Testes.*

Testes de reconhecimento de objeto e de memória espacial, um teste por dia, em dois dias consecutivos, onde foi realizada a coleta dos dados para posterior análise.

### *3.2.4- Teste de reconhecimento de objeto.*

O teste de reconhecimento de objeto consiste em duas sessões. Na primeira, o animal é colocado na caixa contendo dois objetos idênticos, e deixado livre para explorar ambos os objetos por cinco minutos, sendo registrados os tempos de exploração de cada objeto a fim de verificar a possibilidade de existência de preferência do animal por algum objeto em uma determinada posição. Após um intervalo de 50 minutos, o animal é submetido à segunda sessão, na qual ele é colocado novamente na caixa, contendo dois objetos posicionados nos mesmos quadrantes da sessão anterior: um dos objetos ao qual ele foi anteriormente exposto, juntamente com um novo objeto. Os tempos de exploração dos objetos antigo e novo são registrados. Nesse contexto espera-se que o animal despenda mais tempo na exploração do objeto novo (Tulving, 2001; Ennaceur et al, 2005; Dere et al, 2007).

### 3.2.5- Teste de memória espacial.

No teste de memória espacial, o animal é colocado na caixa contendo dois objetos idênticos, e deixado livre para explorar ambos os objetos por cinco minutos, de forma semelhante ao teste de reconhecimento de objeto. Entretanto, após o intervalo, quando o animal é submetido à segunda sessão, ele é colocado novamente na caixa, contendo os mesmos objetos ao qual ele foi anteriormente exposto, estando um deles na mesma posição da sessão anterior, e o outro deslocado para uma nova posição na caixa. Os tempos de exploração dos objetos estacionário e deslocado são registrados. Nesse contexto espera-se que o animal explore por mais tempo o objeto deslocado. A figura 7 mostra um diagrama esquemático de ambos os testes.

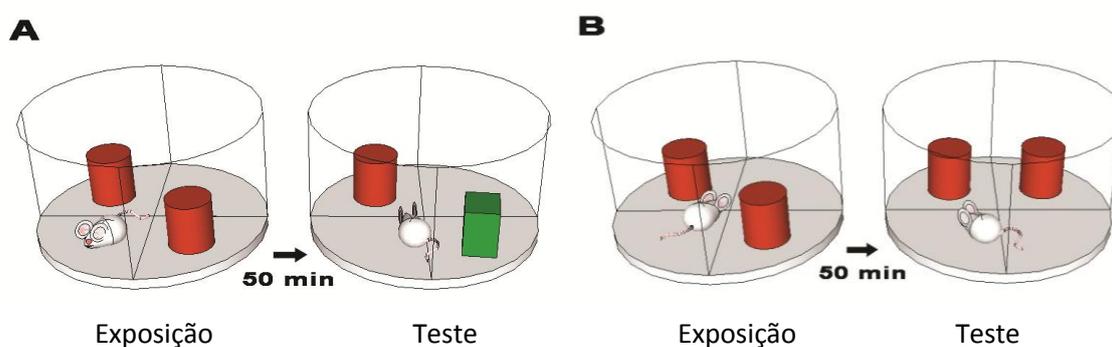


Figura 7. Desenho esquemático do teste de reconhecimento de objeto (A) e teste de memória espacial (B). Em ambos os testes, após o intervalo que segue a sessão de exposição, espera-se que o animal explore por mais tempo o objeto que representa um novo contexto na sessão de teste.

A fim de minimizar a influência de preferências naturais por objetos ou materiais em particular, optamos pela escolha de objetos fabricados com o mesmo material, porém com geometrias diferentes para que pudessem ser facilmente discriminados, oferecendo possibilidades semelhantes de interação (Dere et al, 2005). Todos os objetos utilizados para os testes eram de plástico, com diferentes formas, alturas e cores. Antes de cada animal ser colocado na caixa, tanto a caixa como os objetos foram limpos com auxílio de pano embebido em etanol 75% a fim de minimizar as pistas olfativas.

A variável medida nos testes comportamentais foi o tempo de exploração dos objetos durante a sessão de teste, tendo sido realizadas medidas para o reconhecimento de objeto (novo x familiar) e localização (deslocado x estacionário). Em ambos os testes, para caracterizar comportamento exploratório o animal deveria aproximar-se do objeto com a cabeça direcionada ao mesmo e posicionar a cabeça com uma distância de 0 a 3 cm do objeto. Foram utilizados objetos pesados a fim de permitir tal interação sem que o animal deslocasse ou derrubasse o objeto.

### ***3.3 - Processamento histológico.***

Após os testes comportamentais, todos os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de 2,2,2-tribromoetanol (0,04 ml/g de peso corporal) e perfundidos por via transcardíaca com solução salina heparinizada seguida de solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1M (pH 7.2–7.4). Após a perfusão com o fixador, foi realizada a craniotomia e corte de secções seriadas em vibrátomo (Micron) a 70  $\mu$ m. Os cortes obtidos a intervalos regulares foram imunomarcados com anticorpo policlonal (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure 10 Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) para IBA-1 (ionized calcium-binding adapter molecule) a fim de detectar células microgliais e/ou macrófagos.

Todos os reagentes utilizados nessa fase foram fornecidos pelas empresas Sigma-Aldrich (Poole, UK) e Vector Labs (Burlingame, CA, USA). Para a imunomarcção, as secções foram pré-tratadas através de imersão em ácido bórico 0.2M (pH 9) à temperatura de 65–70 °C por 60 minutos a fim de melhorar a recuperação antigênica, e lavadas em tampão fosfato salina 5% (PBS), sendo imersas posteriormente por 20 minutos em soro normal de cabra a 10% (IBA-1 immunolabeling) (Vector Laboratories), sendo então incubadas por 72h com o anticorpo primário anti-Iba1(2  $\mu$ g/ml em PBS) diluído em PBS 0.1M (pH 7.2–7.4) a 4 °C sob agitação lenta e contínua. Depois de lavadas, as secções foram incubadas por 12h no anticorpo secundário biotinilado (cabra anti-coelho para IBA-1, 1:250 em PBS, Vector Laboratories). Fizemos a inativação da peroxidase endógena através da imersão das secções em peróxido de hidrogênio a 3% em PBS, sendo as secções posteriormente lavadas em PBS

e transferidas para uma solução de avidina-biotina-peroxidase (VECTASTAIN ABC kit; Vector Laboratories) por 1 h. Após esse período, as secções foram novamente lavadas, sendo então incubadas em tampão acetato 0.1M (pH 6.0) e colocadas em uma solução contendo 0.6 mg/ml de diaminobenzidina, 2.5 mg/ml de cloreto de amônio e níquel e 0.1 mg/ml de glucose oxidase (Shu et al, 1988). Fizemos a confirmação da especificidade do padrão de marcação imunohistoquímica pela omissão do anticorpo primário (Saper e Sawchenko, 2003). O controle negativo resultou em ausência de imunoreatividade em todas as estruturas.

### ***3.4- Microscopia e o fracionador óptico.***

A técnica do fracionador óptico consiste em um método estereológico preciso de quantificação que combina as propriedades do dissecor óptico e do fracionador, tendo sido utilizado em uma ampla variedade de estudos para determinar o número de células em diversas regiões encefálicas (West, 1999; West, 2002; Bonthius et al, 2004). A técnica do fracionador óptico não é afetada por mudanças histológicas, encolhimento, ou expansão induzida por dano tecidual (West, 1999).

No presente estudo testamos a hipótese de que o envelhecimento bem como o estilo de vida sedentário podem agravar as alterações microgliais induzidas por alterações no tamanho da ninhada, e de que o exercício físico em diferentes janelas temporais pode influenciar positivamente retardando ou recuperando tais alterações.

Nas secções imunomarcadas para Iba-1 delimitamos as camadas da região de interesse (giro denteado) para a colocação de caixas de contagem no processo de amostragem aleatória sistemática característica do método. Tal delimitação foi realizada através de uma objetiva de baixo aumento (4x) em um microscópio NIKON, Eclipse 80i (Nikon, Japan) equipado com platina motorizada (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). Este aparato foi acoplado a um computador no qual foi instalado o software StereoInvestigator (MBFBioscience, Williston, VT, USA) para analisar e armazenar os dados obtidos das coordenadas X, Y e Z das caixas de contagem obtidas no processo de amostragem. Para o processo de contagem das células microgliais através do dissecor óptico, a objetiva de menor aumento foi substituída por

uma de maior resolução (100x oil immersion plan fluoride objective, Nikon, NA 1.3, DF = 0.19 $\mu$ m).

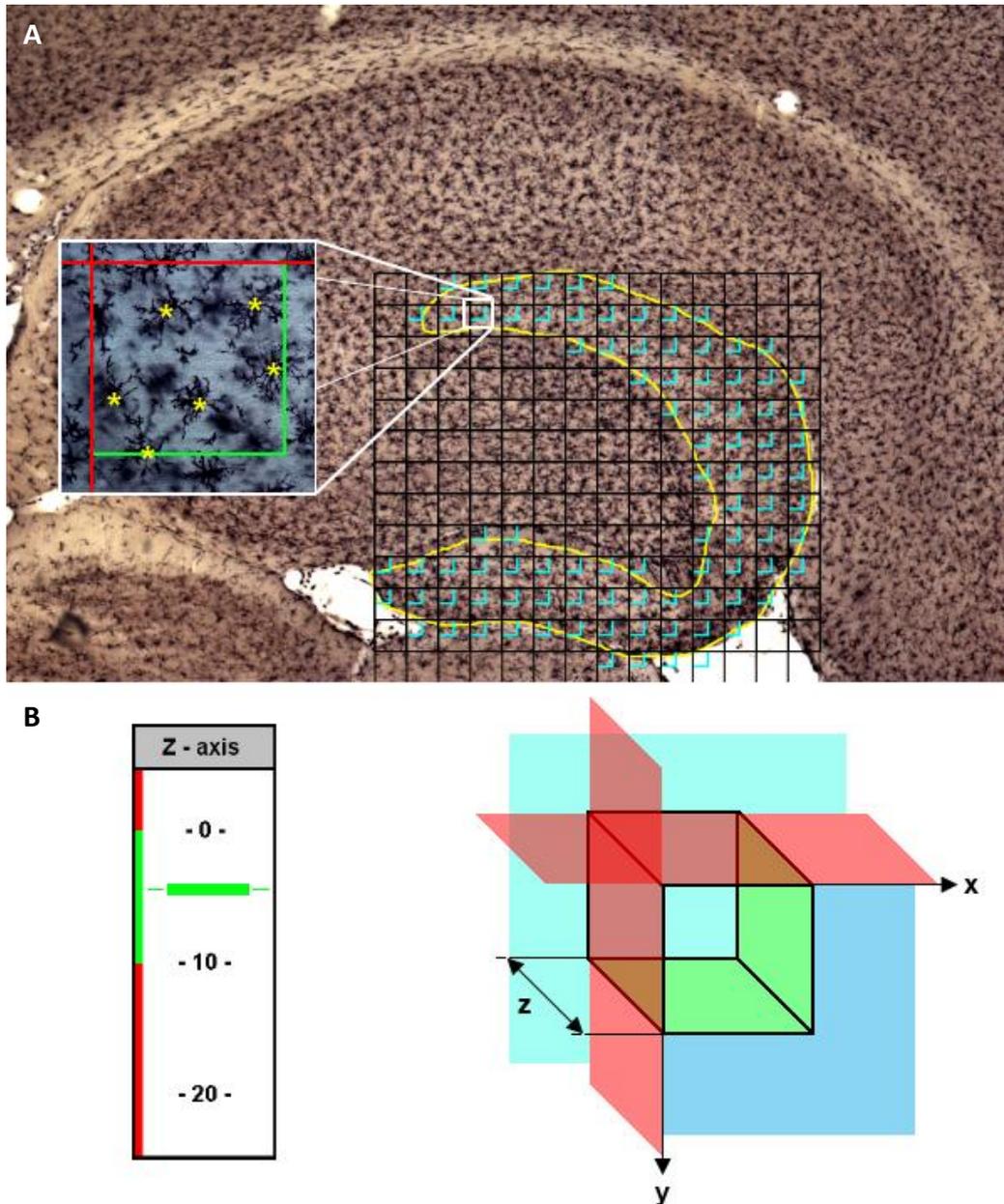


Figura 8. A) Posicionamento da grade de contagem e distribuição sistemática das caixas de contagem sobre a área de interesse delimitada. Em detalhe: caixa de contagem em objetiva de maior aumento (100x), com linhas de inclusão e exclusão. Somente as células cujos corpos celulares estão dentro da área ou tocando a linha de exclusão sem tocar as linhas de exclusão são marcadas. B) Esquerda: Plano de foco no eixo Z da caixa de contagem, Direita: representação tridimensional da caixa de contagem.

A espessura das secções foi cuidadosamente medida em cada sítio de contagem e o microfoco foi utilizado para definir as camadas da superfície e da base da secção. Todos os corpos celulares de células microgliais que se apresentavam em foco dentro da caixa de contagem foram quantificados e adicionados ao número total de marcadores, desde que estivessem inteiramente dentro da caixa de contagem ou sendo tocados pelas linhas de inclusão sem tocar as linhas de exclusão (Gundersen e Jensen, 1987). As caixas de contagem foram distribuídas de forma sistemática e aleatória em uma grade de contagem colocada sobre a área de interesse delimitada.

### ***3.5- Reconstruções tridimensionais das células microgliais do giro denteado.***

Dos animais sedentários jovens e idosos (SS e SSS), um total de 120 células microgliais foram submetidas à reconstrução digital com o auxílio de um microscópio NIKON Eclipse 80i (Nikon, Japão), equipado com platina motorizada (MAC 200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA). As imagens foram adquiridas sob imersão em óleo, com objetiva plana de alta resolução e aumento de 100x (Nikon, NA 1.3 (profundidade de foco),  $DF=0.19\mu\text{m}$ ), em computador com o Software NeuroLucida (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, USA). Somente células com ramificações de completude inequívoca foram selecionadas para a amostra a ser analisada (as células eram descartadas quando os ramos estavam aparentemente cortados ou não estavam completamente impregnados pela coloração). Os ramos terminais eram tipicamente finos. As células (30 para cada grupo experimental, seis para cada animal) foram selecionadas do terço médio da camada molecular do giro denteado, tanto para as secções ventrais quanto para as dorsais. Nas secções escolhidas, as margens da camada molecular puderam ser claramente distintas. Doze parâmetros morfológicos foram avaliados, a saber: 1) comprimento médio dos segmentos ( $\mu\text{m}$ ), 2) área de superfície de ramos ( $\mu\text{m}^2$ ), 3) volume de ramos ( $\mu\text{m}^3$ ), 4) número de segmentos/mm, 5) tortuosidade, 6) complexidade (dimensão fractal; k-dim), 7) área do soma ( $\mu\text{m}^2$ ), 8) perímetro do soma, 9) convexidade do soma, 10) diâmetro de base do ramo primário, 11) número de ramos por micróglia, 12) número de protrusões por micróglia (definidas como terminações verdadeiras, de comprimento menor que  $4\mu\text{m}$ ). Todos os parâmetros foram

determinados pelo software Neuroexplorer (MBF Bioscience Inc., USA). Cada um desses parâmetros observados encontra-se brevemente descrito no quadro abaixo.

<b>Comprimento médio dos segmentos</b>	Soma dos valores do comprimento de todos os ramos (segmentos) pertencente a cada árvore microglial.
<b>Área de superfície de ramos</b>	O início e o fim de cada segmento tem como raio o valor determinado pelo tamanho da inserção circular da cruz do cursor usado durante o traçado. Para estimá-la basta multiplicar os valores dos raios pelo comprimento do segmento. $As = \pi x (r1 + r2) \sqrt{[(r1 - r2)x(r1 - r2) + (LxL)]}$ onde L= comprimento do segmento; r1= raio no início do segmento; r2= raio no fim do segmento.
<b>Volume de ramos</b>	É calculado de acordo com a seguinte equação: $V = \frac{1}{3} x \pi x L x [(r1 x r1) + (r2 x r2) + (r1 x r2)]$ onde L= comprimento do segmento, r1= raio no início do segmento; r2= raio no fim do segmento.
<b>Número de segmentos/mm</b>	Densidade de segmentos da micróglia, medida expressa pela relação entre o número de segmentos e a superfície do ramo.
<b>Tortuosidade</b>	A tortuosidade da arborização microglial é a razão entre o comprimento de um ramo e a distância entre seus pontos de finalizações (ver figura 9).
<b>Complexidade (dimensão fractal)</b>	Limite inferior do número de variáveis essenciais necessárias para descrever a dinâmica de um sistema; aqui ela representa o grau de complexidade morfológica da micróglia.
<b>Área do soma</b>	Área definida pelo contorno do corpo celular.
<b>Perímetro do soma</b>	Medida do comprimento do contorno do soma.
<b>Convexidade do soma</b>	Comprimento do envoltório convexo dividido pelo comprimento do perímetro real. O envoltório convexo é um contorno imaginário, no qual o ângulo entre quaisquer dois segmentos de linhas adjacentes é convexo, de tal forma que este contorno imaginário se encaixa no contorno real o mais próximo possível.
<b>Diâmetro de base do ramo primário</b>	O diâmetro do círculo contido na base da forma cilíndrica do primeiro ramo a sair do corpo celular.
<b>Número de ramos por micróglia</b>	Soma total de todos os pontos de ramificação originando dois ou mais segmentos.
<b>Número de protrusões por micróglia</b>	Soma do número total de protrusões (processos semelhantes a espinhas) presentes em cada micróglia.

Quadro 4. Parâmetros morfométricos analisados nas micróglia. Adaptado de (Santos-Filho, 2013).

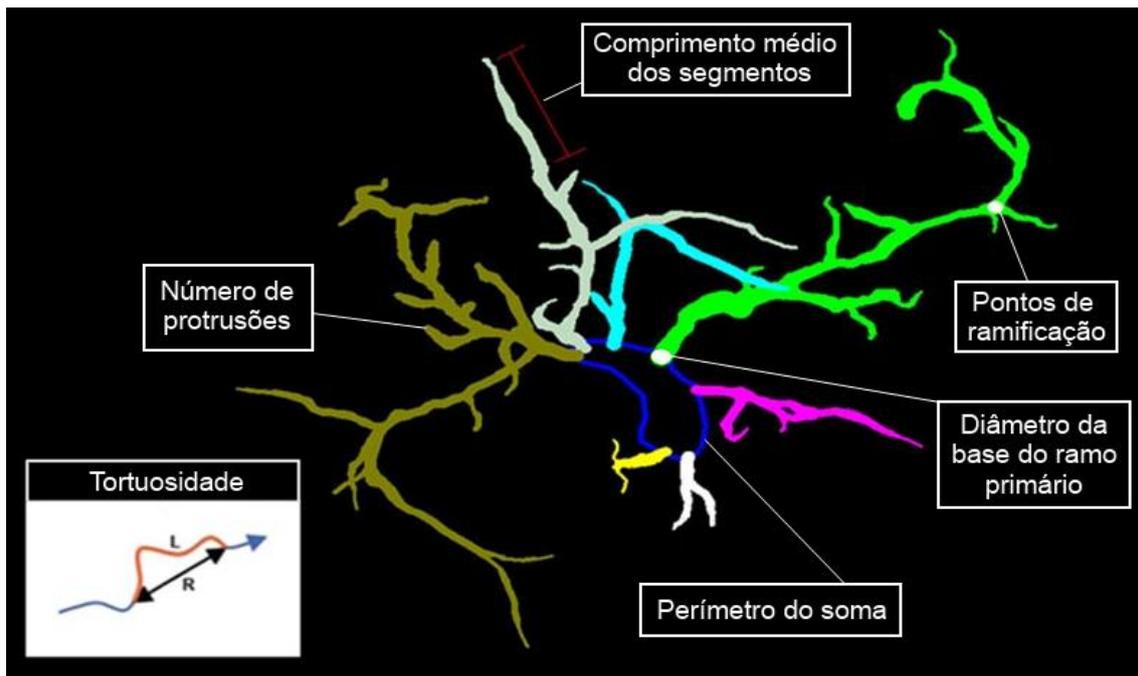


Figura 9. Desenho esquemático de alguns parâmetros morfométricos analisados pelo programa neurolucida. Nota: Tortuosidade (T) é a razão entre os valores de L e R ( $T=L/R$ ). Adaptado de (Santos-Filho, 2013).

### 3.6- Análises estatísticas.

Os dados comportamentais foram analisados através de estatística paramétrica, com teste T bicaudal para detectar o nível de significância entre os períodos de tempo nos quais o animal passou durante a sessão de teste em cada objeto comparado com o tempo total de duração da sessão. O desempenho foi expresso como a proporção de tempo de exploração de cada objeto em relação ao tempo total de exploração. As diferenças foram consideradas significativas apenas se a média do tempo de exploração de um objeto fosse superior em 60% ou mais em relação ao outro objeto. Nos testes estatísticos, o limite de significância foi estabelecido em  $p < 0.05$ .

Os dados das estimativas do número de células microgliais no giro denteado são apresentados sob a forma de médias  $\pm$  erro padrão. O tamanho das grades e caixas de contagem foram ajustados para a obtenção de um coeficiente de erro aceitável. Para o coeficiente de erro do total de células microgliais contadas para cada sujeito

experimental, adotamos o procedimento de amostragem sistemática de uma fase (Scheaffer CE), já validado anteriormente (Glaser e Wilson, 1998).

O nível de erro aceitável para as estimativas estereológicas foi definido como a relação do erro intrínseco introduzido pela metodologia e o coeficiente de variação (CV) (Glaser e Wilson, 1998). O coeficiente de erro (CE) expressa o nível de precisão das estimativas do número de células; um coeficiente de erro menor/igual a 0.05 foi considerado aceitável para o presente estudo pelo fato de a variância introduzida pelo procedimento de estimativa contribuir pouco para a variância observada no grupo (Slomianka e West, 2005). A relação entre  $CE^2/CV^2$  não deve ser maior que 0.5, entretanto existem exceções, e a adesão estrita a esta regra não é aconselhável (Slomianka e West, 2005). No presente estudo detectamos tais exceções, e os valores de  $CE^2/CV^2$  foram maiores do que os recomendados pela regra, entretanto nesses casos a variação biológica e o coeficiente de erro introduzidos pela metodologia foram bastante baixos, e a aplicação da regra não foi significativa ou prática (Slomianka e West, 2005).

As estimativas estereológicas de todos os grupos foram comparadas através de análise de variância ANOVA dois critérios, com teste *a priori* de Bonferroni, utilizando os softwares BioEstat 5.0 e GraphPad 5.1. Níveis de significância foram considerados aceitáveis a 95%,  $p < 0.05$ .

## **4.Resultados**

### ***4.1- Observações da progressão do crescimento e maturação somática: comparações do ganho de peso no período pós-natal em ambas as fases experimentais.***

#### *4.1.1- Pesos corporais dos animais.*

A figura 10 mostra um mapa comparativo dos valores médios e respectivos erros padrão do peso corporal dos animais experimentais após 7, 14, 21, 30, 90 e 600 (primeira fase) e 7, 14, 21, 30, 60, 120 e 155 (segunda fase) dias de vida pós-natal.

Um ganho progressivo e significativo de peso foi observado em todas as janelas temporais, independentemente do tamanho da ninhada, em ambas as fases. Na primeira fase, os animais das ninhadas grandes tiveram seu peso significativamente reduzido em relação às ninhadas menores do 7º ao 30º dias de vida pós-natal. Após esse período, a média dos valores de peso corporal para os animais das ninhadas grandes e menores não apresentaram diferenças significativas entre si, alcançando o 90º dia de vida sem diferenças. Entretanto, ao 600º dia de vida, a diferença de peso entre os animais das ninhadas grandes e pequenas apresentou-se novamente significativa. Já na segunda fase, em todas as janelas temporais nas quais fizemos aferições, os pesos corporais dos animais das ninhadas pequenas foram significativamente maiores que os dos animais das ninhadas grandes. Em ambas as fases, as diferenças entre os pesos dos animais provenientes das ninhadas grandes e pequenas foram mais pronunciadas na infância (até o 30º dia pós-natal), sendo a diferença mais marcante no 14º dia pós-natal. Após esse período, observamos uma redução da diferença proporcional entre os pesos dos animais de ninhadas grandes e pequenas.

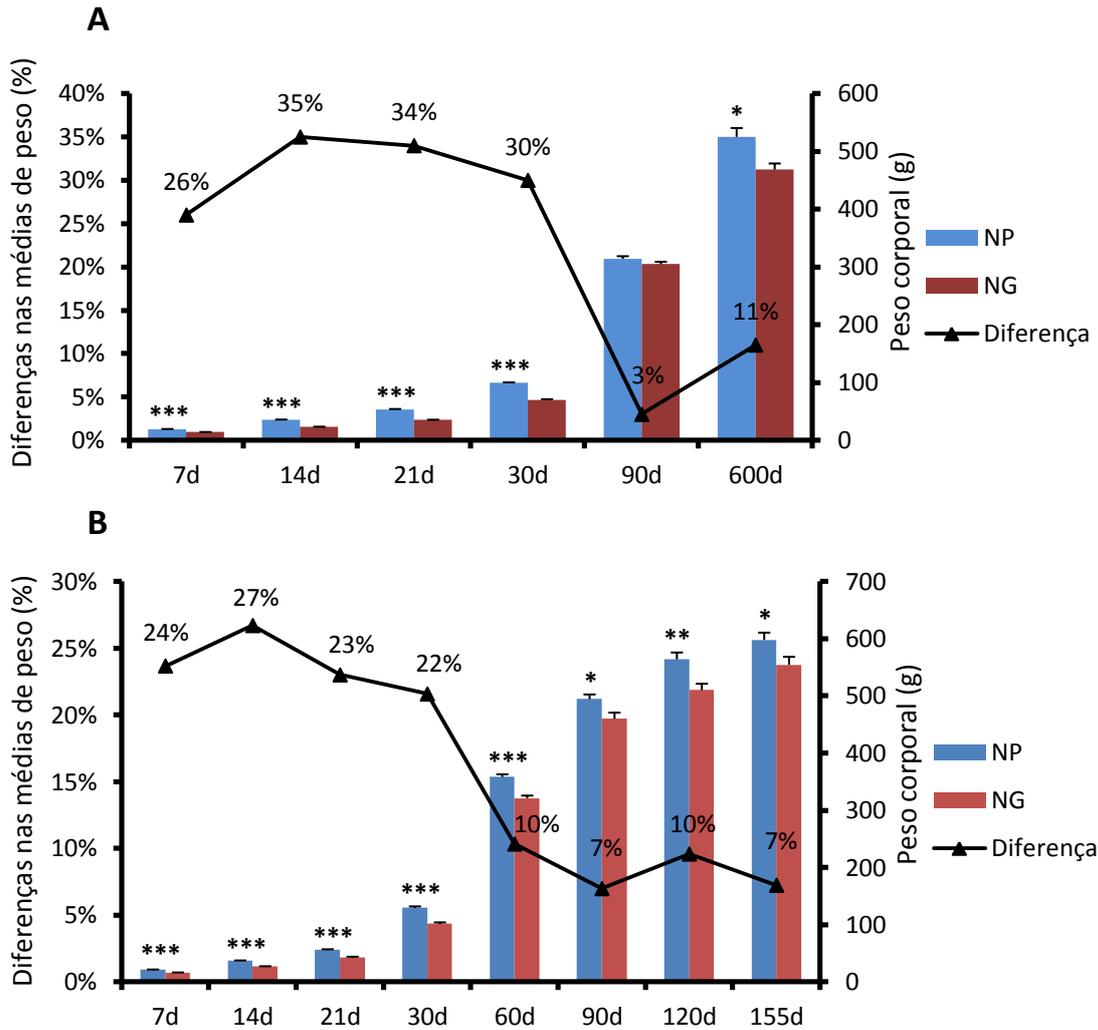


Figura 10. Gráficos representativos das médias de peso corporal. Os gráficos acima representam a média dos pesos corporais dos animais de ninhadas grandes e pequenas na primeira (A) e segunda (B) fases do presente estudo. NP: ninhada pequena, NG: ninhada grande. Teste t bicaudal, \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*  $p < 0,05$ .

Ao compararmos os pesos corporais dos animais adultos sedentários e exercitados separadamente logo após o final do período de treinamento em esteira em ambas as fases experimentais (90°, 155° ou 600° dia pós-natal), podemos observar que o efeito do exercício sobre o peso corporal nos animais provenientes de ninhadas pequenas e grandes varia de acordo com a janela temporal. Aos 90 dias pós-natais, além de não terem sido observadas diferenças significativas de peso entre os animais de ninhadas grandes e pequenas, o exercício parece não exercer influência sobre o peso corporal dos animais nessa fase. Entretanto, na fase adulta (155d) e durante o envelhecimento (600d) o período de exercícios alterou significativamente o peso dos animais.

Observamos, aos 155 dias, que as diferenças de peso corporal entre os grupos sofreram influência significativa do exercício ( $F=8.30$ ,  $p=0,0060$ ), e do tamanho da ninhada ( $F=6,51$ ,  $p=0,0141$ ). Nessa fase, as diferenças entre os pesos dos animais de ninhadas grandes e pequenas apresenta significância estatística no subgrupo dos animais sedentários, entretanto no subgrupo exercitado a diferença torna-se não significativa. Aos 600 dias, entretanto, observamos o inverso: no subgrupo sedentário não existem diferenças significativas de peso entre os grupos, sendo significativa a diferença entre os animais exercitados de ninhadas grandes e pequenas (Figura 11).

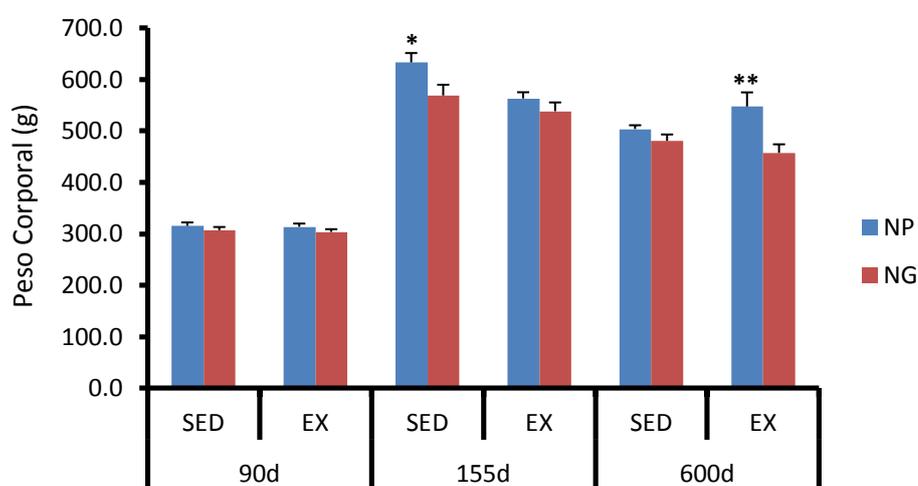


Figura 11. Gráfico representando as médias de peso corporal dos animais sedentários e exercitados de ninhadas grandes e pequenas nos 90°, 155° e 600° dias pós-natais. SED: sedentários, EX: exercitados, NP: ninhada pequena, NG: ninhada grande. \* ANOVA, dois critérios, Bonferroni *pós-teste*,  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ .

#### ***4.2- Alterações microgliais induzidas por alterações no tamanho da ninhada, envelhecimento e exercício em diferentes janelas temporais e suas correlações comportamentais.***

Por razões de ordem prática, os resultados obtidos na primeira fase de experimentos foram divididos no sentido de obter comparações mais simples entre as diferentes variáveis estudadas. Essas diversas comparações são o foco de dois dos artigos deste projeto, o primeiro deles já publicado (Anexo V), e o segundo ainda em processo de redação (Anexo VI) e cujos dados são apresentados a seguir.

**4.3-Efeitos do tamanho da ninhada e do envelhecimento sobre o número e morfologia de micróglia no giro denteado (Artigo: Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: Stereological analysis and three dimensional morphometry – Neuroscience 2013).**

**4.3.1- Quantificação das células microgliais no giro denteado.**

A figura 12 mostra as médias das estimativas do número de micróglia nas camadas molecular, granular e polimórfica do giro denteado. A análise estatística através de análise de variância ANOVA dois critérios mostrou que o número de células microgliais em todas as camadas do giro denteado foi influenciado pelo envelhecimento (molecular:  $F = 12.03$ ,  $p = 0.003$ ; granular:  $F = 18.6$ ,  $p = 0.0005$ ; polimórfica:  $F = 47.19$ ,  $p = 0.0001$ ) e pelo tamanho da ninhada (molecular:  $F = 38.53$ ,  $p = 0.0001$ ; granular:  $F = 33.79$ ,  $p = 0.0001$ ; polimórfica:  $F = 77.78$ ,  $p = 0.0001$ ). Uma interação significativa entre a idade e o tamanho da ninhada foi detectada somente na camada polimórfica ( $F = 7.93$ ,  $p = 0.012$ ). Os dados estereológicos detalhados para cada camada, em cada indivíduo, e para cada grupo experimental são mostrados no anexo IV.

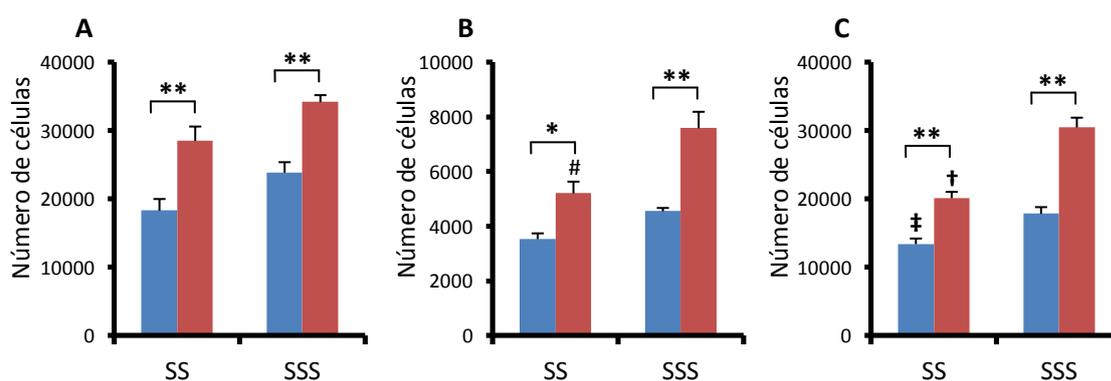


Figura 12. Representações gráficas das estimativas da quantidade de micróglia no giro denteado de animais adultos e idosos. Médias do número de células nas camadas molecular (A), granular (B) e polimórfica (C) do giro denteado dos animais adultos (SS) e idosos (SSS). ANOVA, dois critérios. \*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$  indicam diferença entre os animais de ninhadas pequenas e grandes; †  $p < 0.001$ , ‡  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$  indicam diferença entre os animais jovens e idosos provenientes de ninhadas de mesmo tamanho. ■ - ninhada pequena; ■ - ninhada grande.

Note que, independente da idade, os animais provenientes de ninhadas grandes apresentam um número maior de células do que os animais das ninhadas pequenas. Um alto grau de microgliose em todas as camadas foi observado nos animais idosos de ninhadas grandes. Em contraste, o grupo idoso de ninhadas pequenas apresenta microgliose somente na camada polimórfica.

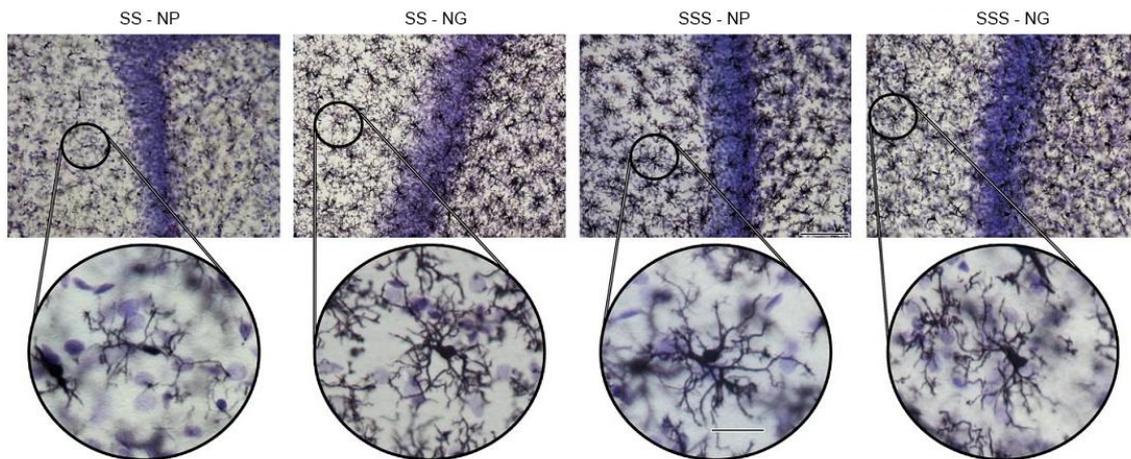


Figura 13. Acima: Fotomicrografias representativas das médias de cada grupo experimental. A contracoloração por Nissl indica os limites da camada granular. Abaixo: Fotomicrografias em grande aumento mostrando em detalhe células microgliais da camada molecular para cada grupo experimental, para ilustrar as alterações morfológicas em função da idade e tamanho da ninhada. As células mostradas são representativas das médias dos parâmetros morfológicos observados nas reconstruções. Escalas: acima, 100 $\mu$ m; abaixo, 25 $\mu$ m. SS: grupo jovem sedentário; SSS: grupo idoso sedentário; NP: ninhada pequena; NG: ninhada grande.

#### 4.3.2- Distribuição laminar da micróglia nas camadas do giro denteado.

O gráfico representado na figura 14 mostra a influência do tamanho da ninhada e do envelhecimento sobre a distribuição laminar das células microgliais no giro denteado. O envelhecimento provocou alterações estatisticamente significativas na distribuição das micróglia entre as camadas molecular e polimórfica do giro denteado (molecular:  $F=4.65$ ,  $p=0.046$ ; polimórfica:  $F=4.51$ ,  $p=0.049$ ). Apenas os animais provenientes de ninhadas grandes apresentaram uma redistribuição laminar da micróglia associada à idade, afetando primordialmente as camadas molecular e polimórfica.

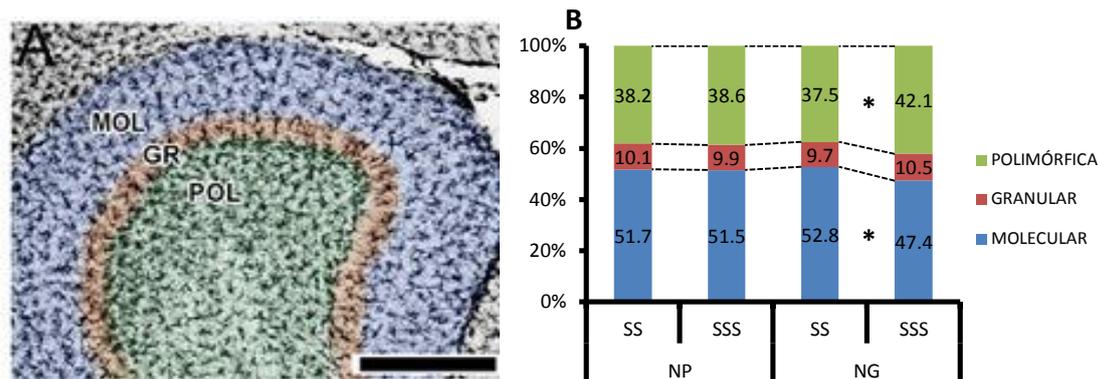


Figura 14. Padrão de distribuição da micróglia nas camadas do giro dentado nos grupos SS e SSS. A) Fotomicrografia em pequeno aumento mostrando a delimitação das camadas do giro dentado. Escala: 500 $\mu$ m. B) Distribuição laminar das células microglicais nas camadas polimórfica, granular e molecular do giro dentado. Os valores encontram-se expressos sob a forma de percentuais de cada camada em relação ao total de células na estrutura. ANOVA, dois critérios, \* $p < 0,05$ .

#### 4.3.3- Análise morfométrica da micróglia na camada molecular do giro dentado.

A figura 16 ilustra uma série de reconstruções tridimensionais das “micróglias médias” da camada molecular dos animais jovens e idosos provenientes de ninhadas pequenas e grandes. Os dendrogramas correspondentes mostram o padrão das extensões de ramificações para cada grupo experimental. Note que as micróglias dos animais idosos exibem ramos mais espessos e aumento do soma em relação aos animais jovens. Ainda, as micróglias dos animais provenientes de ninhadas grandes parecem ser mais ramificadas que as dos animais provenientes de ninhadas pequenas.

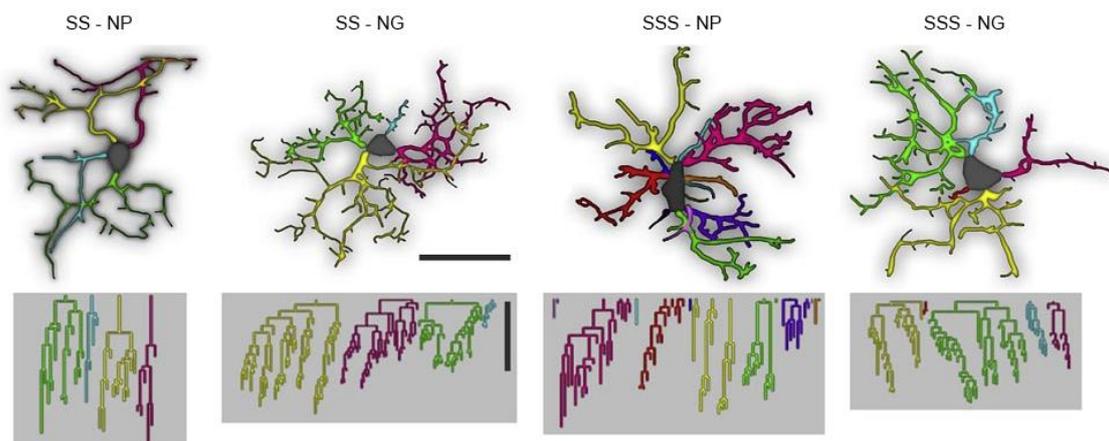


Figura 15. Reconstruções tridimensionais das micróglia representativas para cada grupo experimental. Note as diferenças morfológicas entre as ninhadas grandes e pequenas, bem como entre os animais jovens e idosos. Acima: micróglia representativa dos animais jovens (SS) e idosos (SSS) provenientes de ninhadas pequenas (NP) e grandes (NG). Os ramos individuais apresentam cores diferentes a fim de facilitar a distinção. Abaixo: Dendrogramas lineares das árvores dendríticas; o comprimento de cada segmento é apresentado em escala; ramos irmãos estão horizontalmente deslocados e apresentam cores correspondentes à das reconstruções acima. Os dendrogramas foram traçados e analisados com o software Neuroexplorer (MicroBrightField). Escala: 30 $\mu$ m.

Uma análise quantitativa das alterações dos parâmetros morfométricos observados nas reconstruções tridimensionais é mostrada na figura 16. Em média, independente do tamanho da ninhada, o envelhecimento está associado a um aumento significativo na área do soma (NG  $p < 0.001$ , NP  $p < 0.016$ ), perímetro do soma (NG  $p < 0.002$ , NP  $p < 0.0503$ ), diâmetro de base do ramo primário (NG  $p < 0.001$ , NP  $p < 0.001$ ), número de ramos por micróglia (NG  $p < 0.004$  NP  $p < 0.007$ ), área de superfície dos ramos (NG  $p < 0.02$ , NP  $p < 0.002$ ) e volume dos ramos (NG  $p < 0.003$ , NP  $p < 0.001$ ). Contudo, nos animais de ninhadas grandes o efeito do envelhecimento sobre a micróglia foi realçado, com expansão significativamente maior no volume dos ramos ( $p < 0.044$ ), engrossamento do diâmetro de base do ramo primário ( $p < 0.001$ ), e aumento da área do corpo celular ( $p < 0.013$ ), entretanto, estes animais apresentaram um efeito reduzido do envelhecimento no número de segmentos por milímetro ( $p < 0.05$ ).

O tamanho da ninhada também afetou os parâmetros morfológicos em indivíduos adultos jovens. Comparados ao grupo de ninhada pequena, o grupo de ninhada grande apresentou um aumento do comprimento médio dos segmentos ( $p < 0.015$ ), área de superfície ( $p < 0.0027$ ), volumes de ramos ( $p < 0.0025$ ), número de segmentos por milímetro ( $p < 0.05$ ), número de protrusões ( $p < 0.01$ ), complexidade

(dimensão fractal) ( $p < 0.014$ ), e número de ramos por micróglia ( $p < 0.032$ ), porém apresentaram redução da tortuosidade ( $p < 0.024$ ).

A análise de regressão linear demonstrou uma correlação entre os volumes dos ramos, as áreas de superfície dos ramos e as estimativas do número de micróglia na camada molecular, independente da idade ou do tamanho da ninhada (Figura 17). Outras variáveis morfológicas também apresentaram correlação significativa com o número de micróglia na camada molecular (tortuosidade:  $p = 0.02$ ; diâmetro de base do ramo primário:  $p = 0.002$ ; número de protrusões:  $p = 0.01$ ; perímetro do soma:  $p = 0.009$ ; área do soma:  $p = 0.003$ ).

A análise de clusters foi realizada com base em características morfométricas e estimativas estereológicas com índices de correlação acima de 65% (área do soma, diâmetro de base, área dos ramos e volume dos ramos). Esta análise revelou que indivíduos jovens e idosos apresentam dendrogramas claramente distintos. A análise discriminante indicou que o número de células e a área dos ramos constituem os principais componentes para a distinção entre os grupos experimentais comparados nesta análise (Figura 17).

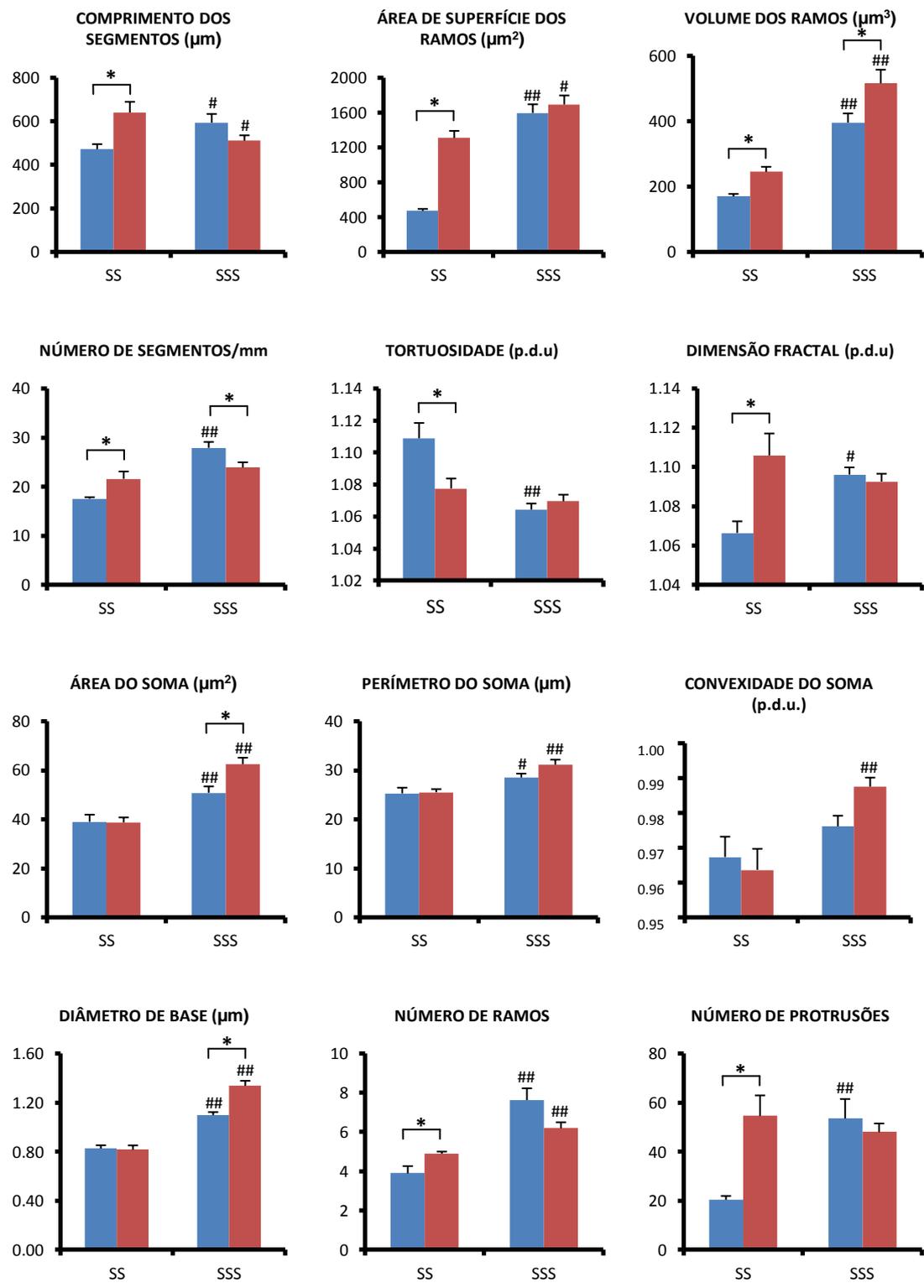


Figura 16. Parâmetros morfométricos das micróglia médias. Estes parâmetros foram mensurados pelas reconstruções tridimensionais na camada molecular dos animais adultos jovens (SS) e idosos (SSS) provenientes de ninhadas pequenas (■) e grandes (■). \* p<0.05, \*\* p<0.01 indicam as diferenças significativas entre animais de tamanhos de ninhadas diferentes; # p<0.05, ## p<0.01 indicam as diferenças entre animais adultos e idosos. ANOVA, dois critérios, post-tests de Bonferroni; p.d.u. (*procedure defined unit*) unidade definida pelo procedimento (unidades arbitrárias).

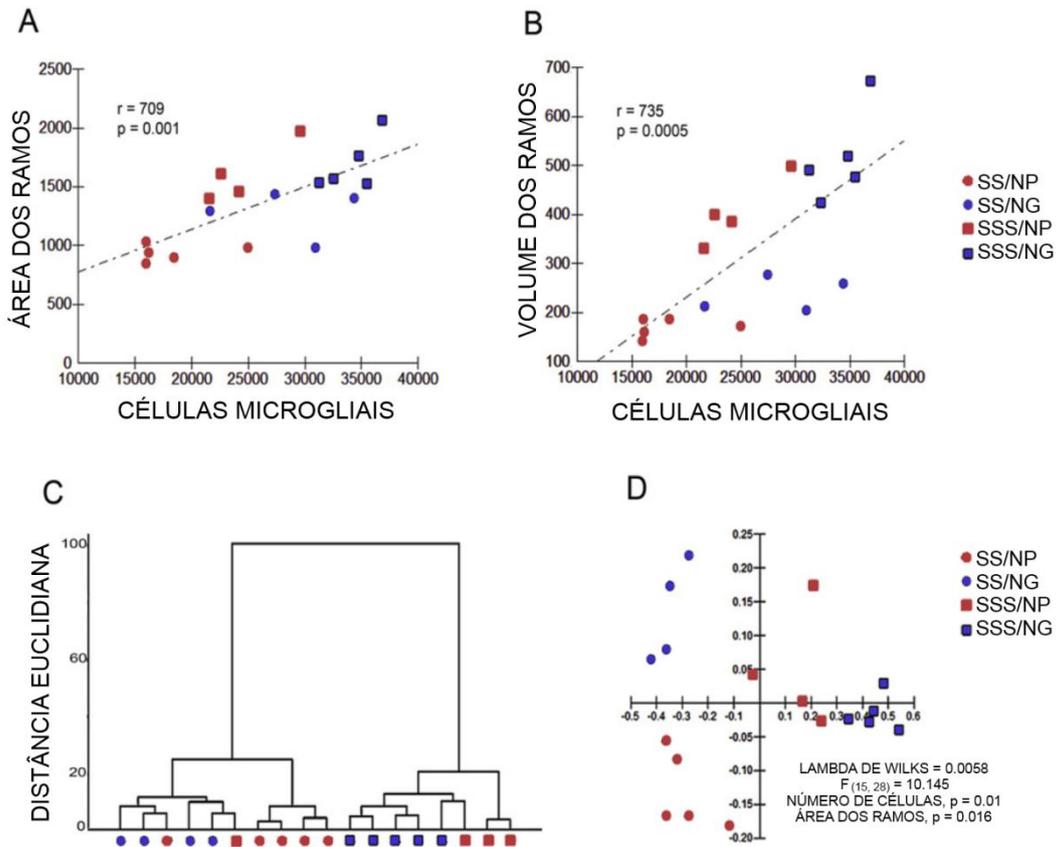


Figura 17. Número de células microgliais, morfometria, análise de cluster e análise discriminante associada à idade e ao tamanho da ninhada. (A, B) correlações lineares são mostradas entre o número de micróglia e áreas (A) ou volumes (B) dos ramos para os grupos de diferentes idades e tamanhos de ninhada. (C) análise de clusters mostraram grupos distintos para os animais idosos e jovens, com exceção de um indivíduo idoso. (D) análise discriminante indica um efeito claro do tamanho da ninhada sobre as alterações induzidas pelo envelhecimento. SS: animais jovens; SSS: animais idosos; NG: ninhada pequena; NP: ninhada grande.

A figura 18 consiste em uma representação gráfica que ilustra os resultados obtidos através dos dados morfométricos. Observe que os efeitos do tamanho da ninhada influenciam principalmente o padrão de ramificação da micróglia. Por outro lado, o envelhecimento provoca o aumento do soma e de características morfométricas dos ramos. O aumento da ninhada e o envelhecimento interagem de forma combinada gerando o aumento do soma, diâmetro de base do ramo primário, e área de superfície dos ramos.

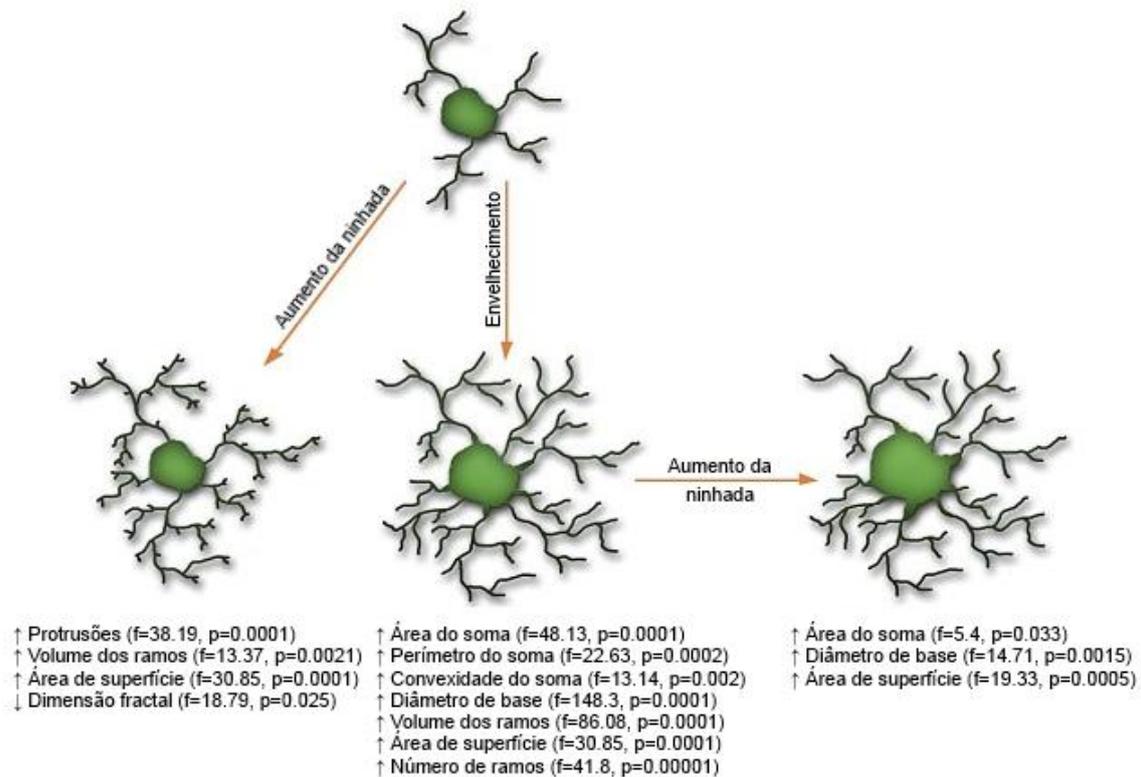


Figura 18. Representações gráficas dos efeitos do aumento da ninhada e do envelhecimento sobre a morfologia microglial da camada molecular. Uma micróglia média (acima) é mostrada anteriormente aos efeitos separados e combinados do tamanho da ninhada e do envelhecimento (abaixo). Esquerda: o tamanho da ninhada afeta principalmente o padrão de ramificação da micróglia; meio: o envelhecimento afeta tanto o soma quanto as características morfométricas dos ramos; direita: os efeitos combinados do tamanho da ninhada e do envelhecimento influenciam a área do soma, diâmetro de base dos ramos primários e área de superfície dos ramos.

**4.4- Efeitos do exercício físico sobre as alterações microgliais no giro denteado induzidas por manipulações no tamanho da ninhada e pelo envelhecimento. (Artigo: *Litter size and sedentary lifestyle affect aging cognitive decline and microglial number in the rat dentate gyrus – em preparação*).**

**4.4.1- Testes de memória hipocampo-dependentes.**

As figuras 19 e 20 mostram os resultados dos testes de memória espacial e reconhecimento de objetos dos animais dos grupos SSS, SSE (idosos), SS e SE (adultos). Analisados conjuntamente, os resultados de ambos os testes mostram que o estilo de vida sedentário prejudicou a memória espacial tanto dos animais envelhecidos

quanto dos jovens independentemente do tamanho da ninhada, e o exercício reduziu esse déficit nos animais idosos de ninhadas pequenas, sem o mesmo efeito nos animais idosos provenientes de ninhadas grandes. Por outro lado, somente os animais idosos sedentários provenientes de ambas as ninhadas apresentaram prejuízo de memória de reconhecimento de objeto, e o exercício atenuou esse déficit independentemente do tamanho da ninhada.

#### 4.4.2- Teste de reconhecimento de objeto.

Animais exercitados adultos e idosos, independentemente do tamanho da ninhada, foram capazes de distinguir entre um objeto familiar e um novo objeto. Em contraste, os animais idosos sedentários independentemente do tamanho da ninhada foram incapazes de fazer essa distinção. Animais adultos sedentários das ninhadas pequenas foram capazes de distinguir os dois objetos, diferentemente dos adultos sedentários de ninhadas grandes (Figura 20). Teste T bicaudal: (ninhada pequena: SS,  $t = -2.58$ ,  $p = 0.042$ ; SE,  $t = -4.03$ ,  $p = 0.002$ ; SSE,  $t = 2.91$ ,  $p = 0.023$ ; ninhada grande: SE,  $t = -3.14$ ,  $p = 0.01$ ; SSE,  $t = -2.76$ ,  $p = 0.033$ ).

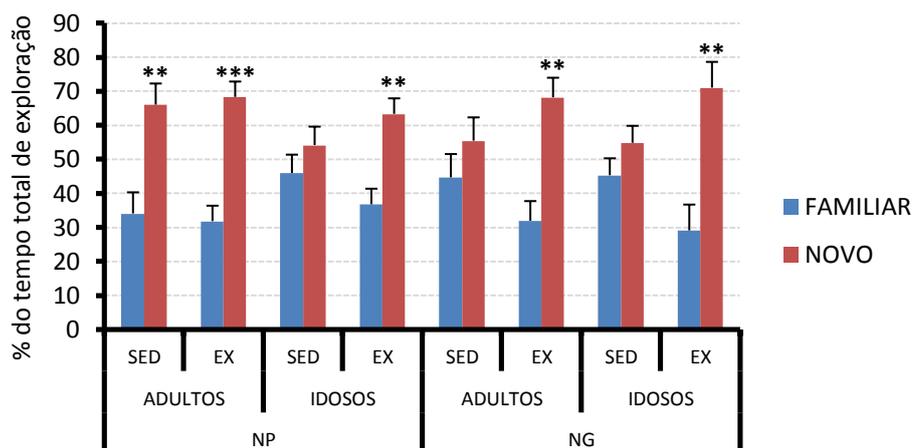


Figura 19. Representação gráfica das médias dos tempos de exploração do teste de reconhecimento de objetos dos animais adultos e idosos. NP: ninhada pequena, NG: ninhada grande, SED: sedentários, EX: exercitados. Teste T bicaudal, \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.4.3- Teste de memória espacial.

Todos os animais sedentários independentemente do tamanho da ninhada e idade foram incapazes de distinguir objetos estacionários de objetos em localização alterada. Em contraste, os animais exercitados dos grupos adultos e idosos de ninhadas pequenas e os animais exercitados adultos, mas não os idosos de ninhadas grandes foram capazes de distinguir objetos estacionários de objetos deslocados do lugar anterior. Teste T Bicaudal: (ninhada pequena: SE,  $t = -2.72$ ,  $p = 0.021$ ; SSE,  $t = -3.79$ ,  $p = 0.006$ ; ninhada grande: SE,  $t = -2.28$ ,  $p = 0.047$ ).

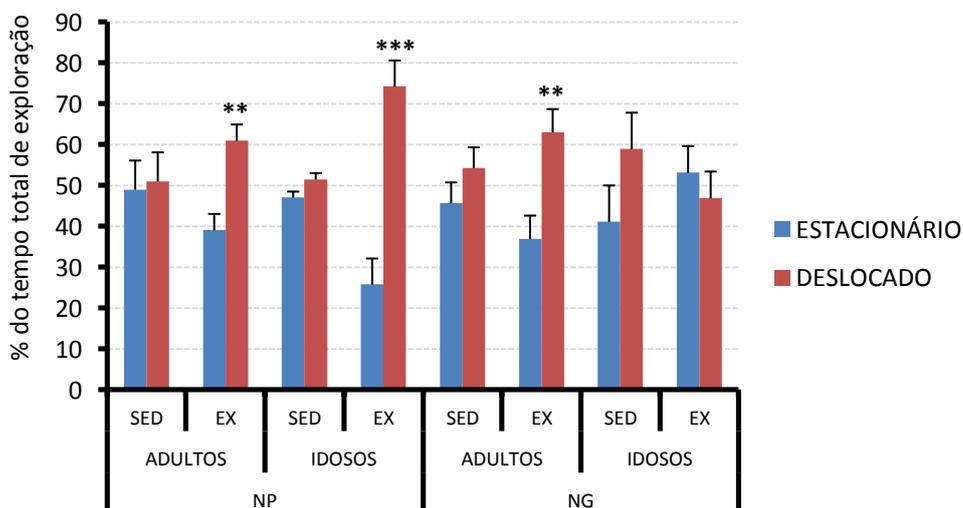


Figura 20. Representação gráfica das médias dos tempos de exploração do teste de memória espacial dos animais experimentais adultos e idosos. NP: ninhada pequena, NG: ninhada grande, SED: sedentários, EX: exercitados. Teste T bicaudal, \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.4.4- Quantificação das células microgliais no giro denteado.

A figura 21 ilustra uma série de fotomicrografias de secções imunomarcadas para IBA-1 do giro denteado de animais que obtiveram valores representativos das médias dos grupos experimentais, constituídos por animais jovens e idosos submetidos a diferentes condições perinatais e a diferentes condições físicas na idade adulta e durante o envelhecimento (grupos SS e SE: jovens sedentários e exercitados, aos 4m de

vida; grupos SSS e SSE: idosos sedentários e exercitados, aos 17m de vida; todos subdivididos em grupos provenientes de ninhadas pequenas e grandes). As linhas nas fotomicrografias indicam a localização da camada granular localizada entre as camadas molecular e polimórfica no giro denteado.

Para as estimativas da quantidade de células microgлияis no giro denteado dos grupos experimentais, o teste ANOVA indicou que tanto o exercício como o tamanho da ninhada e o envelhecimento influenciaram os resultados, havendo interações entre as variáveis.

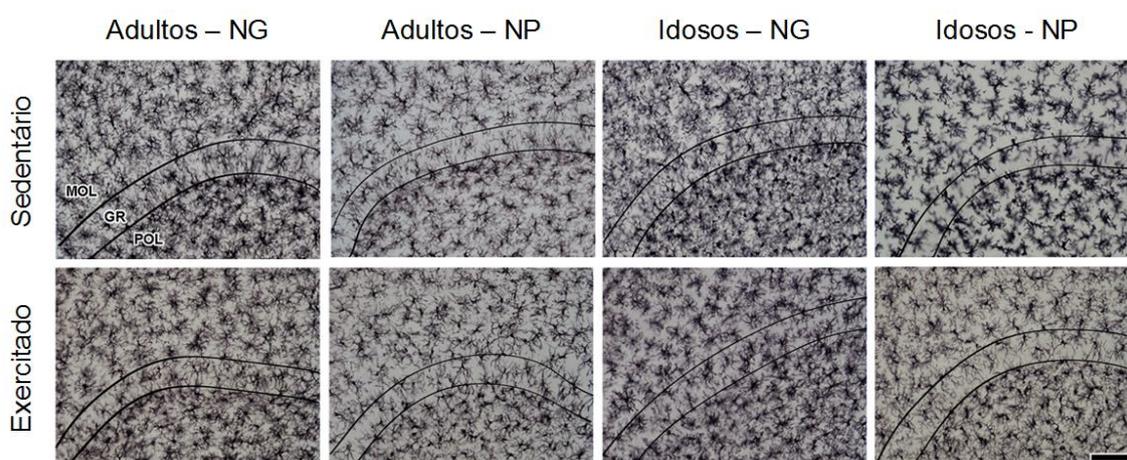


Figura 21. Fotomicrografias de secções representativas das médias da quantidade de micrógлияs do giro denteado dos grupos experimentais, imunomarcadas para IBA-1. As linhas nas figuras indicam os limites da camada granular localizada entre as camadas molecular e polimórfica do giro denteado. NG: ninhada grande; NP: ninhada pequena. Escala: 100µm.

Na camada molecular, os animais de ninhadas grandes apresentam um aumento significativo no número de micrógлияs comparados aos animais de ninhadas pequenas, independentemente da idade ou da condição física. Animais idosos sedentários apresentam um aumento significativo do número de micrógлияs em relação aos animais adultos de mesmo tamanho de ninhada, e o exercício físico reduziu esses efeitos. O tamanho da ninhada ( $F=66.4$ ,  $p<0.000001$ ), a idade ( $F= 10.5$ ,  $p<0.0027$ ) e o exercício ( $F=4.71$ ,  $p<0.0374$ ) afetaram o número de micrógлияs na camada molecular. Nessa camada foram detectadas interações entre tamanho da ninhada vs exercício ( $F=8.82$ ,  $p<0.0056$ ) e idade vs exercício ( $F= 8.81$ ,  $p<0.0056$ ) (Figura 22 A).

Na camada granular, diferentemente do que foi observado na camada molecular, o exercício parece proteger os animais adultos das ninhadas grandes. Em adição, os animais idosos exercitados apresentaram um número maior de micróglia que os animais adultos exercitados. O tamanho da ninhada ( $F=50.0$ ,  $p<0.000001$ ), a idade ( $F=34.8$ ,  $p<0.000001$ ) e o exercício ( $F=7.48$ ,  $p<0.01$ ) afetaram o número de micróglia na camada granular. Foram observadas interações estatisticamente significativas entre o tamanho da ninhada vs exercício ( $F=8.25$ ,  $p<0.0071$ ) e o tamanho da ninhada vs idade ( $F=4.75$ ,  $p<0.0367$ ) (Figura 22 B).

Na camada polimórfica, independentemente da idade, os animais sedentários das ninhadas grandes apresentaram um aumento no número de micróglia comparados aos animais de mesma idade de ninhadas pequenas, e o exercício reduziu essas diferenças nos animais idosos. Nessa camada os animais idosos de ninhadas pequenas, independente da condição física apresentam aumento no número de micróglia comparados aos grupos adultos. O tamanho da ninhada ( $F=104$ ,  $p<0.000001$ ), a idade ( $F= 57.3$ ,  $p< 0.000001$ ) e o exercício ( $F= 4.91$ ,  $p<0.0338$ ) influenciaram de forma significativa os resultados. Interações foram observadas entre todas as variáveis nessa camada (tamanho da ninhada vs idade vs exercício  $F=12.3$ ,  $p<0.0013$ ). Os dados estereológicos detalhados são apresentados no anexo IV.

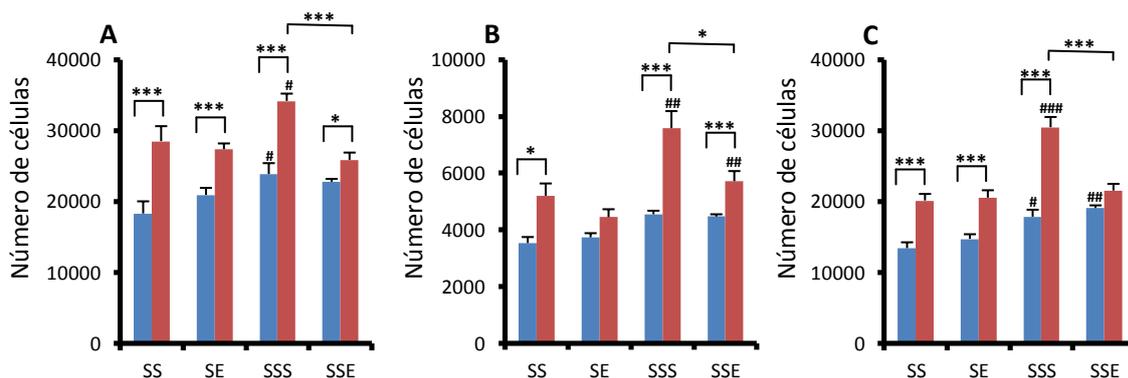


Figura 22. Representações gráficas das estimativas do número de micróglia no giro denteado de animais jovens e idosos em diferentes condições de exercício. Camadas molecular (A), granular (B) e polimórfica (C) do giro denteado dos animais jovens sedentários (SS) e exercitados (SE), e idosos sedentários (SSS) e exercitados (SSE), provenientes de ninhadas pequenas (■) e grandes (■). ANOVA, três critérios. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ . #  $p<0.05$ , ##  $p<0.01$ , ###  $p<0.001$  indicam diferenças significativas entre animais de diferentes idades.

#### 4.4.5- Distribuição laminar da micróglia nas camadas do giro denteado.

A figura 23 ilustra a influência do tamanho da ninhada, do envelhecimento e do exercício físico sobre a distribuição laminar da micróglia no giro denteado dos animais adultos e idosos. Conforme já observado anteriormente, a distribuição laminar das micróglia nas camadas molecular e polimórfica parece ser influenciada pelo envelhecimento de maneira oposta: O número de células aumenta na camada polimórfica de forma equivalente ao seu decréscimo na camada molecular. Entretanto, animais sedentários provenientes de ninhadas pequenas não apresentaram alterações na distribuição laminar quando idosos, enquanto que animais exercitados provenientes de ninhadas grandes aumentam a porcentagem de micróglia na camada granular com redução na camada molecular. Observe que a ocorrência da redistribuição laminar da micróglia é um evento que parece ser associado ao tamanho da ninhada e ao envelhecimento, tendo seus efeitos reduzidos pelo exercício.

O envelhecimento influencia na distribuição laminar da micróglia nas camadas polimórfica ( $F= 11.9$ ,  $p<0.0015$ ) e molecular ( $F= 17.4$ ,  $p<0.0002$ ), com interações significativas entre todas as variáveis na camada polimórfica (tamanho da ninhada *vs* envelhecimento *vs* condição física  $F=5.13$   $p< 0.0303$ ). O tamanho da ninhada e o envelhecimento afetam a camada granular, com interação significativa entre essas variáveis ( $F=6.72$ ,  $p<0.0142$ ).

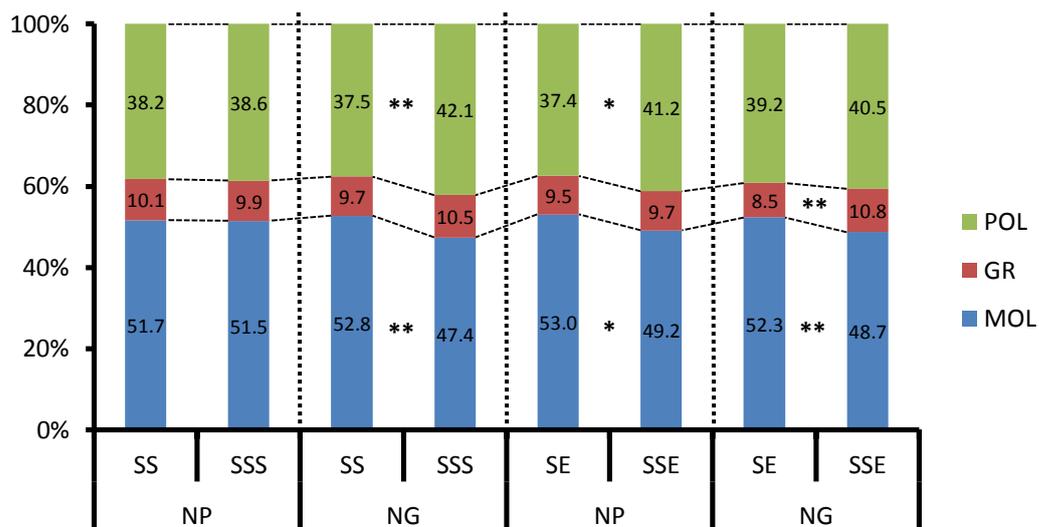


Figura 23. Distribuição laminar percentual das células microgliais. Camadas polimórfica (POL), granular (GR) e molecular (MOL) do giro denteado para cada subgrupo experimental. NP: ninhada pequena, NG: ninhada grande. ANOVA, três critérios, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

**4.5- Efeitos do exercício físico em diferentes janelas temporais sobre as alterações microgliais no giro denteado induzidas por manipulações no tamanho da ninhada.**  
*(Artigo: Treadmill exercise at different time windows differently affects the pattern of microglial proliferation in the dentate gyrus in adult Wistar rats submitted to changes in litter size during lactation – Artigo em processo de redação).*

**4.5.1- Estimativas da quantidade de células microgliais no giro denteado.**

A figura 24 consiste em uma série de fotomicrografias de secções imunomarcadas para IBA-1 do giro denteado de animais jovens que obtiveram valores representativos das médias dos grupos provenientes de ninhadas pequenas ou grandes, submetidos a exercício físico em diferentes janelas temporais: animais treinados após o desmame e na vida adulta (EE), treinados após o desmame e sedentários na vida adulta (ES), sedentários após o desmame e treinados na vida adulta (SE), ou sedentários durante toda a vida (SS). As linhas nas fotomicrografias indicam a localização da camada granular localizada entre as camadas molecular e polimórfica no giro denteado.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número de micróglia entre os grupos experimentais através do teste ANOVA dois critérios. Os resultados foram influenciados tanto pelo exercício quanto pelo tamanho da ninhada, havendo interações entre as variáveis.

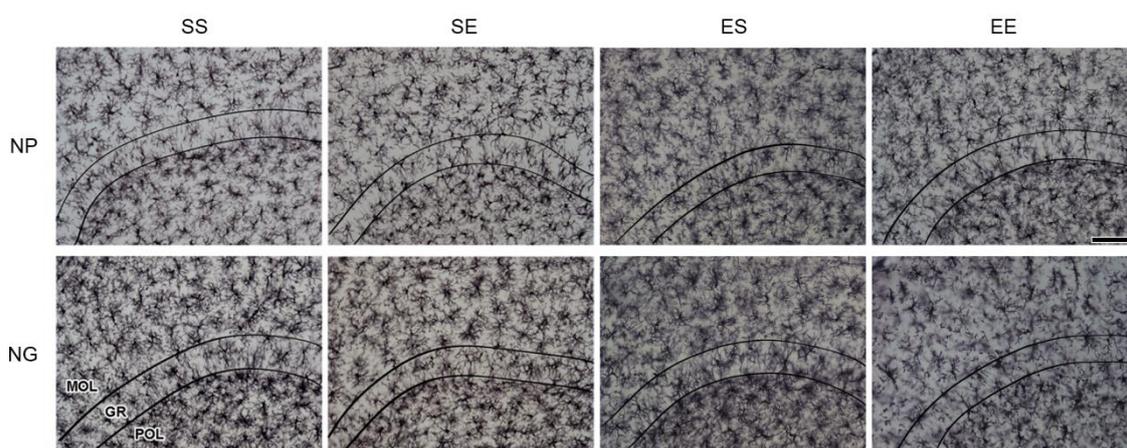


Figura 24. Fotomicrografias de secções representativas das médias da quantidade de micróglia do giro denteado dos grupos experimentais jovens, imunomarcadas para IBA-1. As linhas nas figuras indicam os limites da camada granular localizada entre as camadas molecular e polimórfica do giro denteado. NG: ninhada grande; NP: ninhada pequena. Escala: 100µm.

Em todas as camadas do giro denteado, o teste ANOVA dois critérios demonstrou que o exercício físico influenciou significativamente o número de micróglia, de forma diferente de acordo com a janela temporal na qual o animal foi submetido ao treino. Para as 3 camadas observadas, não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de micróglia entre os animais pertencentes aos subgrupos exercitados logo após o desmame (ES x EE), ou entre os animais que permaneceram em condição sedentária nessa fase (SS x SE), independente do tamanho da ninhada.

Entretanto, fazendo-se as comparações entre os subgrupos que permaneceram sedentários após o desmame (SS e SE) e os subgrupos que foram submetidos a exercício físico nessa fase (ES e EE), podemos observar diferenças significativas na quantidade de micróglia para as três camadas estudadas. Essas diferenças foram observadas somente entre os animais criados em ninhadas grandes (Figura 25). Assim, os animais provenientes de ninhadas grandes que permaneceram sedentários logo após o

desmame (SS e SE) apresentaram um número maior de micróglias no giro dentado quando comparados aos animais exercitados nessa fase (ES e EE).

Ainda, somente entre os animais que permaneceram sedentários após o desmame (SS e SE) foram observadas diferenças significativas no número de micróglias quando comparados os animais provenientes de ninhadas de tamanhos diferentes. Nesses grupos, foi detectado um aumento no número de micróglias nos animais adultos provenientes de ninhadas grandes comparados aos de ninhadas pequenas, em todas as camadas. Nos animais que foram submetidos ao exercício físico logo após o desmame (ES e EE), não foram observadas diferenças no número de micróglias entre os grupos provenientes de ninhadas de tamanhos diferentes na fase adulta.

O exercício físico contribuiu significativamente para os resultados observados nas camadas molecular e granular (molecular:  $F= 5.39$ ,  $p= 0.0047$ ; granular:  $F= 4.81$ ,  $p= 0.0080$ ), e o tamanho da ninhada afetou significativamente os resultados em todas as camadas (molecular:  $F= 20.85$ ,  $p< 0.0001$ ; granular:  $F= 6.78$ ,  $p= 0.0146$ ; polimórfica:  $F= 13.07$ ,  $p= 0.0012$ ). Houve ainda interação entre as variáveis, observada para todas as camadas estudadas (molecular:  $F= 5.14$ ,  $p= 0.0059$ ; granular:  $F= 5.36$ ,  $p= 0.0048$ ; polimórfica:  $F= 9.61$ ,  $p= 0.0002$ ).

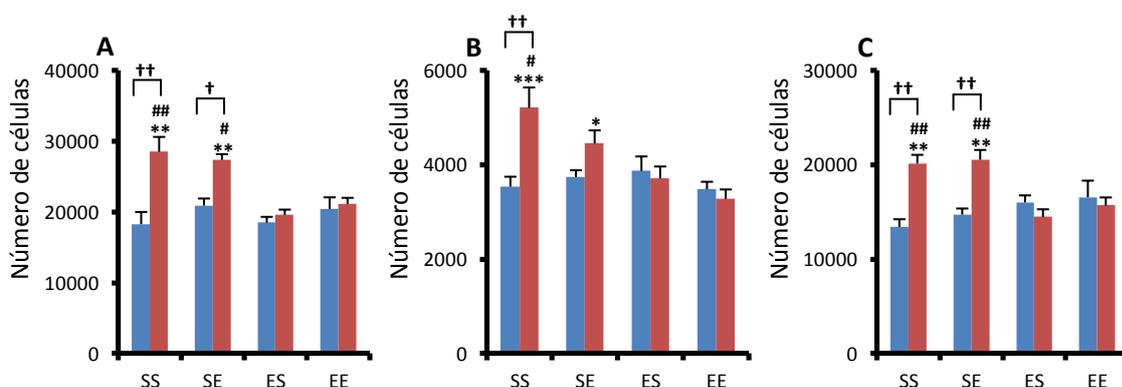


Figura 25. Representações gráficas das médias do número de células microgлияis. Camadas molecular (A), granular (B) e polimórfica (C) do giro dentado, para cada subgrupo experimental constituído por animais jovens submetidos a diferentes condições de exercício, provenientes de ninhadas pequenas (■) e grandes (■). ANOVA, dois critérios, †  $p<0.01$ , ††  $p<0.001$ . \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  indicam diferenças entre o grupo assinalado e o grupo EE; #  $p<0.01$ , ##  $p<0.001$  indicam diferenças entre o grupo assinalado e o grupo ES.

#### 4.5.2- Distribuição laminar das células microgliais no giro denteado.

A figura 26 ilustra a influência do tamanho da ninhada e do exercício sobre a distribuição laminar das micróglias no giro denteado de animais adultos exercitados e sedentários em diferentes janelas temporais. A distribuição das células microgliais para cada camada do giro denteado dos grupos experimentais foi calculada sob a forma de porcentagem, e as diferenças entre os grupos foram comparadas a fim de observar os efeitos das variáveis experimentais sobre a distribuição da micróglia entre as camadas molecular, granular e polimórfica. O exercício físico alterou significativamente a distribuição das células microgliais nas camadas granular e polimórfica (camada granular  $F=3.93$   $p=0.0185$ ; camada polimórfica  $F=3.28$ ,  $p=0.0354$ ), enquanto o tamanho da ninhada contribuiu para os resultados observados na camada molecular ( $F= 5.46$ ,  $p= 0.0268$ ), havendo interação entre as variáveis na camada polimórfica ( $F= 3.19$ ,  $p=0.0388$ ).

Nos animais adultos jovens, o exercício físico parece influenciar principalmente a porcentagem de células microgliais na camada polimórfica nos grupos provenientes de ninhadas pequenas, onde os animais treinados logo após o desmame (ES, EE) apresentam maior porcentagem de micróglias nessa camada em relação aos animais que permaneceram sedentários logo após o desmame (SS, SE).

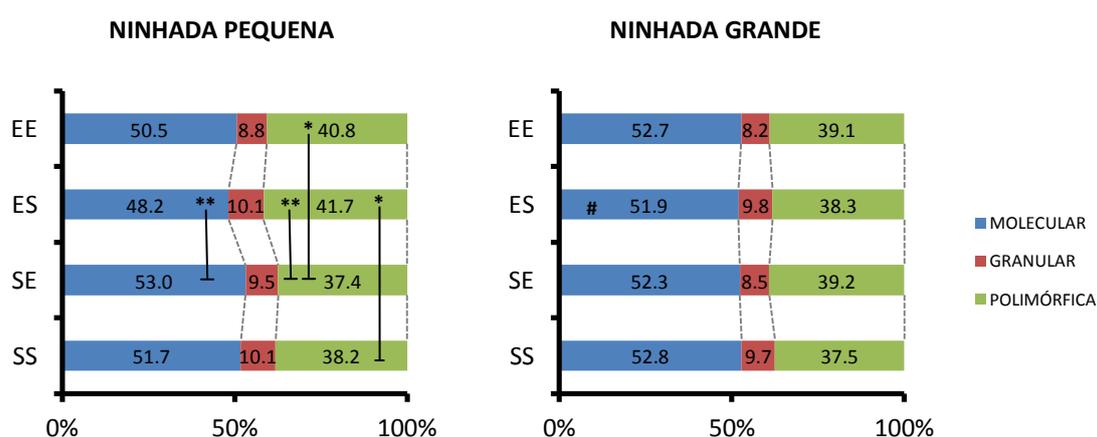


Figura 26. Gráficos mostrando a distribuição laminar das células microgliais. Camadas polimórfica, granular e molecular do giro denteado dos animais experimentais jovens provenientes de ninhadas pequenas (esquerda) e grandes (direita). Os valores estão expressos em porcentagens em relação ao número total de células microgliais estimadas na estrutura. ANOVA, dois critérios, \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ . #  $p<0.05$  indica a diferença entre subgrupos provenientes de ninhadas de tamanho diferentes, com mesma condição de exercício.

### III - ALTERAÇÕES GLIAIS, DE MATRIZ EXTRACELULAR E NOS PARÂMETROS DIFUSIONAIS DO ESPAÇO EXTRACELULAR NO HIPOCAMPO DE RATOS ADULTOS.

*Univerzita Karlova v Praze, Charles University in Prague, Institute of Experimental Medicine, Neuroscience Department*

#### 1. Introdução

##### *1.1- Astrócitos: conceitos, funções e alterações morfofisiológicas induzidas por variáveis ambientais.*

Os astrócitos constituem o tipo celular mais abundante no encéfalo. Estão ubiquamente distribuídos e são conhecidos por facilitar as interações celulares por sua associação a neurônios, vasos sanguíneos e outros tipos gliais. Os astrócitos são células multifuncionais, que participam da regulação da neurotransmissão, estabelecem junções comunicantes entre si, regulam o metabolismo neural através de diversos mecanismos, controlam o fluxo sanguíneo no encéfalo, produzem lactato, regulam o balanço iônico e a concentração de substâncias neuroativas no espaço extracelular, participam da formação da barreira hematoencefálica, participam dos mecanismos de estabelecimento e reforço sináptico e apresentam, assim como a micróglia, funções imunes (Hertz et al, 1996; Rouach e Giaume, 2001; Piet et al, 2004; Wang e Bordey, 2008; Allen e Barres, 2009; Bilbo, 2010; Middeldorp e Hol, 2011).

Os astrócitos são essenciais ao funcionamento geral das redes neurais, sendo elementos indispensáveis para a neurotransmissão. Realizam a remoção de glutamato da fenda sináptica e a reciclagem do neurotransmissor, através da conversão do mesmo em glutamina pela enzima glutamina sintetase, expressa unicamente pelos astrócitos no encéfalo (Broer e Brookes, 2001; Nadler, 2012). Os astrócitos também respondem ativamente à liberação de neurotransmissores, pois possuem um repertório de receptores

que inclui receptores para glutamato, adenosina, ATP, GABA, histamina, norepinefrina e acetilcolina (Porter e McCarthy, 1997). Quando da ativação de seus receptores, os astrócitos respondem com alterações do  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, que desencadeia a liberação de substâncias que parecem regular a atividade neural e o reforço sináptico (Araque et al, 1999). Essa responsividade à neurotransmissão, juntamente com outros fatores como a gliotransmissão, deram origem ao termo “sinapse tripartite”, que reflete a função dos astrócitos na manutenção da plasticidade sináptica (Halassa et al, 2007; Nadkarni e Jung, 2007; Eroglu e Barres, 2010).

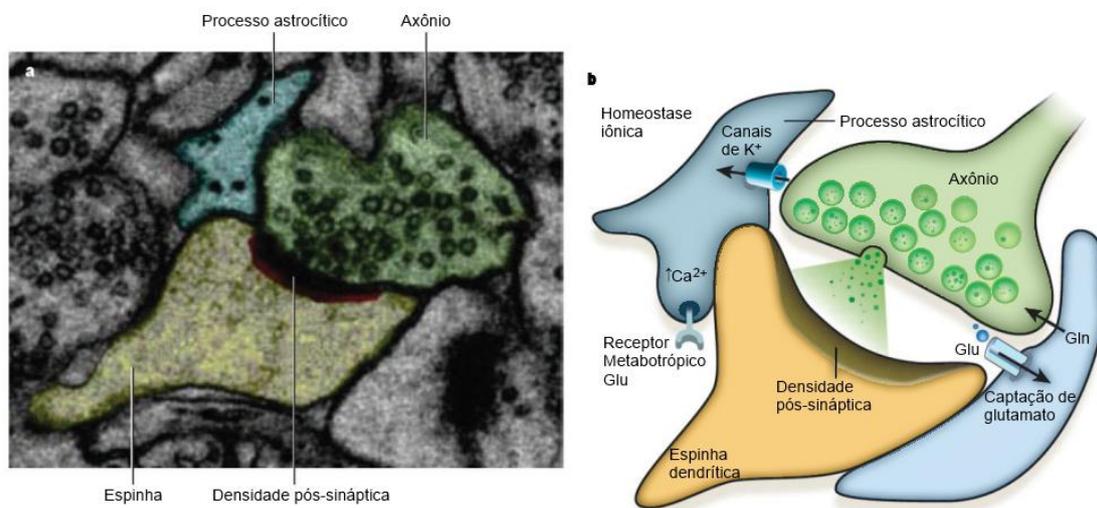


Figura 27. O modelo da sinapse tripartite. A) Fotomicrografia eletrônica de uma sinapse, onde estão indicados os neurônios pré- e pós-sinápticos e um astrócito adjacente. B) Diagrama esquemático da sinapse tripartite. Adaptado de (Eroglu e Barres, 2010).

Além da comunicação neuroquímica, os astrócitos também participam de mecanismos similares aos da micróglia na sinaptogênese (Christopherson et al, 2005) e na eliminação de sinapses (Stevens, 2008). Possuem ainda um vasto acoplamento elétrico com outros astrócitos e células gliais via junções gap, formando redes dinâmicas de passagem de moléculas entre essas células, que incluem interações com a vasculatura na barreira hematoencefálica, com transporte de metabólitos para os neurônios (Weber et al, 2004; Orthmann-Murphy et al, 2007), e outras funções ainda não bem elucidadas, como nos processos de mielinização e remielinização (Li et al, 2014).

Os astrócitos foram primeiramente reconhecidos e diferenciados por sua expressão característica de GFAP (Middeldorp e Hol, 2011), apesar do aparecimento de evidências apontando para a existência de subpopulações de astrócitos GFAP-negativos (Walz e Lang, 1998). Recentemente, estudos demonstraram que os astrócitos apresentam morfologia mais complexa que o anteriormente descrito (Freeman, 2010). A maior parte dos estudos envolvendo alterações astrocitárias utilizam a marcação por GFAP, entretanto este marcador revela somente os processos celulares primários, logo deve-se levar em consideração que as quantificações morfométricas, especialmente de volume de células utilizando este marcador constituem análises parciais e referem-se ao corpo celular e aos processos primários (Bushong et al, 2002; Halassa et al, 2007; Freeman, 2010).

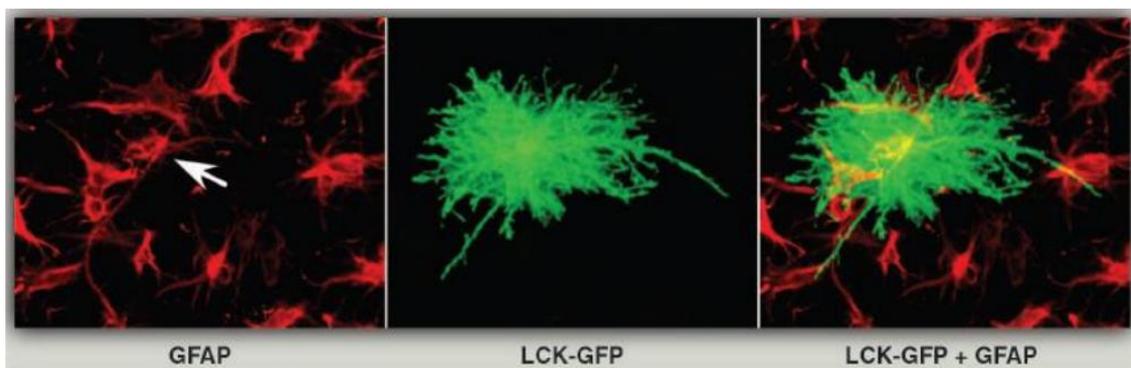


Figura 28. Complexidade morfológica do astrócito revelada por dois tipos de marcação distintos. Observe a transposição (direita) de um astrócito imunomarcado para GFAP (esquerda), e um astrócito transfectado com o marcador de membrana Lck-GFP (*Green fluorescent protein*) (centro). As extensivas ramificações identificadas pelo marcador de membrana não são marcadas pela coloração com o GFAP. Fonte: (Freeman, 2010).

Os astrócitos participam ativamente da sinaptogênese no período de desenvolvimento, auxiliando no estabelecimento e na modulação das conexões sinápticas da circuitaria neural. (Pfrieger e Barres, 1997; Haydon, 2001; Ullian et al, 2001; Angulo et al, 2004; Dityatev e Rusakov, 2011). Apresentam capacidade proliferativa permanente ao longo da vida, sugerindo que a regulação do ciclo celular nessas células é importante em fases que vão além do desenvolvimento inicial (Ge et al, 2012). A zona subgranular do giro denteado contém astrócitos radiais que possuem a capacidade de gerar neuroblastos, precursores de células granulares (Namba et al, 2005; Gonzalez-Perez et al, 2011). Especialmente no hipocampo, os astrócitos desempenham

um papel crítico nos mecanismos de consolidação da memória e plasticidade sináptica (Ng et al, 1992; Ben Menachem-Zidon et al, 2011; Tewari e Majumdar, 2012), com evidências recentes de sua participação em mecanismos pré-sinápticos na indução e modulação da LTP hipocampal independentemente da ativação do receptor NMDA, e envolvendo mensageiros retrógrados como o óxido nítrico (Tewari e Majumdar, 2012).

Alterações ambientais, como o cuidado materno e o exercício físico podem influenciar a morfologia e o padrão de proliferação dos astrócitos (Li et al, 2005; Lanosa et al, 2011; Williamson et al, 2012; Beauquis et al, 2013; Bernardi et al, 2013; Saur et al, 2013), e existem evidências que os astrócitos hipocampais apresentam maior vulnerabilidade à apoptose por hipóxia e hipoglicemia quando comparados aos astrócitos corticais (Zhao e Flavin, 2000).

Assim como as células microgliais, os astrócitos possuem receptores para glicocorticóides, portanto representam alvos para sua ação no encéfalo, participando da coordenação da atividade da população neural do sistema neuroendócrino nas respostas ao estresse através da modulação da ativação dos neurônios magnocelulares do eixo hipotálamo-hipófise (Tasker et al, 2011). Sob condições de estresse, o aumento dos níveis de glicocorticóides modifica a capacidade de proliferação e as taxas de apoptose dessas células (Gonzalez-Perez et al, 2011). A perda glial astrocítica no hipocampo tem sido sugerida como um fator na patogênese das desordens encefálicas relacionadas ao estresse (Musholt et al, 2009; Gonzalez-Perez et al, 2011).

Unemura e colaboradores investigaram os efeitos da liberação excessiva de glicocorticóides pela administração de ACTH em ratos e verificaram uma redução no número de astrócitos e na expressão de receptores glicocorticóides no córtex frontal e no hipocampo (Unemura et al, 2012). Estudos empregando protocolos de separação materna dos filhotes observaram resultados similares, com redução da quantidade de astrócitos corticais (Musholt et al, 2009). Outros autores, entretanto, demonstraram que as perturbações funcionais da rede astrocítica induzidas pelo estresse devem-se à atrofia e não à morte celular dos astrócitos (Tynan et al, 2013; Walker et al, 2013). Yu e colaboradores (Yu et al, 2011) encontraram evidências que astrócitos hipocampais expostos a glicocorticóides apresentam inibição do crescimento e ativação moderada da caspase 3, porém sem indução de apoptose. Os glicocorticóides influenciam o destino celular hipocampal pela indução da expressão de fatores de crescimento derivados dos

astrócitos (Yu et al, 2011). Esses dados são relevantes para o entendimento de como os glicocorticóides podem influenciar a citoarquitetura do hipocampo, especialmente durante o desenvolvimento, o que reforça o conceito de que a presença e os cuidados da mãe parecem ser essenciais para a sobrevivência neuronal e glial (Zhang et al, 2002).

O exercício físico exerce influências positivas sobre as funções dos astrócitos. O treinamento em esteira induz um aumento da proliferação astrocítica, que persiste de forma crescente por cerca de 6 semanas após o término dos períodos de treinamento (Li et al, 2005). A astrocitose após o exercício, associada à angiogênese já previamente relatada (Swain et al, 2003), pode promover o reforço da unidade neurovascular composta pelo endotélio microvascular, astróglia, neurônios e matriz extracelular. O reforço dessa unidade pelo exercício pode otimizar as funções da barreira hematoencefálica, especialmente após injúria (Li et al, 2005). Dados recentes demonstraram importantes alterações na quantidade e morfologia dos astrócitos induzidas pelo exercício físico (Saur et al, 2014), com correlações positivas sobre testes de memória espacial (Diniz et al, 2010; de Senna et al, 2011).

Durante o envelhecimento, ocorrem concomitantemente em diversas áreas encefálicas a perda de células neurais, elementos da matriz extracelular e gliose (Hilbig et al, 2002). Os astrócitos GFAP positivos são responsáveis pela gliose crônica relacionada ao envelhecimento, que caracteriza-se por um aumento da proliferação acompanhada por alterações morfológicas nos astrócitos (Murphy, 1993; Unger, 1998; Conde e Streit, 2006) que apresentam hipertrofia nuclear e dos processos citoplasmáticos, assim como aumento da expressão de GFAP (Son et al, 2009; Wharton et al, 2009). Essas alterações parecem contribuir para os déficits funcionais associados ao envelhecimento. Os astrócitos e a micróglia são as células imunocompetentes do sistema nervoso e podem participar da remoção (*clearance*) de fragmentos celulares resultantes da apoptose na neuroinflamação e no envelhecimento. Ambos podem apresentar tanto mecanismos de controle do processo inflamatório e no envelhecimento, como podem espalhar o dano e contribuir para a morte celular generalizada em condições patológicas (Cerbai et al, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado uma relação inversa entre astrocitose e performance cognitiva durante o envelhecimento, assim como um aumento na expressão de GFAP em diversas áreas corticais e subcorticais de indivíduos

apresentando demência (Kashon et al, 2004; Wharton et al, 2009; Middeldorp e Hol, 2011). Uma das alterações mais relevantes que os astrócitos sofrem durante o desencadeamento da astrocitose é a redução da expressão do fator neurotrófico GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*), resultando na atrofia neuronal relacionada aos déficits cognitivos da idade avançada. Estudos empregando modelos transgênicos de reposição para o GDNF apresentaram resultados positivos com relação às alterações cognitivas do envelhecimento em ratos (Pertusa et al, 2008).

De um modo geral, as alterações astrocitárias relacionadas ao envelhecimento reduzem sua capacidade neuroprotetora, determinando a susceptibilidade neuronal a danos como os desencadeados pelos fatores oxidativos, favorecendo a instalação dos déficits no substrato neural, o que resulta nas perdas funcionais e instalação de processos neurodegenerativos (Nomura et al, 1996; Wu et al, 2005; Garcia-Matas et al, 2008).

Alterações morfológicas dos astrócitos ou em sua taxa de proliferação em qualquer fase da vida resultam em alterações na arquitetura do espaço extracelular, levando a interferências no padrão de difusão de substâncias neuroativas nesse compartimento (Sykova et al, 1999; Piet et al, 2004), o que pode afetar os padrões de funcionamento da circuitaria neural. A importância de tais alterações será discutida em mais detalhes nas seções seguintes.

### ***1.2- As células NG2- positivas: antigos conceitos, novas funções e futuras perspectivas.***

As células gliais NG2 positivas, também conhecidas como polidendrócitos, recebem este nome por expressarem em sua superfície o proteoglicano NG2, que foi primeiramente caracterizado como um proteoglicano de membrana tipo 1 de alto peso molecular (Nishiyama et al, 1991; Levine e Nishiyama, 1996). No encéfalo de camundongos, a expressão de NG2 é observada já no 13º dia de vida embrionária, e seu pico ocorre entre o 8º e o 12º dias de vida pós-natal (Niehaus et al, 1999).

As células gliais NG2 positivas são descritas classicamente como precursoras de oligodendrócitos, entretanto sua expressão e funções não está limitada à diferenciação em oligodendrócitos durante o desenvolvimento. Uma população de células gliais NG2 positivas permanece presente no encéfalo adulto, e suas funções nessa fase ainda não estão totalmente esclarecidas (Greenwood e Butt, 2003).

Essas células exibem uma morfologia estrelada característica, com núcleo oblongo e processos multipolares (Horner et al, 2002). Seu papel no funcionamento do encéfalo adulto e a significância de suas alterações em estados patológicos ou fisiológicos ainda não são conhecidos. Nos últimos anos essas células despertaram bastante atenção por conta de evidências indicando que ela mantém sua natureza precursora no encéfalo adulto, retendo a capacidade de divisão e diferenciação para além das fases de desenvolvimento iniciais (Levine e Nishiyama, 1996; Levison et al, 1999; Karram et al, 2005). Estudos recentes demonstram que as células gliais NG2 podem reverter a um estado multipotente, podendo dar origem a outras células gliais em situações adversas, sendo agentes-chave nos mecanismos de plasticidade regenerativa no encéfalo (Tripathi et al, 2010; Richardson et al, 2011; Robins et al, 2013).

As células gliais NG2 podem ser consideradas precursoras gliais, podendo diferenciar-se em oligodendrócitos e astrócitos no encéfalo de animais em desenvolvimento e em adultos (Levison e Goldman, 1993; Levison et al, 1999). Em meios de cultura, células NG2 isoladas do encéfalo de camundongos expostas a soro fetal diferenciam-se em astrócitos, e na ausência do soro diferenciam-se em oligodendrócitos (Diers-Fenger et al, 2001). O fato de que nesses estudos não foram observadas diferenciações para tipos neuronais não exclui a possibilidade de que essas células possam gerar novos neurônios. De fato, outros grupos têm encontrado evidências de que as subpopulações de células NG2 podem diferenciar-se em neurônios *in vivo* (Guo et al, 2013; Robins et al, 2013).

Assim como os astrócitos, essas células expressam canais e receptores para neurotransmissores e substâncias neuroativas, e estabelecem contato íntimo com neurônios e astrócitos, estando envolvidas em diversos mecanismos relacionados à neuroproteção e plasticidade sináptica (Nishiyama et al, 2005; Wigley et al, 2007; Nishiyama et al, 2009). De fato, existem evidências que demonstram que essas células podem estabelecer contatos sinápticos diretos com neurônios (Sakry et al, 2011).

Outro fato intrigante é que a glia NG2 pode responder à estimulação por neurotransmissores, gerando padrões de excitação elétrica comparáveis em alguns aspectos com os neurônios. A aplicação do agonista glutamatérgico kainato na glia NG2 evoca uma resposta complexa consistindo de um rápido e duradouro bloqueio da condutância de repouso ao K<sup>+</sup>, e uma corrente catiônica acompanhada de um aumento transitório do efluxo de K<sup>+</sup>, o que sugere uma responsividade das células NG2 à excitação por neurotransmissores (Otis e Sofroniew, 2008). Karadottir e colaboradores demonstraram que as células NG2 podem gerar potenciais de ação por inputs sinápticos excitatórios neurais (Karadottir et al, 2008). Ainda, que a estimulação neural no hipocampo adulto e em desenvolvimento leva a indução de sinais mediados por Ca<sup>++</sup> na glia NG2, sugerindo que essas células podem agir na modulação da atividade sináptica, tendo sido tais células comumente encontradas em contato direto com sinapses (Bergles et al, 2000). A função fisiológica da excitabilidade dessas células ainda não está clara, mas existem sugestões de que pode influenciar na sua transição em oligodendrócitos (Karadottir et al, 2008).

As células NG2 positivas no encéfalo adulto apresentam grande potencial de reatividade aos danos teciduais (Nishiyama et al, 2002; Nishiyama, 2007). Recentemente Gao e colaboradores (Gao et al, 2010) demonstraram que o sulfato de condroitina - NG2 está envolvida na resposta inflamatória da micróglia ativada através da mediação da indução da iNOS e expressão de citocinas inflamatórias, tendo sido detectada em células microgliais ativadas por injeção de lipopolissacarídeo (LPS). Neste mesmo estudo foi observada a inibição de tal expressão pela dexametasona (Gao et al, 2010).

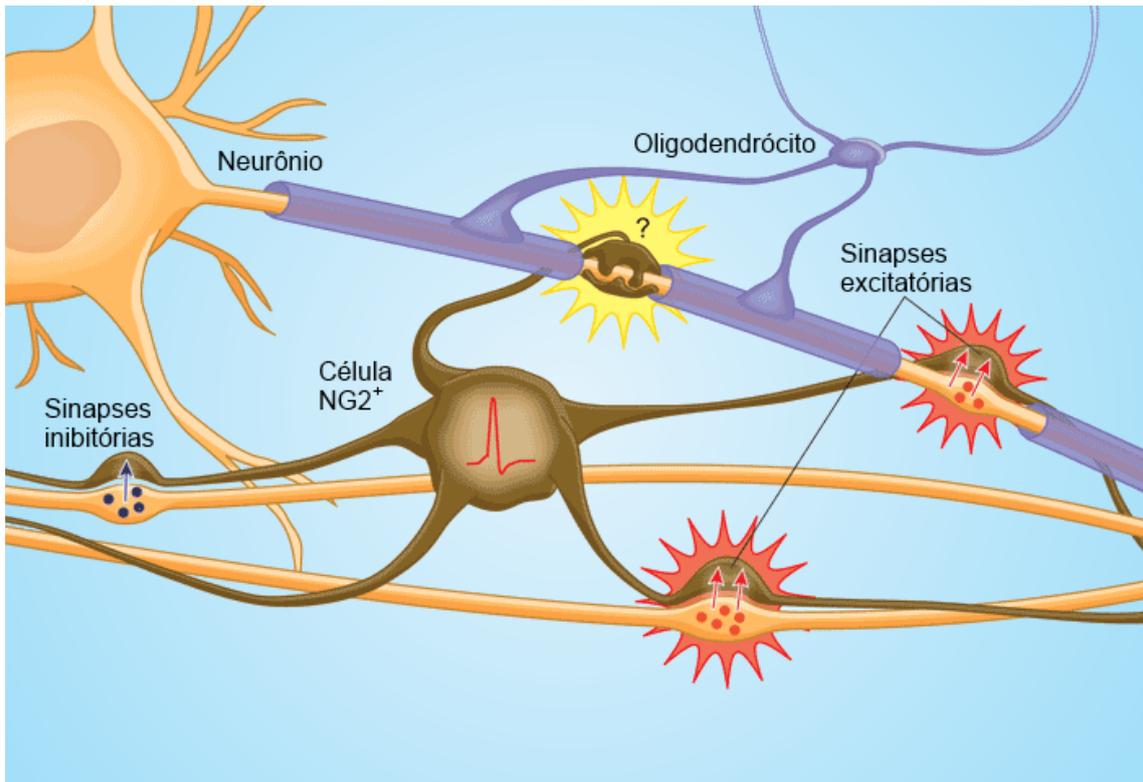


Figura 29. Diagrama esquemático das prováveis funções das células NG2 no encéfalo. Essas células podem gerar potenciais de ação induzidas por inputs sinápticos excitatórios. Elas ainda apresentam processos que envolvem nodos de Ranvier, de função ainda desconhecida. Adaptado de (Otis e Sofroniew, 2008).

Da mesma maneira que ocorre em outros tipos celulares, fatores ambientais como o exercício físico e o ambiente enriquecido podem influenciar o padrão de proliferação e diferenciação das células gliais NG-2 positivas (Ehninger et al, 2011; Simon et al, 2011; Klaisle et al, 2012). Ehninger e colaboradores demonstraram que o ambiente enriquecido associado à atividade física, além de reduzir a proliferação microglial, influenciaram o destino das células NG2 na amígdala de ratos, com redução do número de células NG2 expressando S100 $\beta$  (Ehninger et al, 2011). Entretanto, pouco é conhecido atualmente acerca da influência do cuidado materno sobre as células gliais NG-2 positivas no adulto.

### ***1.3- Alterações na matriz extracelular, influências ambientais e consequências funcionais: o papel da reelina.***

Nas primeiras fases de vida, a migração neuronal é um passo essencial para o desenvolvimento encefálico, controlada por uma variedade de proteínas e moléculas da matriz extracelular. Células da glia radial guiam o crescimento axonal e a migração neuronal, estando a reelina diretamente envolvida neste último processo. A reelina é uma glicoproteína da matriz extracelular secretada por neurônios, responsável pelo controle das interações célula-célula (Lakatosova e Ostatnikova, 2012).

O estabelecimento da citoarquitetura do encéfalo depende de diversos mecanismos de sinalização extrínsecos e intrínsecos, que incluem as semaforinas e a reelina, cujos fragmentos difundem-se afetando projeções imaturas através da ativação de receptores VLDLR e ApoER2 (Drakew et al, 1998; Perez-Garcia et al, 2004). Nos últimos anos a cascata de sinalização da reelina vem sendo intensamente estudada, entretanto ainda não foi completamente esclarecida em todas as suas funções, e diferentes receptores identificados para a reelina sugerem múltiplas funções para a mesma (Jossin et al, 2003; Cheng et al, 2010; Doehner e Knuesel, 2010; Forster et al, 2010; Honda et al, 2011).

As células-alvo para a reelina geralmente expressam a proteína adaptadora citoplasmática Dab1, que liga-se aos receptores de reelina VLDLR e ApoER2. No citosol das células-alvo migratórias a reelina desencadeia uma cascata de sinais transduzida pelos dois receptores, porém a via completa de sinalização permanece desconhecida em seus detalhes, sabendo-se atualmente que afeta componentes citoesqueléticos nas células facilitando a migração (Jossin et al, 2003; Cheng et al, 2010).

A reelina foi inicialmente descrita em camundongos mutantes, que receberam a denominação *reeler* (cambaleante) por causa do padrão de marcha característico apresentado pelos mesmos, devido à hipoplasia cerebelar observada como consequência da mutação do gene codificador da reelina. Nesses animais as folhas cerebelares são ausentes, tendo sido essa a primeira evidência acerca da importância da reelina na

organização estrutural do encéfalo durante o desenvolvimento (Franco e Muller, 2011; Honda et al, 2011; Sekine et al, 2012; Oostland e van Hooft, 2013).

A inibição da reelina leva ao desenvolvimento anormal das conexões neurais específicas das camadas corticais e hipocampais durante o desenvolvimento. Experimentos com camundongos *knockout* para reelina levaram à observação de um fato digno de nota (Figura 30): quando cultivadas junto a secções hipocampais provenientes dos animais normais, as secções dos camundongos mutantes respondem à sinalização pela reelina que é expressa nas secções normais, exibindo um padrão de orientação que não é observado na ausência de qualquer fonte da proteína (Forster et al, 2006).

Apesar de suas importantes funções durante o desenvolvimento, a reelina continua sendo expressada no encéfalo adulto (Doehner e Knuesel, 2010; Forster et al, 2010). Células neurais reelina positivas foram observadas no hipocampo e córtex entorrinal de ratos adultos, e a observação dos tipos celulares apontam para o fato que a reelina na formação hipocampal é expressada em diferentes tipos neuronais durante o desenvolvimento e no adulto (Drakew et al, 1998). Uma das principais questões não resolvidas nesses aspectos consiste em estabelecer quais as funções da reelina, *Dab1* e seus efetores na função encefálica após o desenvolvimento. Sabe-se que no hipocampo a via de sinalização da reelina promove o desenvolvimento de espinhas dendríticas (Niu et al, 2008), e a sinalização envolvendo a ativação do receptor ApoER2 com consequente fosforilação de receptores NMDA, induz a expressão da LTP no hipocampo (D'Arcangelo, 2005). Recentemente foram encontradas evidências de que a indução da LTP hipocampal por estimulação de alta frequência leva a alterações na metilação e acetilação das histonas dos genes codificadores da reelina e BDNF (Sui et al, 2012). Tais achados podem auxiliar na compreensão da origem dos distúrbios psiquiátricos e cognitivos associados à deficiência de reelina.

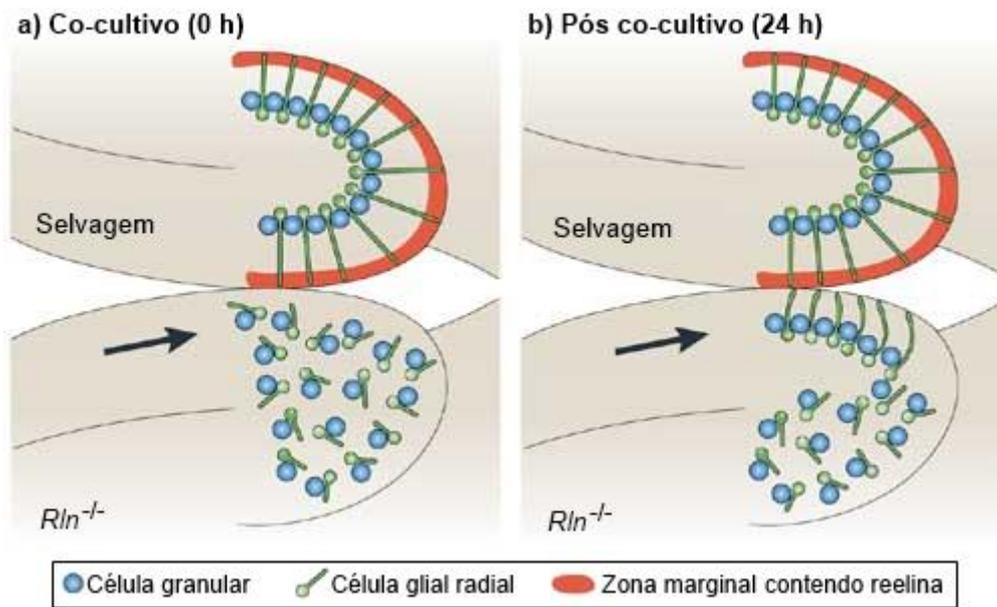


Figura 30. Recuperação da laminação das células granulares no giro denteado dos camundongos *reeler*. “A) Uma seção hipocampal do animal selvagem, colocada junto à seção hipocampal de um camundongo mutante (*reeler*) para reelina (*Rln*<sup>-/-</sup>), fornece uma zona marginal contendo reelina à seção mutante. Note a organização diferente do giro denteado nas duas seções. Na seção selvagem, as células granulares formam uma densa camada de células empacotadas. Os processos das células gliais radiais atravessam a camada granular e projetam-se em direção à zona marginal contendo reelina. No mutante *reeler*, as células granulares estão dispersas e a orientação característica da glia radial é perdida (seta). B) Após 24h de co-cultivo, a glia radial do giro denteado *reeler* projeta-se radialmente em direção à zona marginal contendo reelina da seção mutante, e as células granulares próximas formam uma camada compacta (seta). Esses resultados apontam para uma função dual da reelina – a organização da glia radial e a migração das células granulares.”. Adaptado de (Forster et al, 2006).

A relevância funcional da expressão de reelina no encéfalo adulto parece ser mais ampla e diferenciada que aquela observada durante o desenvolvimento. No encéfalo adulto, sua função muda, de “guia de neurônios” para “guia de sinapses”, além de outras funções como a migração dos neuroblastos relacionada à neurogênese adulta, organização do citoesqueleto, desenvolvimento de dendritos e regulação das espinhas dendríticas, formação e manutenção dos circuitos neurais, modulação da plasticidade sináptica e regulação da plasticidade estrutural e na liberação de neurotransmissores (Jossin et al, 2003; Bender et al, 2010; Doehner e Knuesel, 2010; Hellwig et al, 2011; Leemhuis e Bock, 2011; Ventruti et al, 2011; Stranahan et al, 2013).

Alterações nos níveis de expressão da reelina estão envolvidas em diversas desordens neuropatológicas. Perda ou ganho de função desta ou de seus receptores tem o potencial de influenciar os padrões de conectividade neural com consequências para a memória e a cognição. Dentre os mecanismos pelos quais os eventos externos podem

influenciar dramaticamente a função do encéfalo ao longo da vida, a reelina representa um importante fator envolvido. Meyer e colaboradores (Meyer et al, 2006) demonstraram que animais em desenvolvimento embrionário cujas mães foram submetidas à infecção mostraram dramática redução na expressão de reelina e na neurogênese. Fatores pró-inflamatórios nas fases pré-natais afetam a expressão de reelina no encéfalo, com redução dramática na quantidade de células reelina-positivas no período pós-natal (Meyer et al, 2006). A injeção de LPS em ratos levou a um desarranjo permanente das células piramidais associado a um decréscimo na expressão de reelina no hipocampo, e o uso de n-acetil-cisteína preveniu tais efeitos (Rideau Batista Novais et al, 2013).

Existem evidências que alterações nos níveis de cuidado materno afetam o nível de expressão de reelina no hipocampo, que permanece alterado mesmo no adulto (Smit-Rigter et al, 2009; Blaze et al, 2013; Zhang et al, 2013). Lussier e colaboradores demonstraram utilizando animais *knockout*, que a redução da produção de reelina aumenta a vulnerabilidade aos efeitos semelhantes ao comportamento depressivo associados à injeção de corticosterona no hipocampo, tendo sido observado um aumento dose-dependente dos comportamentos depressivos, da redução da expressão de reelina e da neurogênese e maturação celular em relação aos níveis de corticosterona (Lussier et al, 2011; Lussier et al, 2013). Dados recentes demonstraram que o exercício em esteira melhora os aspectos comportamentais e a memória espacial por regulação para cima (*up-regulation*) da via de sinalização da reelina em ratos autistas (Seo et al, 2013).

#### ***1.4- Alterações gliais e de matriz extracelular no encéfalo: Parâmetros difusionais e suas relações com alterações morfológicas e funcionais.***

O espaço extracelular no encéfalo desempenha um importante papel nos mecanismos de sinalização. Uma analogia bastante utilizada para descrever o espaço extracelular consiste em imaginar a parte líquida de uma espuma, onde a parte gasosa representa o espaço ocupado pelas células. Entretanto, quando estudamos o transporte de substâncias pelo espaço extracelular é necessário considerar que essa analogia, apesar de descrever a conectividade em geral do espaço extracelular, negligencia a

complexa microestrutura contida nesse espaço (Nicholson e Sykova, 1998; Hrabitova e Nicholson, 2007; Sykova e Nicholson, 2008). O espaço extracelular é preenchido pelo líquido intersticial, juntamente com as macromoléculas de cadeia longa que formam a matriz extracelular. Muitas dessas moléculas encontram-se ligadas à superfície celular, enquanto outras, como o hialuronano, encontram-se livres neste espaço.

O espaço extracelular é preenchido por fluido intercelular contendo íons, metabólitos, neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento. Contém ainda glicosaminoglicanos (e.g. ácido hialurônico), glicoproteínas (e.g. tenascina) e proteoglicanos que constituem a matriz extracelular. Essas macromoléculas são produzidas por todos os tipos de células nervosas, e a quantidade de matriz extracelular apresenta modificações em condições variadas, e.g. durante o desenvolvimento, envelhecimento, recuperação de lesões, regeneração e diversos processos patológicos (Sykova et al, 2002; Vorisek et al, 2002; Zamecnik et al, 2004).

O espaço extracelular apresenta diversas funções que servem de suporte para a função neuronal. Permite uma sinalização elétrica estável fornecendo um reservatório de íons extracelulares suficientes para a manutenção dos potenciais de repouso e ação nos neurônios, facilita a sinalização química entre neurônios e células gliais por mecanismos de difusão, permite o transporte de substâncias essenciais entre os vasos sanguíneos e as células neurais e gliais, e está relacionado à manutenção da plasticidade sináptica no encéfalo (Sykova, 2004; Sykova e Nicholson, 2008; Sykova e Vargova, 2008; Vargova e Sykova, 2008).

A difusão de substâncias neuroativas no espaço extracelular modula a transmissão sináptica e participa de mecanismos de transmissão extrassináptica, que permite a comunicação entre sinapses adjacentes e/ou entre neurônios e células gliais (Vargova e Sykova, 2008). A transmissão extrassináptica representa um importante modelo de transmissão alternativa de sinal no sistema nervoso central e pode atuar na modulação da transmissão sináptica clássica (Buma, 1988; Sykova, 2004; Vizi et al, 2004; Sykova e Vargova, 2008).

As moléculas em difusão no espaço extracelular podem ser, por exemplo, neurotransmissores partindo de um ponto sináptico para atingir sítios adjacentes, substâncias neuromoduladoras realizando modulação extrassináptica ou fatores neurotróficos envolvidos com o crescimento, maturação e estabelecimento de redes

neurais e gliais. Após a elucidação do modelo da sinapse tetrapartite, as propriedades do espaço extracelular envolvendo elementos da matriz extracelular e seus compostos foram apresentados como o quarto elemento importante na função sináptica, mudando o foco das pesquisas em neurociências, que durante décadas permaneceram quase que exclusivamente na função, alterações e interações neuronais (Sykova e Nicholson, 2008).

A investigação acerca do comportamento de transporte de diferentes moléculas no encéfalo é importante tanto para a exploração acerca da estrutura do espaço extracelular, como para esclarecer sua função e as mudanças apresentadas nas propriedades desse espaço durante o desenvolvimento encefálico, degeneração e seu papel na neuroproteção em condições adversas. Esses estudos podem trazer melhores esclarecimentos acerca da estrutura do espaço extracelular no encéfalo, bem como sobre as funções da glia e da matriz extracelular na modulação do microambiente extracelular (Sykova, 1997; Sykova, 2001; Sykova, 2004; Sykova e Vargova, 2008; Vorisek e Sykova, 2009).

No espaço extracelular, as moléculas que formam a matriz extracelular parecem exercer funções especiais. Além de funcionarem como barreiras difusionais modulando o transporte, possuem ainda funções diretamente associadas à regulação da função neural. A matriz extracelular forma as redes perineuronais (Celio et al, 1998), desempenha um papel central no desenvolvimento do sistema nervoso (Sobeih e Corfas, 2002) e está envolvida na remodelação após injúria no sistema nervoso adulto (Fitch e Silver, 1997) assim como em alguns eventos plásticos que dão suporte à formação da memória (Wright et al, 2002; Dityatev e Schachner, 2003).

A comunicação extrassináptica envolvendo neurônios e células gliais, em estados patológicos, é perturbada por alterações estruturais que resultam em edema celular e mudanças na matriz extracelular, o que afeta a difusão extracelular. Durante o desenvolvimento, o envelhecimento e outras condições potencialmente lesivas ocorrem alterações significativas no volume do espaço extracelular como resultado da morte celular, astrogliose, rearranjo de processos astrocíticos e mudanças moleculares da matriz extracelular (Sykova, 2005).

Déficits de aprendizado durante o envelhecimento envolvem o prejuízo na transmissão por difusão extrassináptica. Aparentemente, a relação entre as alterações

desses parâmetros e os prejuízos cognitivos podem ser explicados por uma redução na transmissão de substâncias neuroativas pelo espaço extracelular entre neurônios no córtex e hipocampo, e o grau de desempenho cognitivo apresenta correlação com a redução do volume extracelular, aumento da astrogliose e diminuição de moléculas da matriz extracelular (Sykova et al, 2002). A perda de elementos da matriz extracelular pode ser observada quando da instalação de processos neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer (Baig et al, 2005).

Diferentes métodos têm sido utilizados para medir as alterações difusionais no encéfalo. Entre eles, podemos citar técnicas de imageamento por ressonância magnética, uso de radiotraçadores, medidas de transmitância e de resistência (Hrabitova e Nicholson, 2007; Sykova e Nicholson, 2008; Vorisek e Sykova, 2009). Entretanto, todos os métodos anteriormente descritos geralmente limitam-se à medida de apenas um dos parâmetros relacionados às alterações difusionais, para revisão ver (Sykova e Nicholson, 2008).

Um dos métodos mais eficazes para a mensuração dos parâmetros difusionais no espaço extracelular é a iontoforese de tetrametilamônio em tempo real (TMA-RTI). Esse método consiste na introdução de uma substância detectável (o cátion tetrametilamônio) no espaço extracelular, seguido da medida das alterações espaciais e temporais em sua concentração. A escolha do cátion tetrametilamônio como sonda se dá pelo fato de ser uma molécula suficientemente pequena para explorar todas as regiões do espaço extracelular, e por ser uma substância que não penetra nas células nem é retida pela barreira hematoencefálica, permanecendo predominantemente no espaço extracelular. Ainda, a ausência de toxicidade e a fácil detecção permitem medidas a uma concentração suficientemente baixa para não alterar os padrões osmóticos do tecido (Nicholson et al, 1979; Nicholson e Phillips, 1981; Sykova e Nicholson, 2008).

A difusão no espaço extracelular no encéfalo pode ser quantitativamente representada pelos cálculos da fração de volume extracelular e tortuosidade. Uma equação difusional modificada representa o comportamento alterado de diversas moléculas no encéfalo, revelando alterações na geometria do espaço extracelular, perda de moléculas pela barreira hematoencefálica, captação celular, ligação a elementos da matriz ou retenção em microdomínios do espaço extracelular (Mazel et al, 1998; Nicholson e Sykova, 1998).

A fração de volume extracelular é representada pela letra grega  $\alpha$  e pode ser definida como o quociente entre o volume do espaço extracelular e o volume total do tecido ( $\alpha = \frac{V_{ecs}}{V_{tec}}$ , onde  $V_{ecs}$  – volume do espaço extracelular;  $V_{tec}$  – volume do tecido). Atualmente sabe-se que no encéfalo normal o espaço extracelular ocupa cerca de 20% do volume total (Sykova, 1997; Nicholson e Sykova, 1998).

A tortuosidade, representada pela letra grega  $\lambda$ , representa as barreiras difusionais características da geometria do espaço extracelular. Seu cálculo depende da comparação entre os coeficientes de difusão de uma dada molécula em um meio livre e no tecido ( $\lambda = \sqrt{\frac{D}{D^*}}$ , onde  $D$  – coeficiente de difusão no meio livre;  $D^*$  - coeficiente de difusão no tecido). Por exemplo, estudos com radiotraçadores demonstraram que pequenas moléculas como a inulina ou a sacarose apresentam um dado coeficiente de difusão ( $D$ ) no espaço extracelular aproximadamente três vezes menor que o coeficiente de difusão ( $D^*$ ) da mesma substância em um meio livre. Estudos empregando radiotraçadores e outras sondas demonstram que no encéfalo em condições homeostáticas, os valores de tortuosidade variam entre 1,4 e 1,7 (Nicholson et al, 1979; Nicholson e Phillips, 1981; Nicholson, 1985; Kume-Kick et al, 2002).

As barreiras difusionais representadas pelos valores de tortuosidade são representadas na figura 31 (Sykova e Nicholson, 2008), e compreendem a geometria do espaço extracelular, microdomínios extracelulares, moléculas da matriz extracelular, especialmente as moléculas livres (e.g. hialuronano), sítios de ligação para a molécula tanto nas membranas celulares quanto nas moléculas da matriz extracelular e acúmulo de cargas negativas também na matriz extracelular. Todas essas barreiras interferem no padrão de difusão de moléculas no encéfalo.

Estudos experimentais utilizando a iontoforese de tetrametilamônio em tempo real no tecido encefálico corroboram os valores de fração de volume extracelular no encéfalo normal de aproximadamente 20% e tortuosidade de aproximadamente 1,6. Esses parâmetros modificam-se durante o desenvolvimento e o envelhecimento, bem como em diversas condições experimentais. Por exemplo, durante a isquemia, os valores de  $\alpha$  caem para aproximadamente 5%, provavelmente devido ao edema celular provocado pelo quadro isquêmico global (Zoremba et al, 2008).

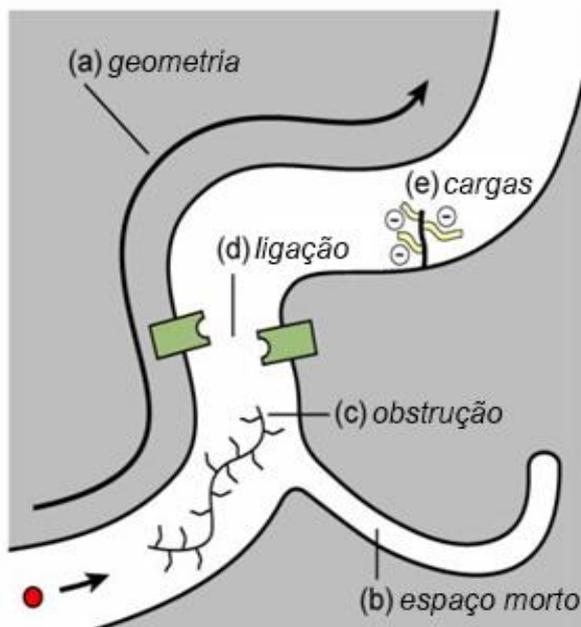


Figura 31. Fatores que afetam a difusão de uma molécula no espaço extracelular. A) geometria do espaço extracelular. B) Microdomínios onde moléculas perdem-se explorando um espaço “sem saída”, agindo como “bolsos” onde as moléculas podem sofrer captação celular. C) Obstrução por moléculas da matriz extracelular D) sítios de ligação para a molécula em difusão e) acúmulo de cargas negativas que podem afetar a difusão de moléculas eletricamente carregadas. Adaptado de (Sykova e Nicholson, 2008).

Os parâmetros difusionais no encéfalo podem ser alterados em diversas condições. Estudos empregando modelos experimentais de injúria traumática, isquemia, tumores, envelhecimento, epilepsia, alterações osmóticas, deleção de genes associados à produção de elementos da matriz extracelular, demonstraram que a morte celular e as alterações gliais observadas nessas condições contribuem para as mudanças na difusão de substâncias no encéfalo (Sykova et al, 2005; Homola et al, 2006; Kilb et al, 2006; Slais et al, 2008; Zoremba et al, 2008; Wagnerova et al, 2009; Anderova et al, 2011).

A difusão no encéfalo é anisotrópica. O termo anisotropia designa a existência de dependência em uma determinada direção. Um meio hipotético com expansão isotrópica expande-se em proporções iguais em todas as direções. No encéfalo, contudo, existem diversas evidências de um elevado grau de anisotropia especialmente relacionado à citoarquitetura de diversas regiões (Chepuri et al, 2002; Hasan et al, 2005; Ling et al, 2012) Diferentes áreas encefálicas exibem diferentes padrões difusionais, provavelmente devido às características individuais da interface neurônio-glia e da matriz extracelular nessas regiões. Os parâmetros difusionais não são estáveis, sendo alterados por variáveis fisiológicas e patológicas. As células gliais representam uma barreira física para a difusão e portanto alterações gliais consequentemente se refletirão em alterações dos padrões de difusão. Em ratas fêmeas lactantes foi demonstrado que a redução dos astrócitos facilita a difusão de substâncias neuroativas no hipotálamo,

aumentando o padrão de excitação dos neurônios por transmissão extrassináptica (Piet et al, 2004).

Os valores de  $\alpha$  e  $\lambda$  flutuam em consequência da alteração do número de células, bem como da variação da morfologia celular. A perda das barreiras difusionais, que pode ocorrer por redução de elementos da matriz extracelular, do número de sinapses ou da interface neurônio-glia podem induzir mudanças nos potenciais de ação interferindo diretamente na atividade neuronal. Assim, alterações nos padrões difusionais, dificultando ou facilitando a difusão no encéfalo para além dos padrões encontrados no encéfalo normal afetam a transmissão neuronal. As relações entre essas alterações e os eventos perinatais desfavoráveis ao desenvolvimento, bem como a sua recuperação pelo exercício físico e as correlações com as alterações gliais e de matriz extracelular relacionadas a esses fatores ainda não são conhecidas.

## 2. Objetivos

- Quantificar as alterações nos cuidados maternos induzidos pelo modelo experimental de manipulação do tamanho da ninhada;
- Analisar as alterações induzidas pelo tamanho da ninhada e pelo exercício físico sobre o número e área de superfície dos astrócitos e das células NG2 positivas no hipocampo adulto;
- Analisar as alterações induzidas pelo tamanho da ninhada e pelo exercício físico sobre a quantidade de células reelina-positivas no hipocampo adulto;
- Analisar quantitativamente as alterações nos parâmetros difusionais induzidas pelo tamanho da ninhada no hipocampo dos animais adultos;
- Observar as influências da atividade física sobre os parâmetros de difusão no espaço extracelular do hipocampo de animais adultos;
- Analisar as possíveis relações entre os parâmetros de difusão extracelular e as quantificações das alterações gliais e de matriz extracelular;
- Analisar as possíveis relações entre os achados obtidos em ambas as fases experimentais, propondo os prováveis mecanismos envolvidos em tais alterações.

### **3. Material e Métodos**

#### ***3.1- Grupos Experimentais.***

Foram Utilizados 40 ratos Wistar (*Rattus Novergicus*) machos, mantidos sob condições de cuidado materno regular ou reduzido durante o período de lactação. Fêmeas Wistar adultas nulíparas, provenientes do Institute of Physiology, AS CR, v.v.i, foram mantidas sob condições padrão de laboratório, já descritas acima, tendo acesso *ad libitum* à água e ração. Após o cruzamento, e tornando-se óbvia a prenhez (o que ocorre geralmente durante a segunda semana gestacional), as ratas grávidas foram alocadas em gaiolas individuais e transferidas para biotério do Institute of Experimental Medicine, AS CR, v.v.i, Charles University. Às proximidades da data provável de parto, as fêmeas eram observadas a cada 12 horas, a fim de determinar a data exata de nascimento da ninhada. No presente estudo utilizamos 14 ninhadas, com taxa de nascimentos entre 5 e 15 filhotes, por fêmea.

Ao 2º dia de vida pós-natal, os animais foram separados de suas mães por um breve período, e os animais de ninhadas diferentes foram misturados, sendo posteriormente separados aleatoriamente em ninhadas pequenas (6 filhotes por nutriz) ou grandes (12 filhotes por nutriz), onde permaneceram até o desmame (21º dia pós-natal). Durante o período de lactação, as ninhadas que apresentaram mortalidade de filhotes (3 ninhadas grandes, mortalidades de 1, 2 e 2 filhotes) foram excluídas da amostra.

#### ***3.2- Observação do cuidado materno.***

Para avaliar quantitativamente o cuidado materno recebido pelos indivíduos nas ninhadas pequenas e grandes, foram realizadas, do 3º ao 21º dia pós-natal, observações dos parâmetros comportamentais exibidos pelas fêmeas em cada ninhada. Foram

realizadas 6 observações diárias, 5 vezes por semana, sendo 4 observações durante a fase clara e 2 durante a fase escura do ciclo, de acordo com a figura 32.

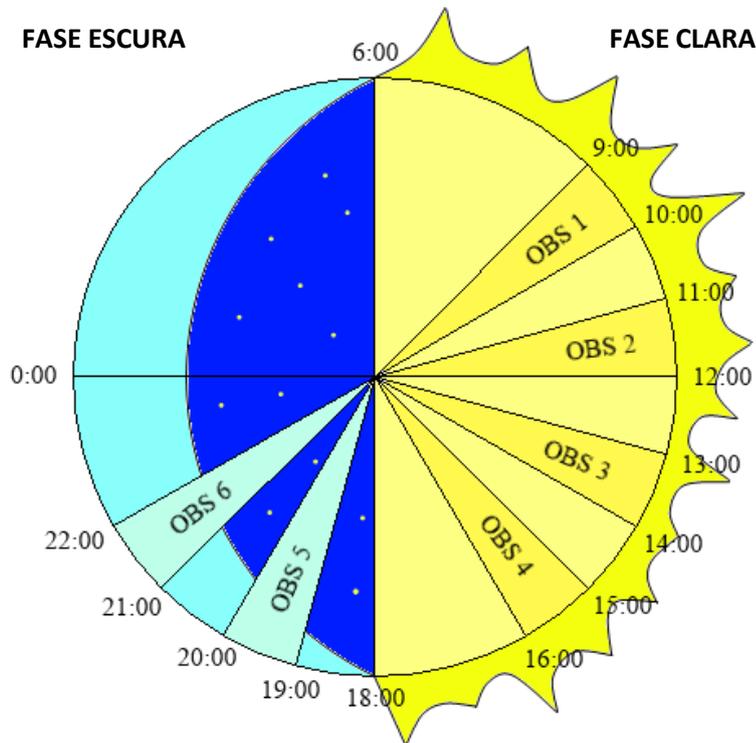


Figura 32. Períodos diários de observação do comportamento materno. Nas fases clara e escura do ciclo, as observações foram realizadas sempre nos mesmos horários, do 2º ao 21º dia pós-natal, 5 dias por semana.

O comportamento materno foi avaliado com o auxílio de planilhas de registro de cuidado materno (Figura 34), de acordo com protocolo descrito anteriormente (Caldji et al, 1998; Uriarte et al, 2007). Nesse modelo, o experimentador, pontualmente a cada 3 minutos, observa cada gaiola anotando na planilha o tipo de comportamento apresentado pela fêmea em relação à prole. As anotações foram feitas de forma codificada a fim de agilizar o procedimento, permitindo a observação de várias gaiolas num mesmo período. As gaiolas utilizadas eram de plástico transparente para facilitar a visualização por parte do observador. As siglas para os comportamentos observados estão brevemente descritas a seguir:

**Inclinação Alta (IA):** A fêmea encontra-se em posição de amamentação, com os filhotes em contato com seu ventre e com o dorso bastante arqueado;

**Inclinação Baixa (IB):** A fêmea encontra-se em posição de amamentação, com os filhotes em contato com seu ventre, porém com o dorso pouco arqueado;

**Posição Supina (SUP):** A fêmea encontra-se em decúbito lateral ou dorsal; em posição de amamentação, com os filhotes em contato com seu ventre;

**Comportamento de lambida (L):** A fêmea lambe um ou mais filhotes;

**Inclinação alta + lambida (IA/L):** A Fêmea encontra-se em posição de amamentação, com os filhotes em contato com seu ventre, com o dorso muito arqueado ao mesmo tempo em que os lambe;

**Construção do ninho (CN):** A fêmea manipula a serragem na gaiola, cavando ou empurrando de forma a arrumar o espaço para aninhar os filhotes;

**Mãe fora do ninho (MFN):** A fêmea encontra-se fora do ninho, em qualquer parte da gaiola, sem contato com os filhotes;

**Recolhida de filhotes (R):** A fêmea recolhe ou transporta qualquer filhote com a boca;

**Filhotes fora do ninho (FFN):** Um ou mais filhotes encontram-se fora do ninho;

**Mãe no ninho (MN):** A fêmea encontra-se no ninho, porém sem apresentar posição de amamentação ou qualquer dos comportamentos descritos anteriormente.

Para cada sessão de coleta de dados os animais foram observados em intervalos de 3 minutos, totalizando 21 observações por período e 126 por dia. Caso fossem percebidos dois ou mais comportamentos ocorrendo de forma simultânea no momento da observação, todos os comportamentos observados eram anotados no mesmo espaço (Figura 33). Foram anotadas ainda as vezes em que a fêmea era encontrada alimentando-se, colocando-se no campo de observações da planilha a sigla ALIM.

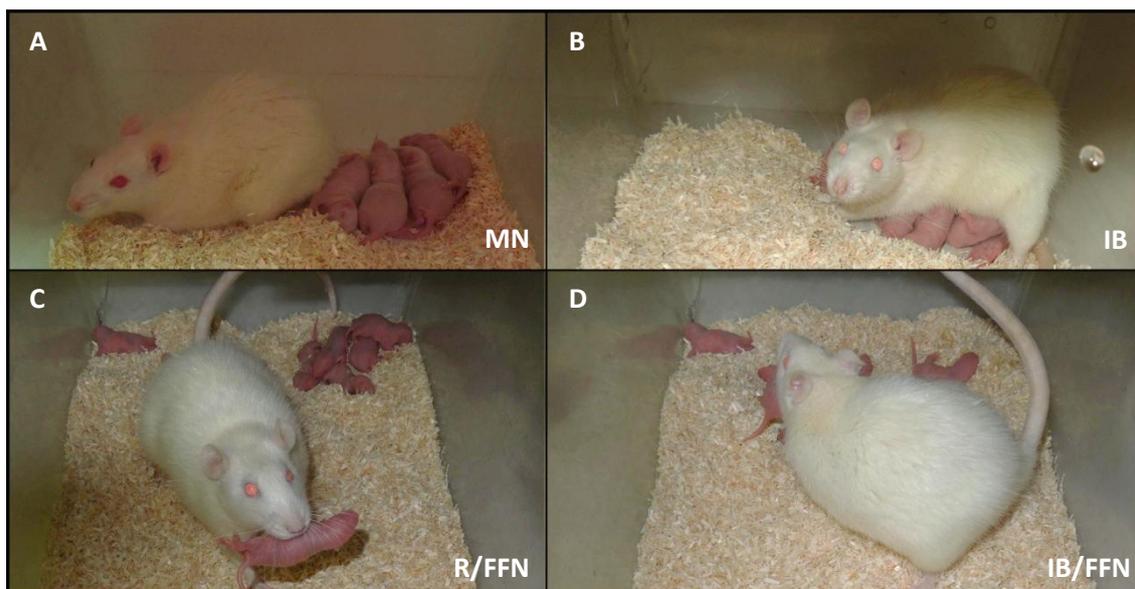


Figura 33. Comportamentos maternos observados durante a fase de amamentação. As siglas descritivas são apresentadas para cada comportamento. A) MN: mãe no ninho, sem posição de amamentação; B) IB: mãe amamentando com o dorso pouco arqueado; C) R/FFN: mãe recolhendo filhote + filhote fora do ninho; D) IB/FFN: mãe amamentando com o dorso pouco arqueado + filhote fora do ninho.

Os dados comportamentais obtidos nesse período foram analisados de acordo com o método utilizado pelo grupo de pesquisa de Michael J. Meaney. Este consiste na classificação das ratas como muito ou pouco cuidadoras tendo como base o comportamento de lambidas da rata lactante em sua prole (Meaney, 2001). Para determinar a que grupo pertence a fêmea, calcula-se a média da frequência do comportamento de lambida da população e soma-se ou subtrai-se o desvio padrão, identificando ambos os extremos. Considerando que os comportamentos de cuidado materno em *Rattus Novergicus* tendem a apresentar uma distribuição normal na população de fêmeas, sendo as muito ou pouco cuidadoras os dois extremos dessa distribuição, e a fim de garantir a diferença nos cuidados recebidos pelos animais das ninhadas grande e pequenas, ao final do 3º dia de observações foram realizados os cálculos da frequência de lambidas das fêmeas, e aquelas que foram classificadas como muito ou pouco cuidadoras foram removidas para ninhadas pequenas e grandes, respectivamente, caso já não estivessem nestas mesmas ninhadas. A cada 3 dias os mesmos cálculos foram realizados novamente a fim de confirmar a permanência de tais ocorrências e realizar novas trocas, caso necessário. Todavia, nenhuma troca de fêmea por ninhada fez-se necessária após o 3º dia de observações.

RATA: \_\_\_\_\_

IA: Inclinação Alta (amamentando c/ dorso bem arqueado) CN: Construção do Ninho

Data do Parto: \_\_\_\_\_

IB: Inclinação Baixa (amamentando c/ dorso pouco arqueado) MFN: Mãe fora do ninho

Grupo: \_\_\_\_\_

SUP: Posição Supina (amamentando de lado ou de costas) R: Recolhida de filhotes

Data: \_\_\_\_\_

L: Lambendo Filhotes FFN: Filhotes fora do ninho

Dias PP: \_\_\_\_\_

IA/L: amamentando c/ dorso bem arqueado e lambendo MN: Mãe no ninho s/ posição de amamentação

	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	60	
OBS <N1																						
OBS <N2																						
OBS <N3																						
OBS <N4																						
OBS <N5																						
OBS <N6																						
OBS <N7																						
OBS <N8																						
OBS <N9																						
OBS <N10																						

Figura 34. Planilha de registro de cuidado materno.

### 3.3- *Pesagem dos Animais e Exercício Físico.*

Após o desmame (21º dia pós-natal) os animais foram alojados em duplas em gaiolas regulares, e mantidos sob as condições padrão de laboratório já aqui descritas. Aos 120 dias de vida pós-natal, os animais foram separados em subgrupos exercitado e sedentário, compondo assim o total de 4 subgrupos experimentais: ninhada grande/exercitado (NG/E), ninhada grande/sedentário (NG/S), ninhada pequena/exercitado (NP/E) e ninhada pequena/sedentário (NP/S). O peso corporal de todos os animais foi aferido no 7º, 14º, 21º, 30º, 60º, 90º, 120º dia pós-natal, bem como ao final do período de exercícios físicos. Aos 120 dias de vida pós-natal, os animais dos subgrupos exercitados foram submetidos a sessões diárias de exercício físico em esteira, 5 vezes por semana, de acordo com os parâmetros utilizados na primeira fase deste projeto, detalhados no quadro 3. Os animais sedentários foram manuseados da mesma maneira durante o período de treinamento, e permaneceram o mesmo tempo na esteira que os animais exercitados, porém com o equipamento desligado. A figura 35 mostra um diagrama esquemático dos procedimentos experimentais nessa segunda fase.

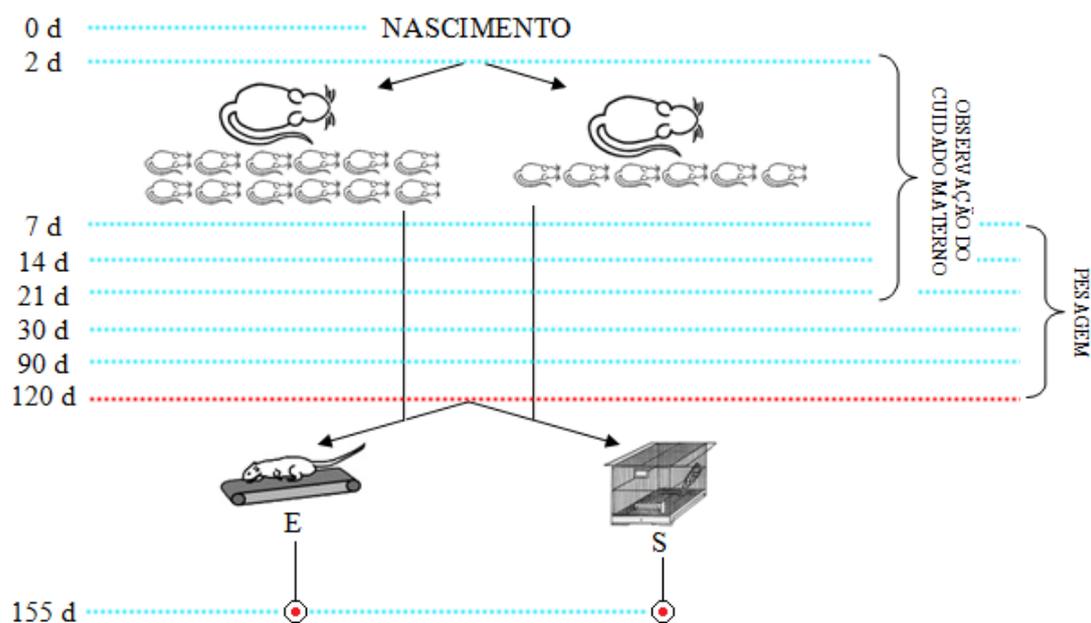


Figura 35. Esquema experimental da segunda fase. E: exercitados, S: sedentários. ⊙: perfusão, craniotomia, medidas dos parâmetros difusionais e processamento histológico.

### ***3.4- Medidas dos padrões difusionais da matriz extracelular.***

Após o término do período de exercício físico, todos os indivíduos foram anestesiados profundamente com sódio pentobarbital (Sigma-Aldrich), e submetidos a perfusão transcardíaca com fluido cérebro-espinhal artificial enriquecido com N-Metil-D-Glucamina a 4°C, contendo em mM: 110 NMDG-Cl, 3KCl, 23 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 20 glucose e (pH 7.4, 290 mOsmol/l).

Os encéfalos foram então removidos e imersos na mesma solução a 4°C, tendo os hemisférios cerebrais sido separados na linha média. O hemisfério esquerdo foi preservado em solução de paraformaldeído a 4% e reservado para os procedimentos imunohistoquímicos descritos posteriormente, e o hemisfério direito mantido em fluido cerebrospinal artificial para as medidas de parâmetros difusionais.

Do hemisfério direito foram obtidas secções a 400 µm de espessura em vibrátomo (Microm HM400). Após o corte, as secções foram mantidas por 30 minutos em banho-maria a 34°C, seguido de 30 minutos em temperatura ambiente (22 a 26°C) em fluido cérebro-espinhal artificial contendo, em mM: 117 NaCl, 3KCl, 35 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose e 0,1 TMA<sup>+</sup> (pH 7.4, 300 mOsmol/l). Durante todos os procedimentos o fluido cérebro-espinhal artificial recebeu adição constante de gás (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), num fluxo de 4mL/min.

Após o intervalo de 1h, as secções foram colocadas em uma câmara de perfusão inserida em uma gaiola de Faraday, sendo mantidos sob perfusão constante com líquido cérebro-espinhal artificial oxigenado para a realização de medidas de parâmetros de difusão no espaço extracelular no hipocampo (CA1) e giro denteado através do método de iontoforese de tetrametilamônio (TMA) em tempo real (Mazel et al, 1998; Vorisek et al, 2002). Este método foi utilizado para determinar os parâmetros difusionais do espaço extracelular: fração de volume extracelular  $\alpha$  ( $\alpha$ = volume do espaço extracelular /volume total do tecido), tortuosidade  $\lambda$ , definida como  $\lambda^2=D/ADC$ , onde D é o coeficiente de difusão no meio livre e ADC é o coeficiente de difusão aparente no tecido encefálico, e a captação não-específica  $k'$  (Nicholson e Philips, 1981).

O cátion TMA<sup>+</sup> foi administrado por iontoforese no espaço extracelular do tecido com o uso de uma micropipeta e sua concentração foi determinada por um

microeletrodo íon-seletivo TMA<sup>+</sup>-ISM (TMA<sup>+</sup>- íon selective microelectrode) colocado a uma determinada distância. A concentração local medida pelo microeletrodo é inversamente proporcional ao volume do espaço extracelular. A micropipeta e o microeletrodo são fixados juntos a fim de estabilizar a distância entre suas pontas. O canal íon sensível possui dois canais ISM, o primeiro contendo um trocador de íons líquido na ponta (Corning 477317) altamente sensível a íons TMA<sup>+</sup> e preenchido com TMACl (100 mM), e o segundo, canal de referência, preenchido por NaCl 150 mM (Figura 39). Os procedimentos para preparação dos microeletrodos foram previamente descritos em detalhes por Sykova (Sykova, 1992).

Os parâmetros difusionais como fração de volume extracelular ( $\alpha$ ), tortuosidade ( $\lambda$ ) e captação não específica ( $k'$ ) são expressos em uma curva de difusão (Figura 36). As mudanças obtidas na concentração de TMA induzida por iontoforese foram registradas pelos microeletrodos ligados a amplificadores e analisados com o software Voltoro (Chen et al, 2002; Chen e Nicholson, 2002).

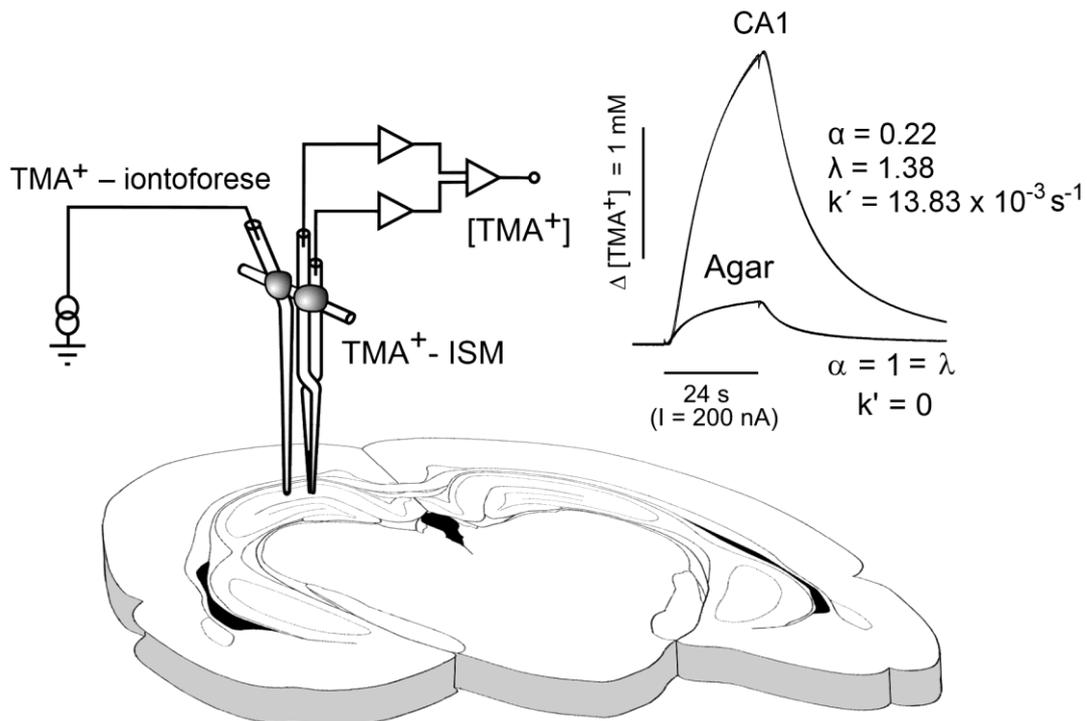


Figura 36. Modelo do conjunto experimental utilizado para registro dos parâmetros difusionais no espaço extracelular, e curvas representativas de difusão de TMA<sup>+</sup> obtidas no gel de Agar e em CA1. Note que no tecido, no qual a difusão dos íons é dificultada por diversas barreiras e restrita ao espaço extracelular, a amplitude da curva é muito maior e sua forma difere da curva de difusão medida no gel de Agar, no qual por definição os valores de difusão são iguais aos do meio livre.

As pontas do microeletrodo íon-seletivo e da micropipeta foram mantidos unidos a uma distância fixa ( $90 \pm 10 \mu\text{m}$ ) com o uso de resina odontológica. Os registros foram realizados em temperatura ambiente (22 a 26° C), e as primeiras curvas de difusão em cada experimento foram registradas com o eletrodo inserido em gel de Agar a 0,3% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), dissolvido em uma solução de 150 mM NaCl, 3mM KCl e 1 mM TMACl, no qual por definição os valores de difusão são iguais aos valores de difusão no meio livre ( $\alpha=\lambda=1$  e  $k'=0$ ).

As curvas obtidas no Agar foram analisadas de acordo com a equação de difusão modificada através do software Voltoro (Nicholson e Philips, 1981), a fim de obter o número de transporte do eletrodo ( $n$ ), e o coeficiente de difusão no meio livre ( $D$ ). O número de transporte do eletrodo  $n$  é o valor que reflete a mobilidade elétrica do eletrodo, fator-chave para a iontoforese (Pérez-Coll ET AL, 2013). Sabendo-se  $n$  e  $D$ , os valores de  $\alpha$ ,  $\lambda$  e  $k'$  podem ser obtidos pelas curvas de difusão no tecido, que são comparadas com a curva teórica gerada pelo programa com base na equação diferenciada de difusão, calculada para os valores obtidos no Agar (Sykova e Nicholson, 2008).

Os eletrodos foram inseridos no giro denteado e na região de CA1 a uma profundidade de 200  $\mu\text{m}$  (metade da secção) com o auxílio de um *nanostepper* para a obtenção das curvas de difusão. O posicionamento padrão dos eletrodos nos experimentos pode ser observado na figura 40. Os parâmetros utilizados para a iontoforese foram os seguintes: corrente de polarização (*bias current*) de 20 nA, aplicada continuamente para manter um número de transporte constante, e uma corrente de +180 nA de 24 segundos de duração para a geração da curva de difusão.

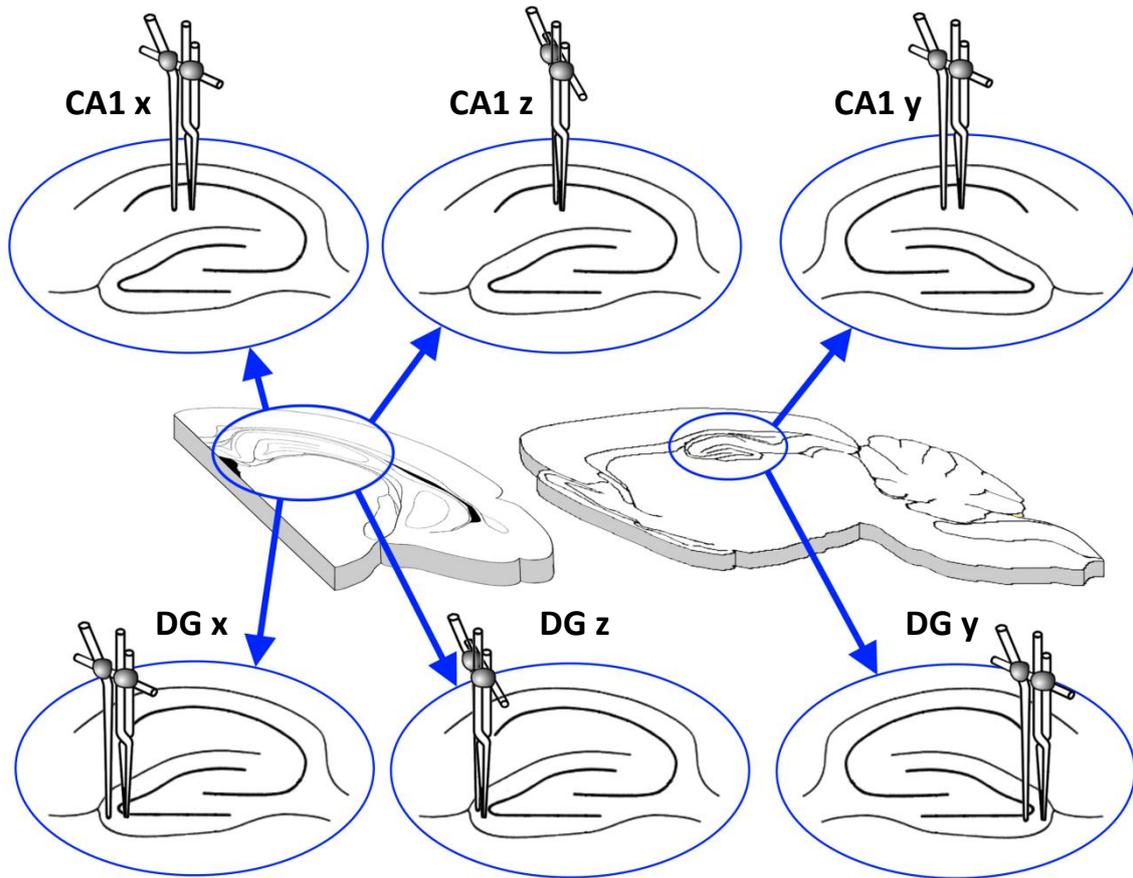


Figura 37. Posicionamento padrão dos eletrodos para o registro das curvas de difusão. Metade dos animais pertencentes a cada experimento foram seccionados no plano sagital, e a outra metade no plano coronal, a fim de que as medidas de difusão pudessem ser realizadas nos três eixos ortogonais.

Para as medidas em um meio potencialmente anisotrópico, os parâmetros  $\alpha_x$ ,  $\lambda_x$ ,  $\alpha_y$ ,  $\lambda_y$  e  $\alpha_z$ ,  $\lambda_z$  foram extraídos das equações modificadas de difusão válidas para os três eixos ortogonais x, y e z. Em cada secção foram obtidas três curvas para cada eixo (coronal: eixos x e z, sagital: eixos y e z) em CA1 e no giro denteado. A partir dos dados extraídos das três curvas de difusão para cada sequência foram obtidas as médias. O quadro 5 apresenta resumidamente o número de animais e secções dos quais foram obtidas as curvas para cada eixo. O valor real da variável escalar alfa foi calculado usando as médias dos dados experimentais de cada eixo, de acordo com a fórmula  $\alpha(x) = \alpha_x \frac{\lambda_y \lambda_z}{\lambda_x^2}$  (sykova e Nicholson 2008).

GRUPO	SUBGRUPO	ÁREA	EIXO	(n) SECÇÕES	(n) ANIMAIS
NINHADA PEQUENA	EXERCITADO	DG	X	12	5
			Y	11	5
			Z	13	6
	SEDENTÁRIO		X	14	7
			Y	10	5
			Z	18	11
NINHADA GRANDE	EXERCITADO		X	14	6
			Y	10	5
			Z	14	8
	SEDENTÁRIO		X	12	6
			Y	10	6
			Z	15	9
NINHADA PEQUENA	EXERCITADO	CA1	X	5	4
			Y	7	6
			Z	5	4
	SEDENTÁRIO		X	11	7
			Y	8	6
			Z	2	2
NINHADA GRANDE	EXERCITADO		X	9	5
			Y	4	3
			Z	4	4
	SEDENTÁRIO		X	7	6
			Y	7	5
			Z	6	6

Quadro 5. Números de animais e secções dos quais foram obtidas as curvas de difusão para cada eixo em cada área estudada. Para cada secção em cada eixo foram obtidas três curvas com os valores de  $\alpha$ ,  $\lambda$  e  $k'$ .

### 3.5- *Imunohistoquímica.*

Os hemisférios esquerdos de 5 animais em cada subgrupo foram pós-fixados em solução de paraformaldeído a 4% durante a noite, sendo então incubados em tampão fosfato salina 0,9% pH 7.4, seguido de solução de sacarose a 10, 20 e 30% para crioproteção, e então congelados e seccionados no plano coronal a 20 $\mu$ m em micrótomo criostato (Leica CM 1850). Os cortes obtidos foram imunomarcados com anticorpos para GFAP, NG2 e Reelina. Os anticorpos utilizados no presente estudo estão listados no quadro abaixo:

ANTÍGENO	DILUIÇÃO	TIPO	FABRICANTE	ANT. 2º
GFAP	1:200	Mouse IgG	Sigma	GAM 488/594
NG2	1:400	Rabbit IgG	Millipore	GAR 488/594
REELINA	1:1000	Mouse IgG	Millipore	GAM 488/594

Quadro 6. Anticorpos utilizados para reações imunohistoquímicas no presente trabalho. Anticorpos primários: GFAP: anti-glial fibrillary acidic protein; NG2: anti-NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan, Reelina: Anti-reelin. Anticorpos secundários: GAR 488/594: goat anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor 488 ou 594; GAM 488/594: goat anti-mouse IgG conjugado com Alexa Fluor 488 ou 594.

Os procedimentos de imunomarcção foram realizados da seguinte forma: As secções obtidas em micrótomo foram lavadas em tampão fosfato salina 0,2M pH 7.4 em temperatura ambiente, seguida de incubação por 2h em solução contendo 5% Chemiblocker (Millipore), 2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 10% de soro normal de cabra diluídos em PBS. Esta mesma solução foi utilizada para a diluição do anticorpo. Em seguida, as secções foram incubadas no anticorpo primário a 4°C por 72h, sendo então lavadas em PBS 0,2M pH 7.4 e subsequentemente incubadas por 2h no anticorpo secundário. A fim de permitir a visualização dos núcleos celulares, as secções foram montadas utilizando-se meio de montagem Vectashield contendo DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

### ***3.6- Morfometria confocal.***

As secções imunomarcadas foram examinadas utilizando-se um microscópio confocal FluoView 10i (Olympus, Prague, Czech Republic). Foram obtidas inicialmente imagens bidimensionais a intervalos regulares (10 imagens para cada sítio observado, em intervalos regulares de 1µm, resolução 1024x1024 pixels), sendo estas posteriormente utilizadas para a obtenção de uma projeção integrada das 10 imagens através do eixo Z, obtendo-se assim uma projeção tridimensional das estruturas presentes na área da secção analisada (figura 38).

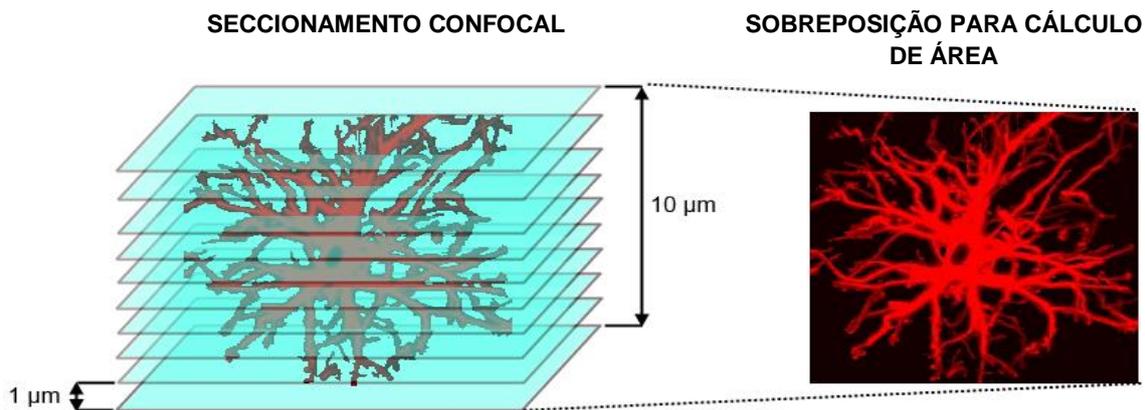


Figura 38. Obtenção das imagens para morfometria confocal nas secções imunomarcadas para células NG-2 positivas e astrócitos. À esquerda: planos confocais paralelos obtidos nas áreas de interesse. À direita: resultado da sobreposição das imagens obtidas pelo seccionamento confocal para obtenção de uma única projeção tridimensional da amostra, utilizada posteriormente para o cálculo da área ocupada pelas células no tecido.

Para as imagens das secções imunomarcadas para GFAP e NG2 foi utilizada a objetiva de 60x, obtendo-se, para cada secção, 3 projeções de cada área de interesse, a saber: Camada polimórfica do giro denteado, camada molecular do giro denteado e stratum radiatum em CA1, totalizando 9 imagens por secção. O posicionamento escolhido para a obtenção das imagens pode ser observado na figura 39. Para as secções imunomarcadas para reelina, as fotos foram obtidas utilizando um menor aumento (20x) a fim de permitir melhor visualização das estruturas, que tendem a ser mais escassas que as reveladas pelas imunomarcações anteriormente descritas. Nesse último caso foram obtidas 4 imagens por secção, uma contendo a camada polimórfica do giro denteado, duas contendo a camada molecular e uma em CA1, como ilustrado na figura 39. Foram utilizados 5 animais de cada subgrupo, provenientes de ninhadas diferentes, e para cada animal e cada imunomarcação foram analisadas 5 secções, obtidas em intervalos médios de 200µm. O critério para a seleção da secção de início da sequência durante o corte foi a definição clara do giro denteado e do hipocampo.

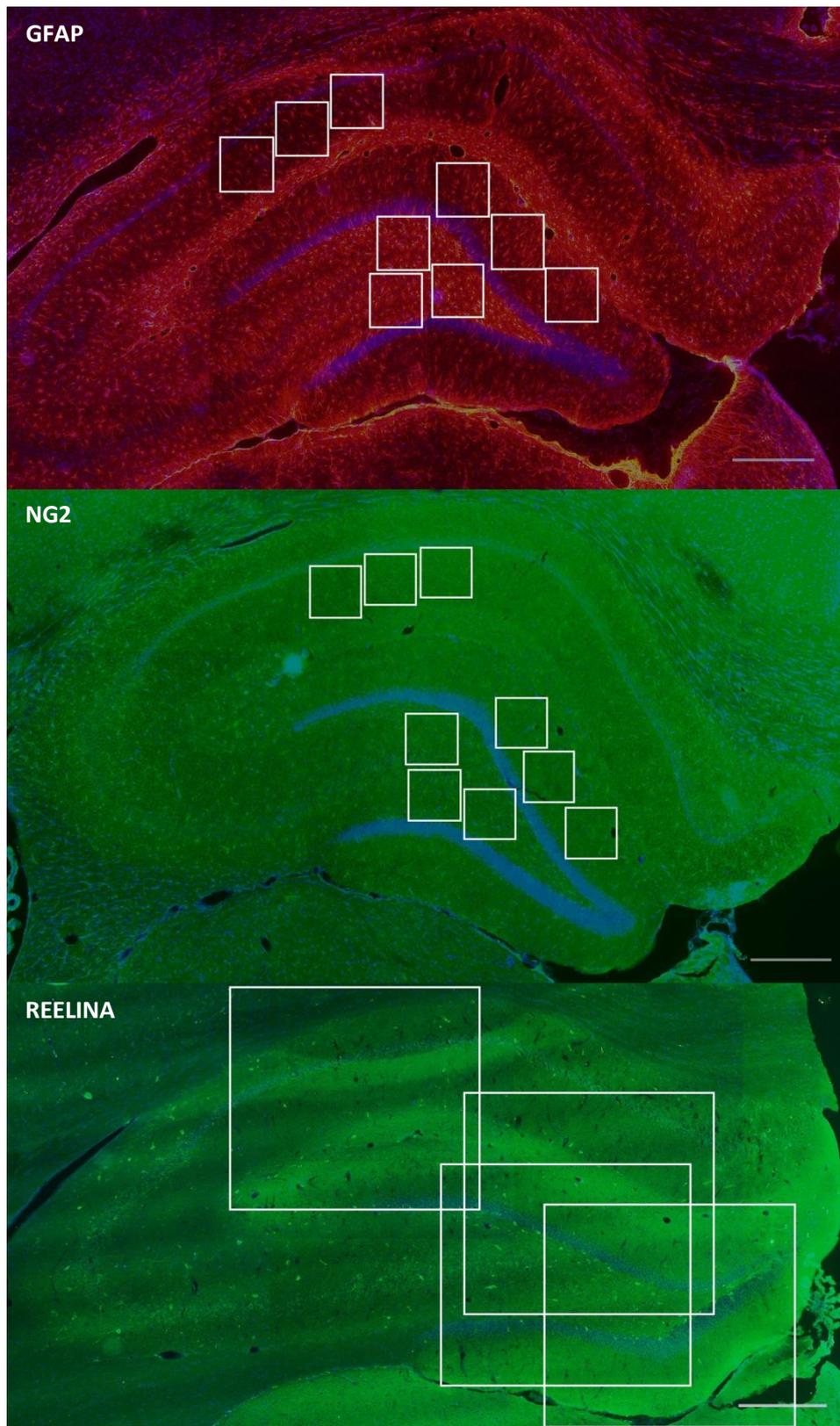


Figura 39. Áreas hipocâmpais nas quais foram obtidas as imagens para análise no presente estudo. Os quadros mostram a localização das imagens obtidas para cada secção nas camadas polimórfica e molecular do giro denteado, e no stratum radiatum em CA1. Escalas: 300  $\mu$ m.

Todas as imagens foram obtidas obedecendo às mesmas condições de iluminação, intensidade do laser, magnitude da objetiva, e obtidas nas mesmas regiões para todos os grupos experimentais. O quadro 7 mostra detalhadamente os parâmetros de obtenção das imagens para cada imunomarcação. A partir das projeções tridimensionais obtidas pelas sequências de imagens para cada secção, foram calculadas as áreas de superfície ( $\mu\text{m}^2$ ) ocupadas pelas células nas amostras, através do Software CellAnalyst, desenvolvido no Instituto de Medicina Experimental AS CR v.v.i., Praga, República Tcheca.

	<b>GFAP</b>	<b>NG2</b>	<b>REELINA</b>
<b>Modo de escaneamento</b>	XYZ	XYZ	XYZ
<b>Dimensão X</b>	212,13 $\mu\text{m}$	212,13 $\mu\text{m}$	636,4 $\mu\text{m}$
<b>Dimensão Y</b>	212,13 $\mu\text{m}$	212,13 $\mu\text{m}$	636,4 $\mu\text{m}$
<b>Dimensão Z</b>	10 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$
<b>Tamanho da imagem</b>	1024x1024 pixels	1024x1024 pixels	1024x1024 pixels
<b>Objetiva</b>	60x	60x	10x
<b>Abertura Confocal</b>	2,0	2,0	2,5
<b>Zoom</b>	x 1,0	x 1,0	x 2,0
<b>Filtro Canal 1</b>	DAPI	DAPI	DAPI
<b>Comp. onda laser 1</b>	405 nm	405 nm	405 nm
<b>Transmissividade laser 1</b>	52%	52%	52%
<b>Filtro Canal 2</b>	Alexa Fluor 568	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 488
<b>Comp. onda laser 2</b>	559 nm	473 nm	473 nm
<b>Transmissividade laser 2</b>	48%	50%	50%

Quadro 7. Parâmetros para obtenção das imagens em microscópio confocal para análises.

No intuito de investigar se as possíveis diferenças nas áreas ocupadas pelas células são relacionadas à alterações morfológicas ou à alterações em sua proliferação, as células das amostras foram quantificadas utilizando o software ImageJ. Foram realizadas para cada secção duas quantificações, a primeira sobre o total de células, utilizando a imagem obtida através do filtro DAPI, e a segunda sobre as células de interesse (astrócitos ou células NG2 positivas), utilizando a imagem obtida através dos dois filtros (DAPI + Alexa Fluor). A colocalização do núcleo com as outras estruturas celulares foi utilizado como critério para a contagem. Para as secções imunomarcadas para reelina as contagens foram realizadas utilizando a imagem obtida através do filtro

Alexa Fluor 488, e foram quantificados todos os elementos celulares marcados (Figura 40).

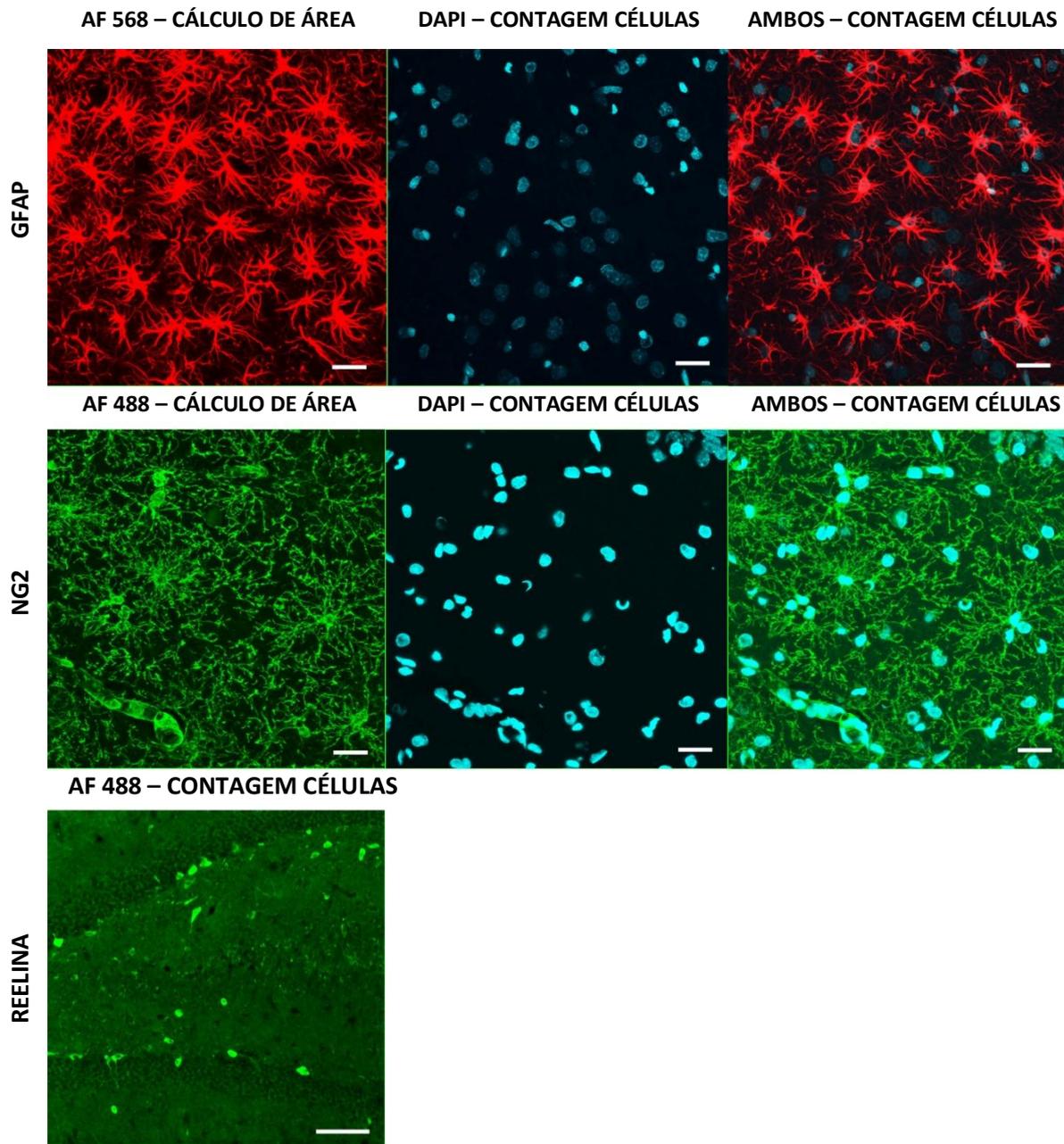


Figura 40. Projeções tridimensionais de fotomicrografias obtidas em microscópio confocal para cálculo de área, contagem total de células e contagem das células de interesse para as secções imunomarcadas para GFAP, NG2 e reelina. AF: Alexa Fluor. Escalas: GFAP e NG2= 20  $\mu$ m, reelina = 100  $\mu$ m.

### ***3.7- Análises estatísticas.***

As análises estatísticas dos dados obtidos na segunda fase do projeto foram realizadas utilizando-se estatística paramétrica a fim de verificar as possíveis diferenças entre os grupos e subgrupos experimentais. Os dados obtidos através das observações comportamentais, pesos, análises dos parâmetros difusionais e análise morfológica de células são apresentados sob a forma de médias  $\pm$  erro padrão. As diferenças estatísticas foram detectadas através da análise de variância (ANOVA), com pós-teste de Bonferroni e teste T, realizados com auxílio dos softwares GraphPad 5.1 e BioEstat 5.0. Foi considerado estatisticamente significativo o intervalo mínimo de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultados

*4.1- Influência do tamanho da ninhada e do exercício tardio sobre elementos gliais e de matriz extracelular e suas relações com os parâmetros difusionais da matriz extracelular do giro denteado de ratos adultos (Artigo: Influence of litter size and late exercise on glial elements and extracellular matrix: relations with the diffusion parameters of the extracellular matrix of the dentate gyrus of adult rats – Artigo em processo de redação).*

*4.1.1- Observações comportamentais: o cuidado materno.*

O quadro 8 mostra as médias do número de observações por sessão obtidas para cada um dos comportamentos maternos observados durante o período de lactação das proles criadas em ninhadas grandes e ninhadas pequenas. Os animais criados em ninhadas grandes receberam significativamente menor quantidade de lambidas (Teste T,  $p < 0,05$ ) bem como tiveram com maior frequência filhotes fora do ninho.

	IA	IB	SUP	L	IA/L	CN	MFN	R	FFN	MN	ALI
NP	27.4	4.9	12.0	0.6*	4.2*	0.35	26.9	0.22	3.5	7.4	5.3
NG	24.7	4.3	13.3	0.2	2.9	0.24	31.5	0.21	13.0*	5.9	6.6

Quadro 8. Médias da apresentação dos comportamentos maternos por período de observação nas ninhadas grandes e pequenas. \* Teste t bicaudal  $p < 0,05$ . IA: inclinação alta, IB: inclinação baixa, SUP: posição supina, L: lambida, IA/L: inclinação alta+lambida, CN: construção do ninho, MFN: mãe fora do ninho, R: recolhida de filhotes, FFN: filhotes fora do ninho, MN: mãe no ninho, ALI: mãe alimentando-se.

As fêmeas foram classificadas como muito ou pouco cuidadoras com base na média e desvio padrão da frequência do comportamento de lambidas da população (L e IA/L) (Meaney, 2001). A figura 41 mostra a média da quantidade de lambidas por fêmea, juntamente com a média e o desvio padrão da população. Foram classificadas

como muito cuidadoras as ratas com média de lambidas superior a 0.73 L média=0.49, desvio padrão=0.23, n=11) e 4.79 IA/L (média=3.69, desvio padrão=1.1, n=11) e como pouco cuidadoras as ratas com média de lambida inferiores a 0.25 L e 2.59 IA/L. A distribuição do comportamento de lamber apresentou um padrão normal, e as fêmeas classificadas como muito e pouco cuidadoras propositadamente pertencem aos grupos de ninhadas pequenas e grandes, respectivamente. A diferença das médias dos comportamentos de lambida foi estatisticamente significativa entre as ninhadas grandes (0.28 ± 0.12 L e 2.97 ± 0.57 IA/L) e as ninhadas pequenas (0.66 ± 0.14 L e 4.29 ± 1.1 IA/L) (Teste t, p<0,05).

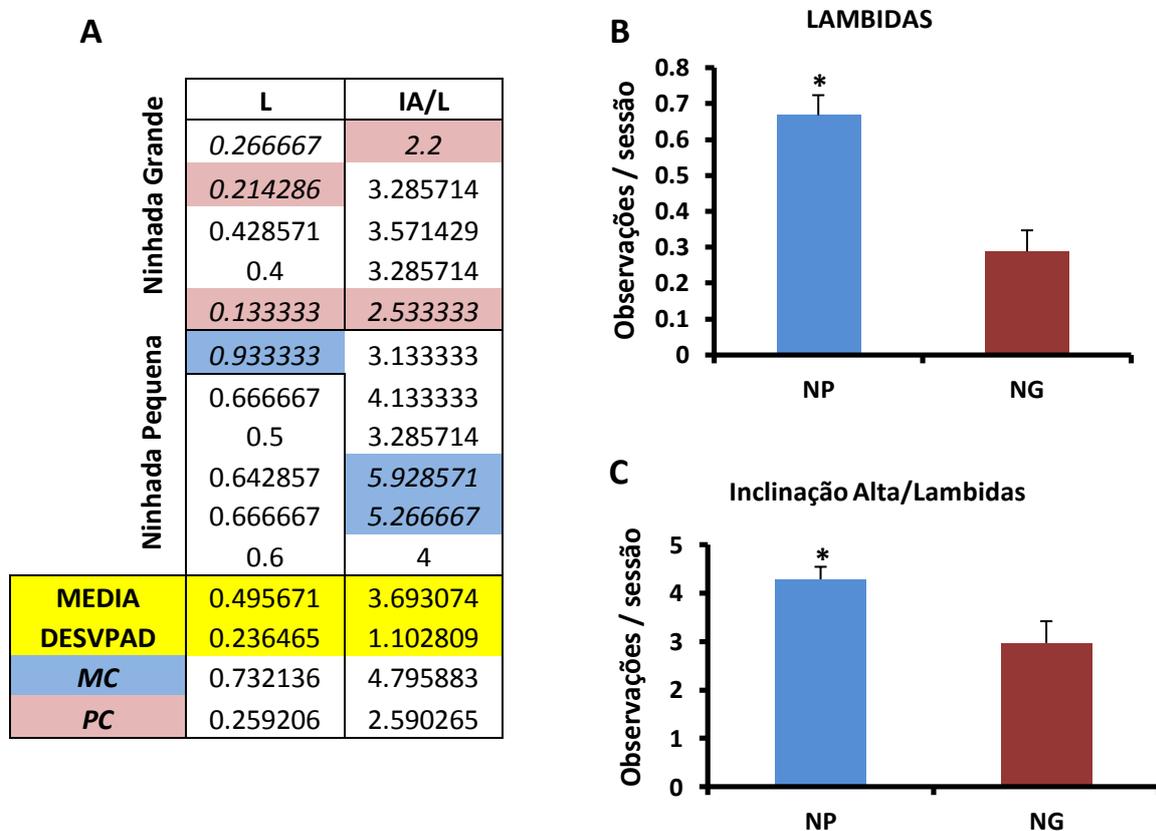


Figura 41. A) Médias dos comportamentos de lambidas (L) e inclinação alta + lambidas (IA/L) das ratas de ninhadas grandes (n=5) e ninhadas pequenas (n=6). MC (azul): muito cuidadoras, PC (rosa): pouco cuidadoras. B,C) Gráficos representando as médias da quantidade de lambidas (B) e inclinação alta + lambidas (C) por sessão de observação para cada grupo experimental. NG: ninhada grande, NP: ninhada pequena. \* Teste t, p<0,05.

#### 4.1.2- Parâmetros difusionais do espaço extracelular.

##### - Anisotropia

As medidas dos parâmetros difusionais (fração de volume extracelular  $\alpha$ , tortuosidade  $\lambda$  e captação não específica  $k'$ ) foram extraídos das equações modificadas de difusão válidas para os três eixos ortogonais x, y e z , obtendo-se  $\alpha_x$ ,  $\lambda_x$ ,  $\alpha_y$ ,  $\lambda_y$  e  $\alpha_z$ ,  $\lambda_z$ . As curvas de difusão obtidas para cada eixo (coronal: eixos x e z, sagital: eixos y e z) em CA1 e no giro denteado foram comparadas entre si a fim de detectar a anisotropia do meio. A figura 42 mostra as representações gráficas das médias dos parâmetros  $\alpha$  e  $\lambda$  obtidos para cada eixo em cada subgrupo experimental. Os três eixos de cada variável em cada subgrupo foram comparados através de análise de variância ANOVA dois critérios. Não foram detectadas diferenças entre os valores obtidos para  $\alpha$  ou  $\lambda$  nos três eixos ortogonais em nenhum dos grupos experimentais observados, não tendo sido detectada anisotropia indicada pelos parâmetros difusionais observados no presente estudo.

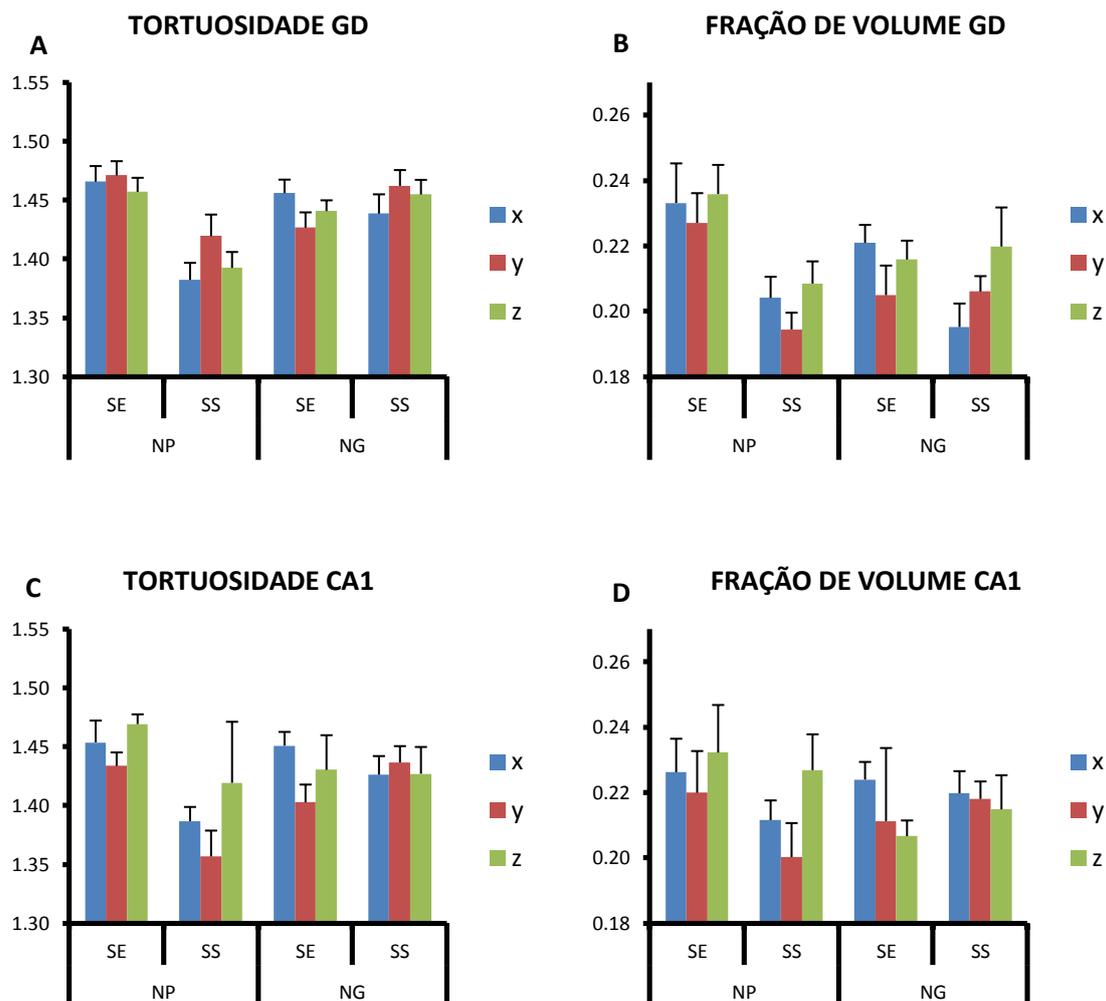


Figura 42. Valores dos parâmetros difusionais obtidos para cada eixo ortogonal no giro denteado (A, B) e em CA1 (C, D). A e C: médias da tortuosidade, B e D: medidas da fração de volume extracelular. ANOVA, um critério. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três eixos ortogonais em nenhum grupo experimental. NP: ninhada pequena, NG: ninhada grande.

- *Curvas difusionais*

A figura 43 mostra as representações gráficas das curvas médias de difusão obtidas pelo método de iontoforese de tetrametilamônio em tempo real no giro denteado e em CA1 dos subgrupos experimentais da segunda fase do presente estudo. Dentre as condições experimentais observadas, o exercício físico induziu alterações na fração de volume extracelular no giro denteado ( $F=12.63$ ,  $p=0.0005$ ), havendo interação entre as variáveis exercício físico e tamanho da ninhada ( $F=4.82$ ,  $p=0.0296$ ), sem alterações na fração de volume extracelular na região hipocampal de CA1. A tortuosidade foi afetada no giro denteado tanto pelo exercício físico ( $F=13.71$ ,  $p=0.0003$ ; CA1:) quanto pelo

tamanho da ninhada ( $F=4.55$ ,  $p=0.0345$ ), e em CA1 pelo exercício físico ( $F=11.67$ ;  $p=0.0011$ ), havendo interação entre as variáveis no giro denteado ( $F=23.10$ ,  $p<0.0001$ ) e em CA1 ( $F=9.01$ ,  $p=0.0037$ ).

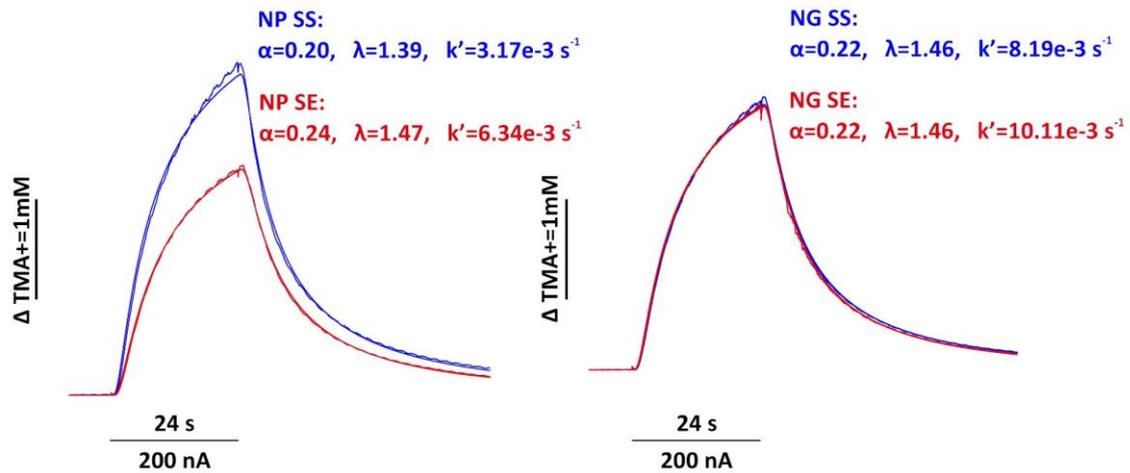


Figura 43. Curvas médias de difusão obtidas através do método de iontoforese de tetrametilamônio em tempo real para os animais provenientes de ninhadas pequenas (esquerda) e grandes (direita). NP: ninhada pequena, NG: ninhada grande, SS: sedentários, SE: exercitados quando adultos.

#### - Fração de volume extracelular

A figura 44 mostra as representações gráficas das médias das frações de volume do espaço extracelular para cada grupo experimental nas regiões do giro denteado e CA1 no hipocampo dos animais adultos jovens da segunda fase do presente estudo, sedentários e exercitados. No giro denteado, o exercício físico induziu um aumento significativo na fração de volume extracelular em relação aos grupos sedentários ( $F=12,63$ ,  $p= 0,0005$ ), sem efeito observado induzido pelo tamanho da ninhada, sendo a interação entre as duas variáveis significativa ( $F=4,82$ ,  $p=0,0296$ ). Na região CA1, as diferenças observadas para esta variável não foram estatisticamente significativas.

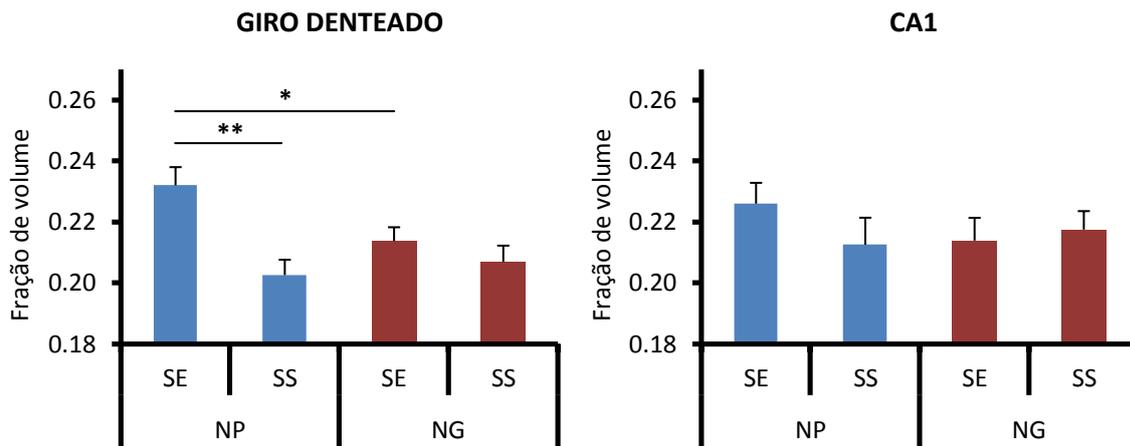


Figura 44. Representações gráficas das médias das frações de volume extracelular no giro denteado (esquerda) e CA1 (direita). SE: jovens exercitados aos 120 dias de vida; SS: jovens sedentários; NP: ninhada pequena; NG: ninhada grande. \* ANOVA dois critérios, teste a priori de Bonferroni, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

#### - Tortuosidade

Os gráficos representados na figura abaixo mostram as médias da tortuosidade mensuradas para cada grupo experimental no giro denteado e na região CA1 do hipocampo. No giro denteado, os animais de ninhadas pequenas mantidos sob condições sedentárias apresentaram valores de tortuosidade significativamente reduzidos em relação aos animais exercitados e aos animais de ninhadas grandes, sendo tanto a condição física ( $F=13.71$   $p=0,0003$ ) como o tamanho da ninhada ( $F=4.55$ ,  $p=0,0345$ ) estatisticamente significativos, havendo interação entre ambas condições ( $F=23.10$ ,  $P < 0,0001$ ). Na região hipocampal de CA1, os resultados observados são semelhantes, havendo significância induzida pela condição física ( $F=11.67$ ,  $p=0,0011$ ) e interação entre ambas as condições experimentais ( $F=9,01$ ,  $p= 0,0037$ ), entretanto sem efeito significativo induzido pelo tamanho da ninhada.

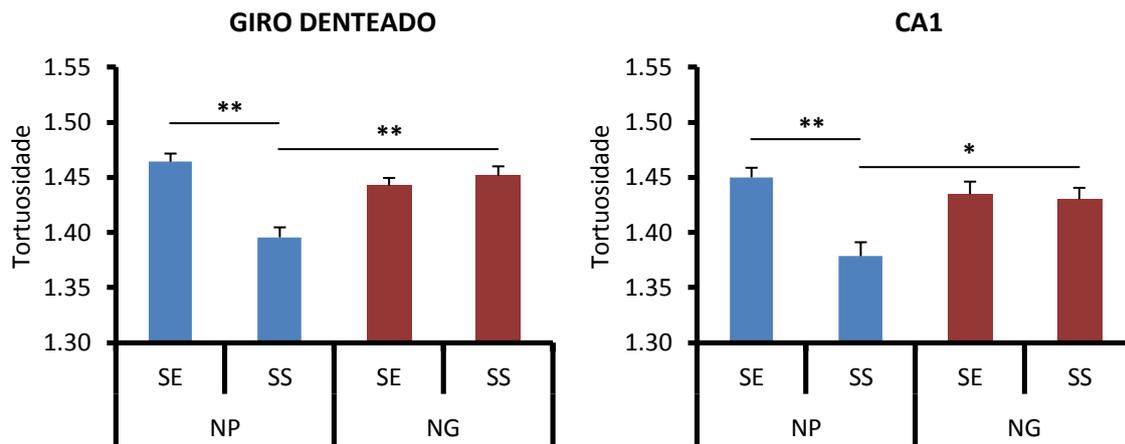


Figura 45. Gráficos das médias das tortuosidades no giro denteado (esquerda) e CA1 (direita). NP: ninhada pequena; NG: ninhada grande. ANOVA dois critérios, teste a priori de Bonferroni, \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.1.3- Morfometria confocal.

#### 4.1.4- Área de superfície dos astrócitos

Os gráficos abaixo representam a média da área de superfície dos astrócitos para cada grupo experimental nas camadas molecular e polimórfica do giro denteado e no *stratum radiatum* de CA1. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a área de superfície dos astrócitos dos grupos experimentais na camada molecular do giro denteado. Para a camada polimórfica do giro denteado, os animais das ninhadas pequenas exercitados apresentaram uma área de superfície significativamente maior ocupada por astrócitos em relação aos sedentários, tendo sido significativa a influência da condição física ( $F=6.87$ ,  $p=0.0185$ ), havendo interação entre as variáveis ( $F=7.35$ ,  $p=0,0154$ ), porém sem influência significativa do tamanho da ninhada sobre os resultados. Em CA1 os animais exercitados de ninhadas pequenas também apresentaram aumento da área de superfície ocupada por astrócitos em relação aos animais sedentários, entretanto somente a interação entre as variáveis apresentou-se estatisticamente significativa ( $F=7.15$ ,  $p=0,0166$ ), com uma tendência para significância induzida pela condição de exercício físico ( $F=3.82$ ,  $p=0,0683$ ).

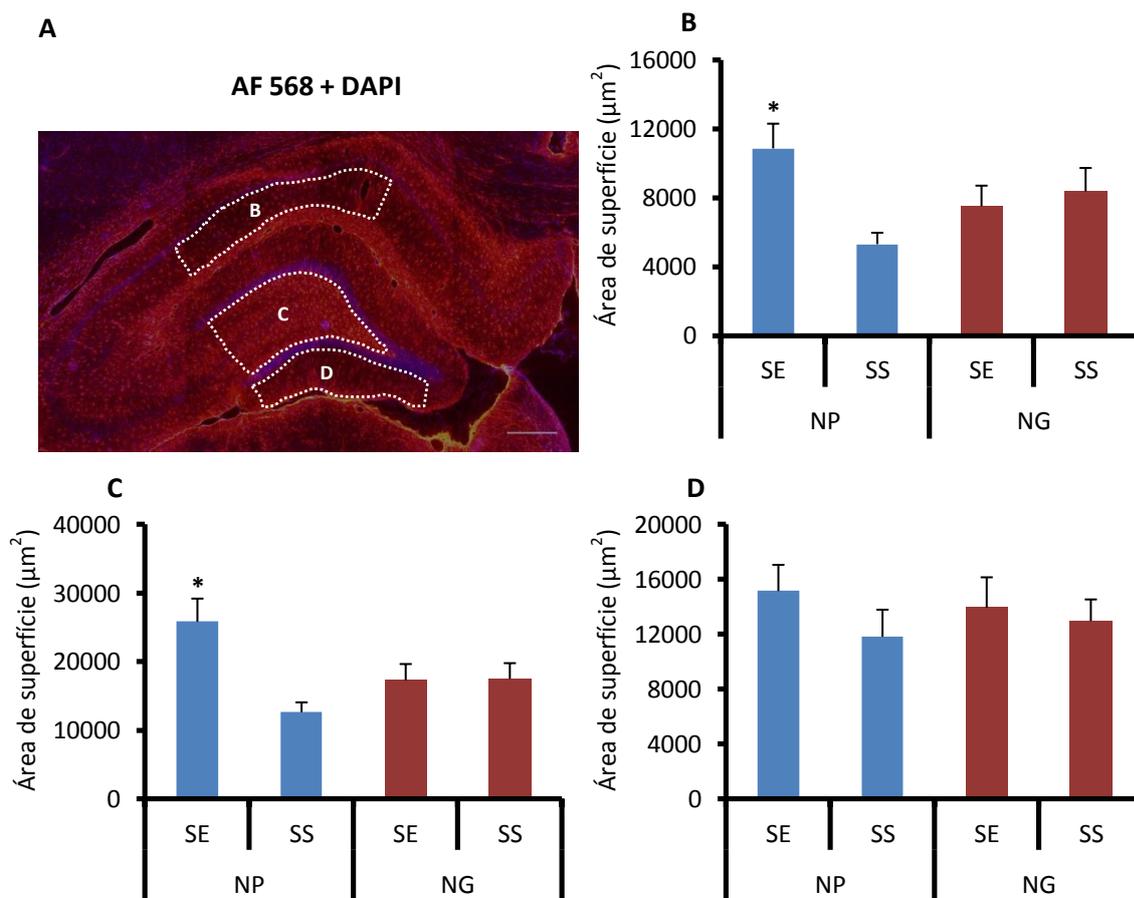


Figura 46. Médias da área ocupada por astrócitos no giro denteado e em CA1. A) Fotomicrografia do hipocampo representando as áreas fotografadas para o cálculo da área de superfície ocupada por astrócitos: B, C, D, camadas estrato radiado de CA1, camada polimórfica e molecular do giro denteado, respectivamente. B, C, D) Representações gráficas das médias da área de superfície ocupada pelos astrócitos nas amostras para cada subgrupo experimental no estrato radiado de CA1 (B), camada polimórfica do giro denteado (C) e camada molecular do giro denteado (D). \* indica a diferença significativa entre o grupo exercitado (SE) e sedentário (SS) de tamanho de ninhada correspondente. ANOVA dois critérios, teste a priori de Bonferroni, \*  $p < 0,01$ .

#### 4.1.5- Quantificação dos astrócitos e do total de células.

Para cada camada, foram quantificados o número de astrócitos, bem como a quantidade total de células por amostra marcadas pelo DAPI com o auxílio do Software ImageJ. As figuras abaixo apresentam fotomicrografias representativas das médias da

quantidade bem como da área de superfície ocupada pelos astrócitos para cada subgrupo experimental. Os gráficos ilustram a média da quantidade de astrócitos e do total de células por amostra para cada subgrupo, bem como a quantidade de astrócitos em relação ao total de células.

Na camada molecular do giro denteado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras com relação à quantidade total de células e de astrócitos (ANOVA, dois critérios teste de Bonferroni).

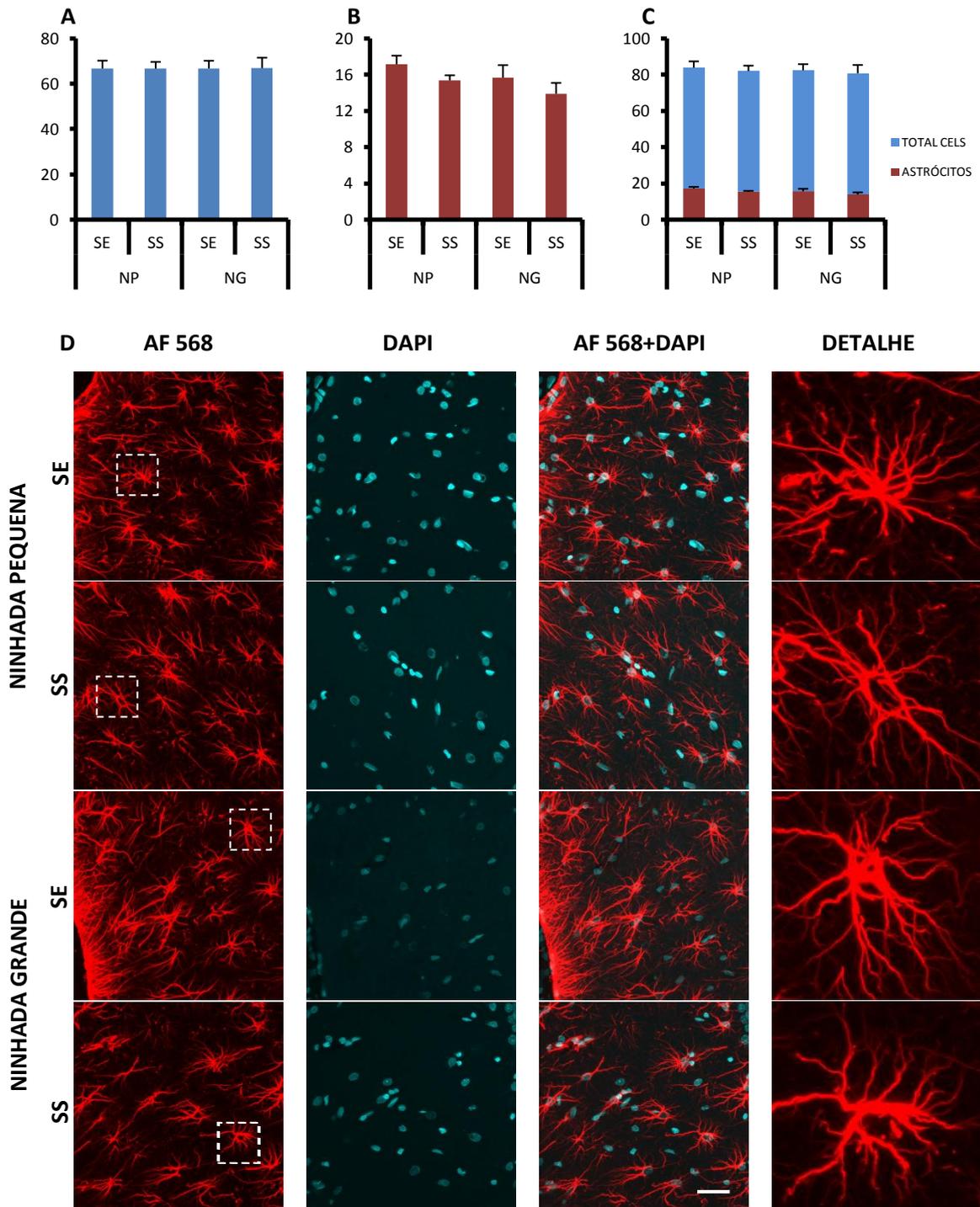


Figura 47. Quantificações astrocíticas por morfometria confocal na camada molecular do giro dentado. Médias da quantidade total de células por amostra (A), da quantidade de astrócitos (B) e comparação do total de astrócitos em relação ao total de células (C) para cada subgrupo experimental na camada molecular do giro dentado. D) Fotomicrografias representativas das médias do número de células e área de superfície ocupada por astrócitos para cada subgrupo experimental. Escala: 30 $\mu$ m.

Na camada polimórfica do giro dentado, o tamanho da ninhada exerceu influência significativa sobre o número de astrócitos ( $F=5.82$ ,  $p=0.0291$ ). Nas ninhadas pequenas, os animais exercitados apresentaram um aumento significativo no número de astrócitos em relação aos animais sedentários.

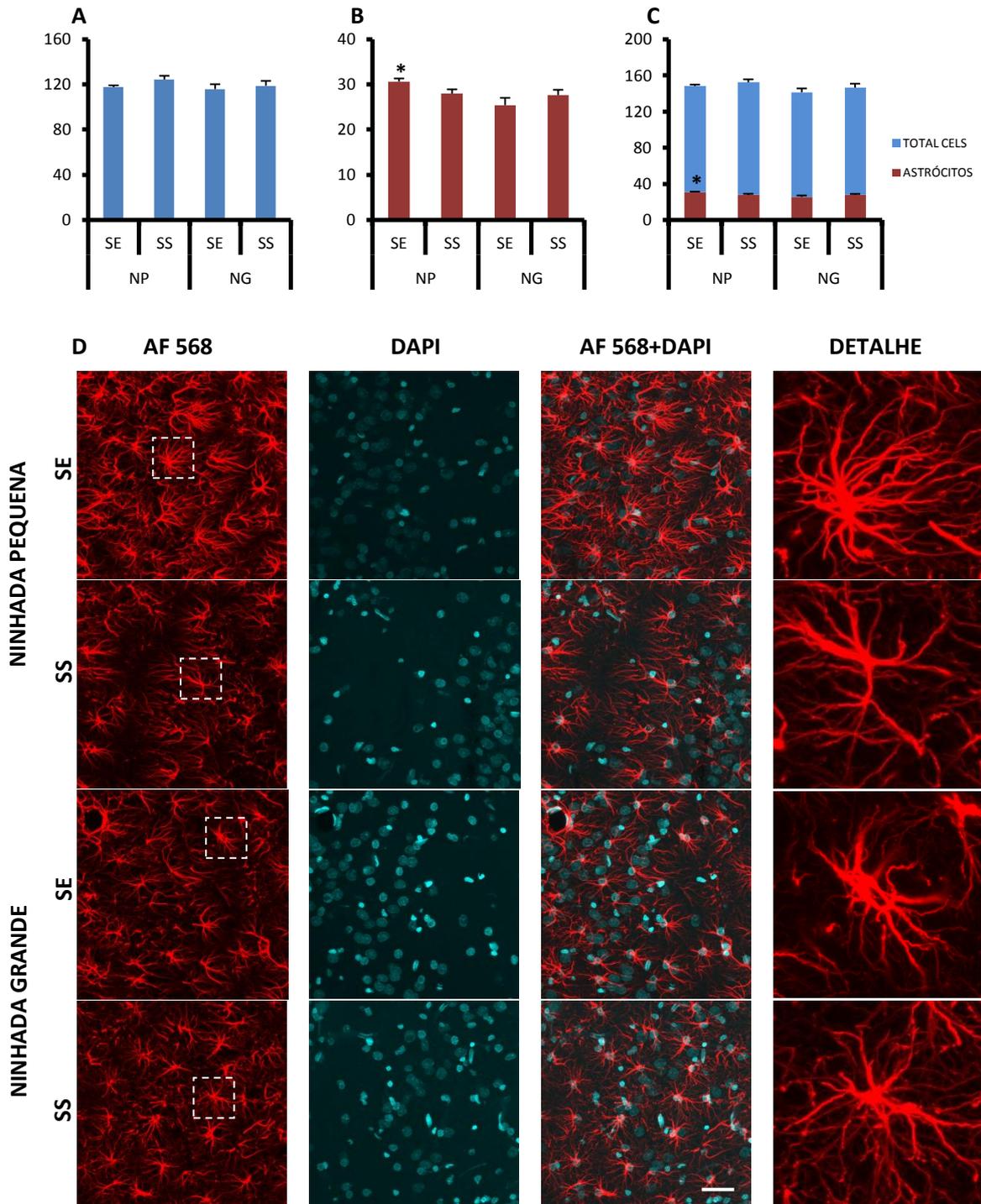


Figura 48. Quantificações dos astrócitos na camada polimórfica do giro dentado. Médias da quantidade total de células por amostra (A), da quantidade de astrócitos (B) e comparação do total de astrócitos em relação ao total de células (C) para cada grupo experimental. D) Fotomicrografias representativas das médias do número e área de superfície dos astrócitos para cada grupo experimental. Escala: 30 $\mu$ m. \* $p<0,05$ .

No estrato radiado de CA1, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos experimentais com relação à quantidade total de células e de astrócitos (ANOVA, dois critérios teste de Bonferroni).

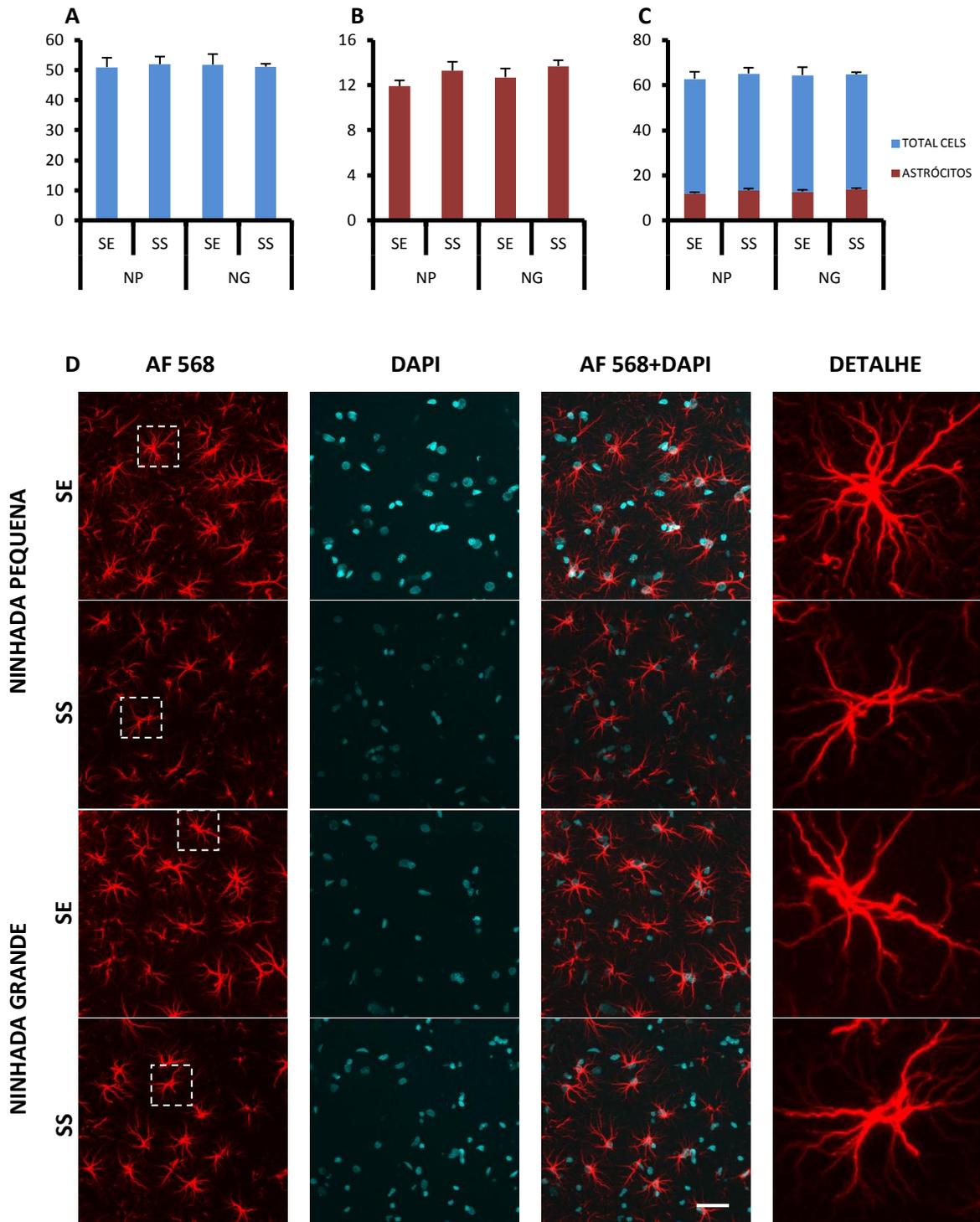


Figura 49. Quantificações astrocíticas por morfometria confocal no estrato radiado de CA1. Médias da quantidade total de células por amostra (A), da quantidade de astrócitos (B) e comparação do total de astrócitos em relação ao total de células (C) para cada subgrupo experimental no estrato radiado de CA1. D) Fotomicrografias representativas das médias do número de células e área de superfície dos astrócitos para cada subgrupo experimental. Escala: 30µm.

#### 4.1.6- Área de superfície das células NG2 positivas.

Os gráficos abaixo representam a média da área de superfície das células NG2 positivas para cada grupo experimental nas camadas molecular e polimórfica do giro denteado e no *stratum radiatum* de CA1. O tamanho da ninhada exerceu influência significativa sobre a área ocupada pelas células NG2 na camada polimórfica do giro denteado ( $F= 5.67$ ,  $p=0.0365$ ) e estrato radiado de CA1 ( $F=5.61$ ,  $p=0.0355$ ), havendo interação entre as variáveis. Os animais sedentários de ninhadas grandes apresentaram aumento na área ocupada pelas células NG2 nas três áreas observadas em relação aos animais sedentários de ninhadas pequenas e aos animais exercitados de ninhadas grandes nas camadas polimórfica do giro denteado e estrato radiado de CA1.

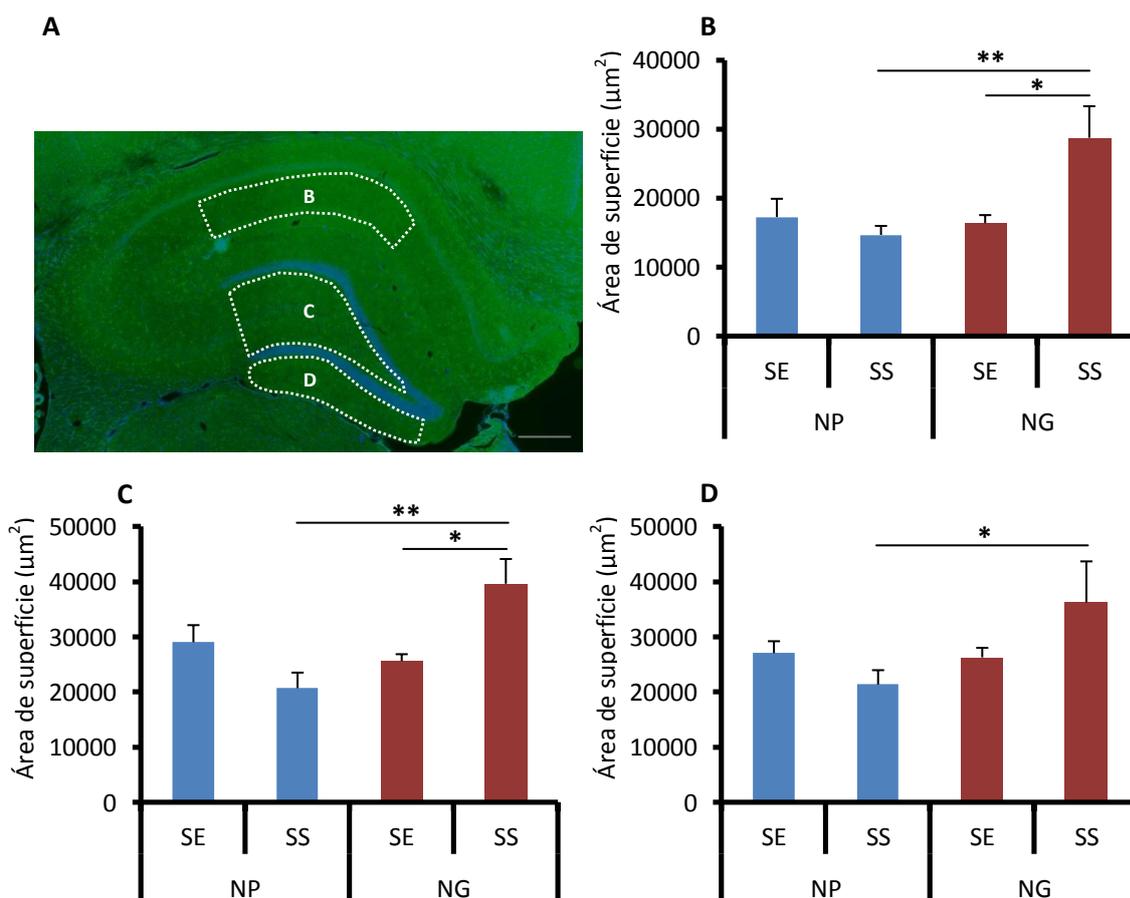


Figura 50. Áreas de superfície ocupadas pelas células NG2 positivas no giro denteado e em CA1. A) Fotomicrografia do hipocampo mostrando as áreas de amostragem: B, C, D) Gráficos das médias da área de superfície ocupada por células NG2 positivas para cada subgrupo experimental nas camadas estrato radiado de CA1 (B), polimórfica (C) e molecular (D) do giro denteado. ANOVA dois critérios, teste a priori de Bonferroni, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

#### *4.1.7- Quantificação das células NG2 positivas e do total de células.*

Para cada camada, assim como realizado anteriormente nas lâminas coradas para GFAP, foram quantificados o número de células NG2 positivas, bem como a quantidade total de células por amostra marcadas pelo DAPI. As figuras a seguir apresentam fotomicrografias representativas das médias da quantidade bem como da área de superfície ocupada pelas células NG2 positivas para cada subgrupo experimental, em cada uma das áreas analisadas. Os gráficos ilustram a média da quantidade dessas células e do total de células por amostra para cada subgrupo, bem como a quantidade de células NG2 positivas em relação ao total de células.

Em nenhuma das áreas estudadas foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação ao número total de células (marcadas pelo DAPI) entre os grupos experimentais no presente estudo.

Nas camadas molecular (Figura 51) e polimórfica (Figura 52) do giro denteado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras com relação à quantidade total de células e de células NG2 positivas (ANOVA, dois critérios teste de Bonferroni).

No estrato radiado de CA1, entretanto, o tamanho da ninhada exerceu influência significativa sobre o número de células NG2 positivas ( $F=5.04$ ,  $p=0.0444$ ). Os animais sedentários provenientes de ninhadas grandes apresentaram um aumento significativo do número de células NG2 positivas em relação aos animais sedentários provenientes de ninhadas pequenas (Figura 53).

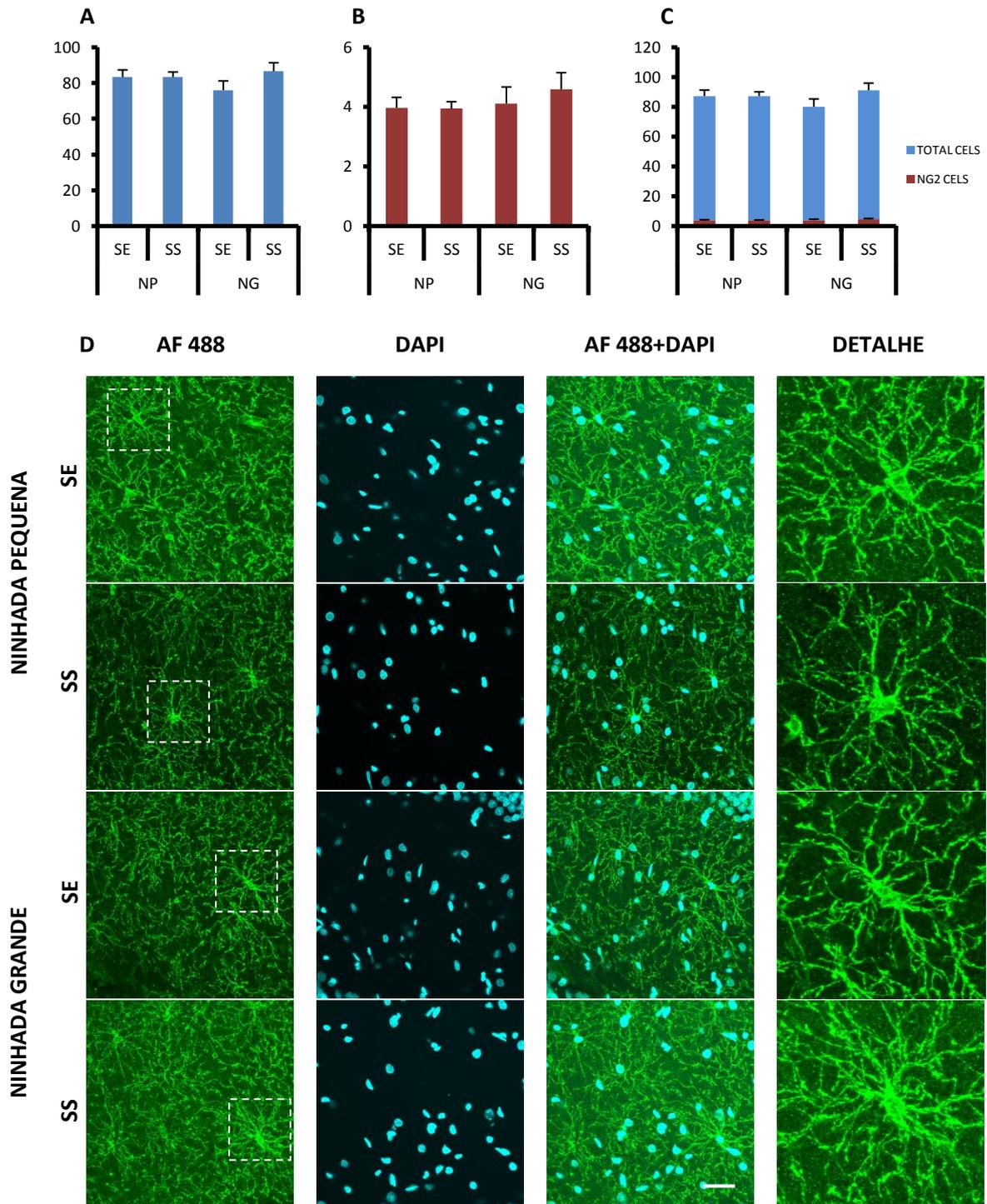


Figura 51. Quantificações das células NG2 positivas na camada molecular do giro denteado. Médias da quantidade total de células por amostra (A), da quantidade de células NG2 positivas (B) e comparação do total de células NG2 positivas em relação ao total de células (C) para cada subgrupo experimental. D) Fotomicrografias representativas das médias do número de células NG2 positivas e área de superfície ocupada por essas células para cada subgrupo experimental. Escala: 30 $\mu$ m.

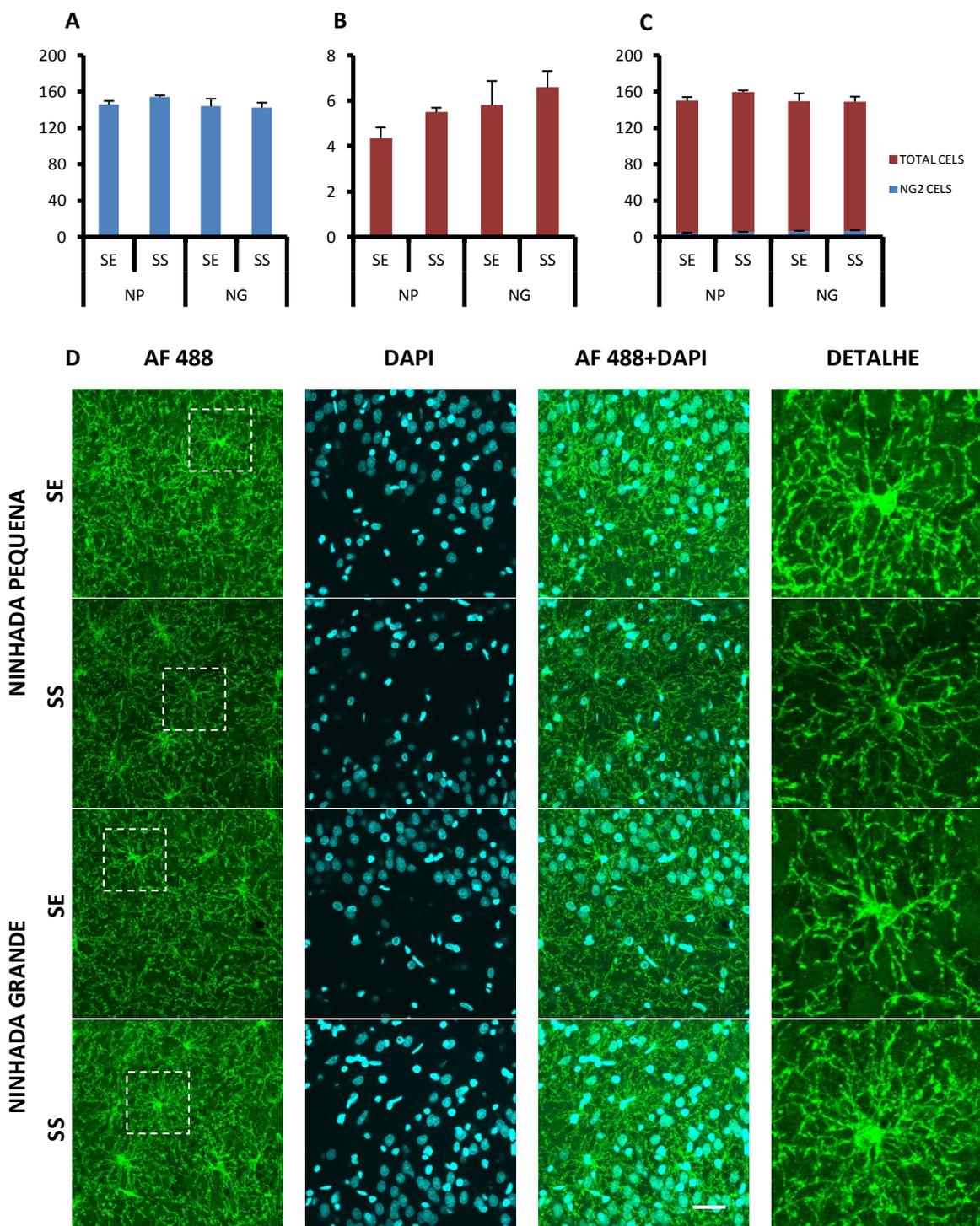


Figura 52. Quantificações das células NG2 positivas na camada polimórfica do giro denteado. Médias da quantidade total de células por amostra (A), da quantidade de células NG2 positivas (B) e comparação do total de células NG2 positivas em relação ao total de células (C) para cada subgrupo experimental. D) Fotomicrografias representativas das médias do número de células NG2 positivas e área de superfície ocupada por essas células para cada subgrupo experimental. Escala: 30 $\mu$ m.

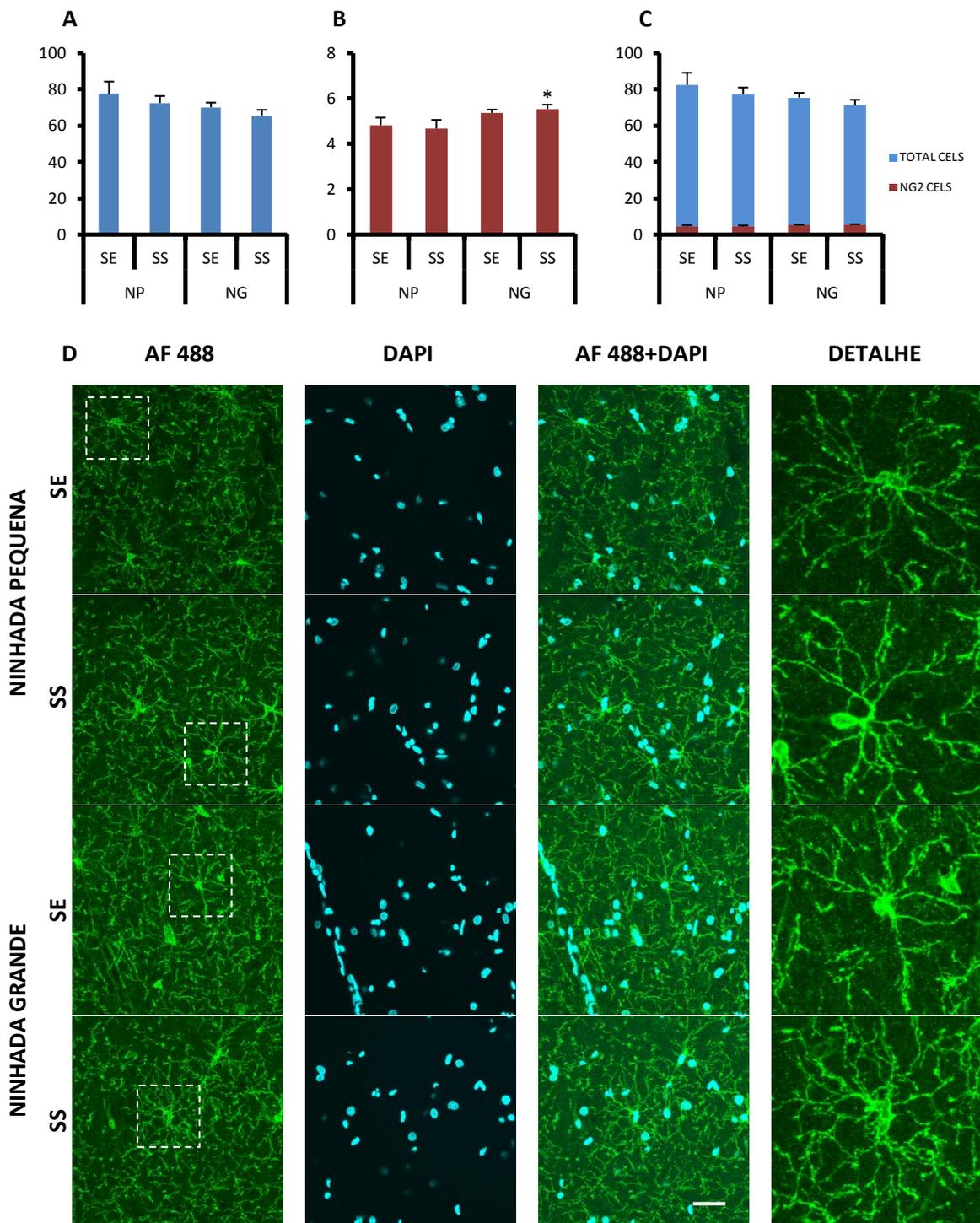


Figura 53. Quantificações das células NG2 positivas no estrato radiado de CA1. Médias da quantidade total de células por amostra (A), da quantidade de células NG2 positivas (B) e comparação do total de células NG2 positivas em relação ao total de células (C) para cada subgrupo experimental. D) Fotomicrografias representativas das médias do número de células NG2 positivas e área de superfície ocupada por essas células para cada subgrupo experimental. Escala: 30µm.

#### 4.1.8- Quantificação das células reelina positivas.

Os gráficos mostrados nas figuras abaixo mostram as médias do número de células reelina-positivas nas camadas molecular e polimórfica do giro denteado, bem como na região de CA1 dos grupos experimentais. As fotomicrografias observadas nas figuras representam o número médio de células reelina-positivas para cada subgrupo nas áreas analisadas.

Na camada molecular do giro denteado não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos experimentais quanto ao número de células reelina-positivas.

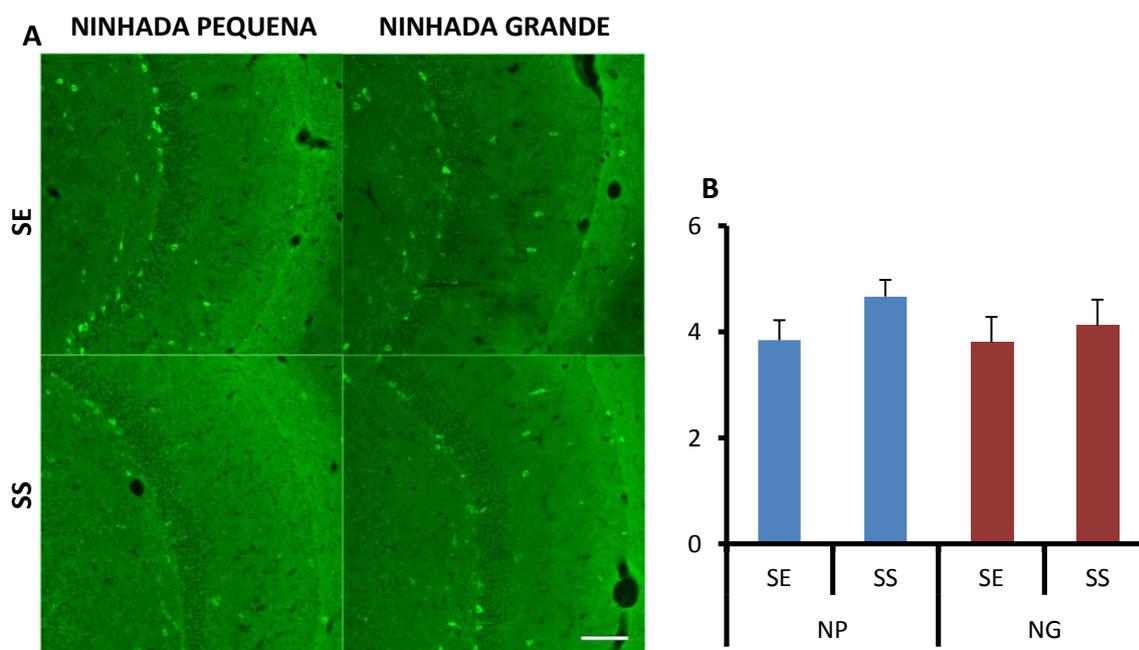


Figura 54. Quantificações das células reelina positivas na camada molecular do giro denteado. A) Fotomicrografias representativas das médias do número de células reelina-positivas na camada molecular do giro denteado para cada subgrupo experimental. Escala: 100 $\mu$ m. B) Representação gráfica das médias da quantidade de células reelina-positivas na camada molecular do giro denteado para cada subgrupo experimental.

Na camada polimórfica do giro denteado, o exercício físico exerceu influência significativa sobre o número de células reelina-positivas por amostra ( $F=28.23$ ,  $p<0.0001$ ). Tanto para os animais provenientes de ninhadas grandes como para os de ninhadas pequenas, o exercício físico promoveu um aumento significativo do número

de células reelina-positivas em relação aos animais sedentários criados sob as mesmas condições perinatais (Figura 55).

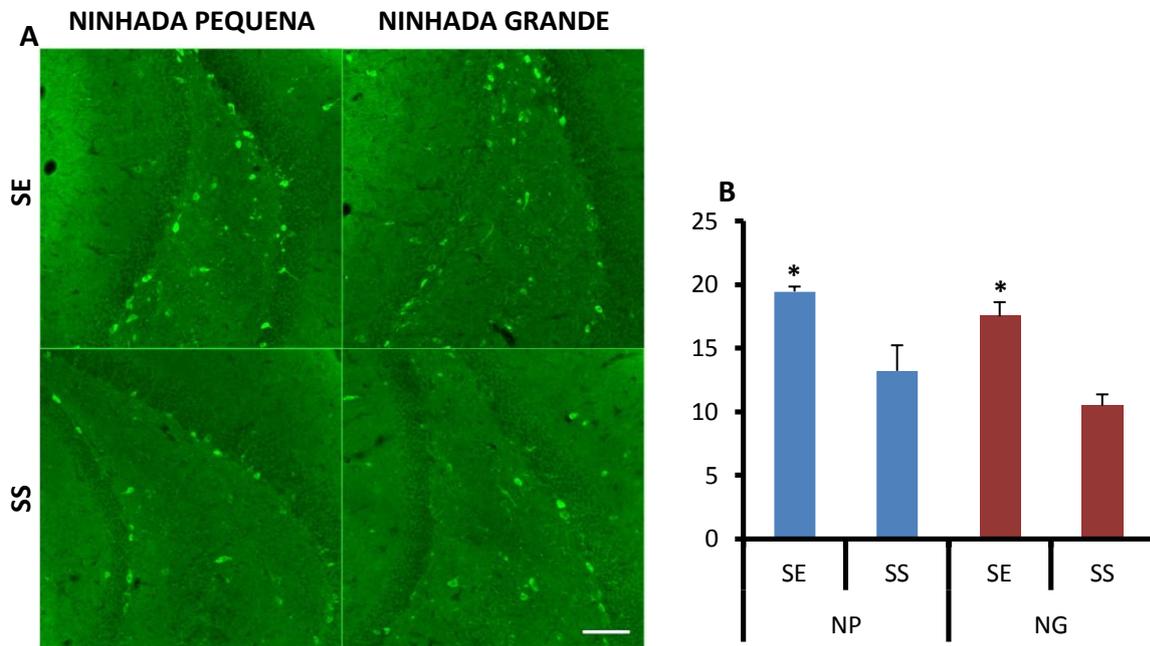


Figura 55. Quantificações das células reelina positivas na camada polimórfica do giro denteado. Fotomicrografias representativas (A) e representação gráfica (B) das médias do número de células reelina-positivas na camada polimórfica do giro denteado para cada subgrupo experimental. Escala: 100 $\mu$ m. \*ANOVA, dois critérios,  $p < 0,01$ .

Em CA1, tanto nos animais provenientes de ninhadas grandes quanto nos de ninhadas pequenas, observamos um aumento significativo do número dessas células nos subgrupos exercitados em relação aos subgrupos sedentários ( $F=16.29$ ,  $p=0,0011$ ).

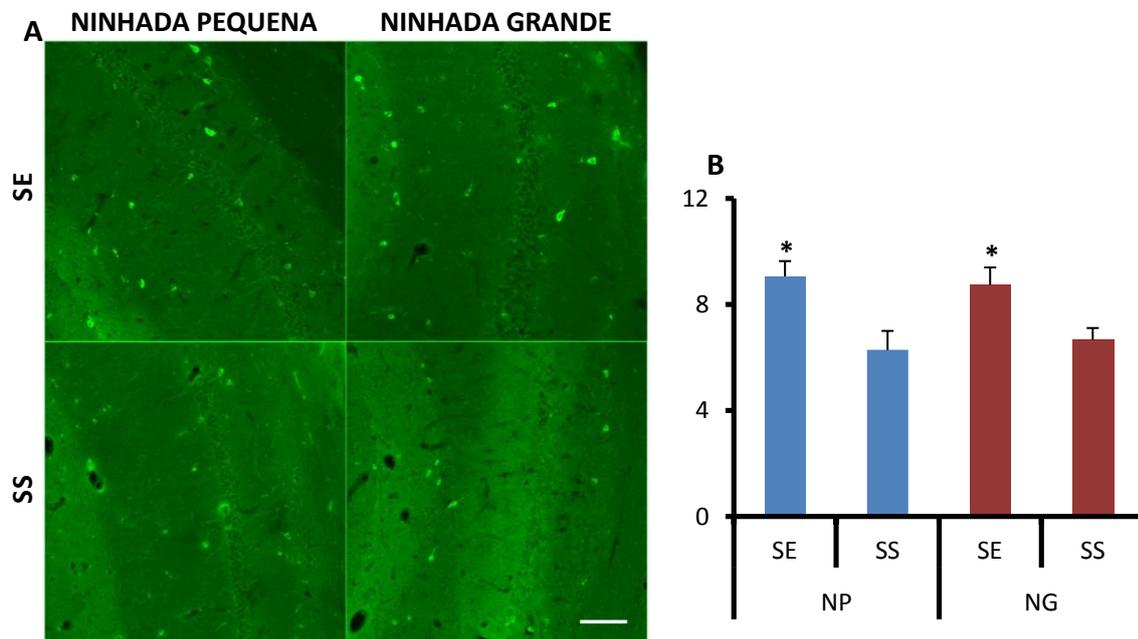


Figura 56. Quantificações das células reelina positivas na região de CA1. Fotomicrografias representativas (A) e representação gráfica (B) das médias do número de células reelina-positivas na região de CA1 para cada subgrupo experimental. Escala: 100 $\mu$ m. \*ANOVA, dois critérios,  $p < 0,01$ .

## IV. DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos as influências do tamanho da ninhada, do exercício físico em diferentes janelas temporais e do envelhecimento sobre diferentes células gliais e elementos da matriz extracelular, e suas possíveis associações à alterações comportamentais em testes hipocampo-dependentes bem como com os padrões difusionais do espaço extracelular no hipocampo.

O tamanho da ninhada afetou a quantidade de cuidado materno recebido pelos animais, alterando o padrão de proliferação e a morfologia microglial na idade adulta e no envelhecimento. Alterou também o número e área de astrócitos e de células NG2-positivas influenciando os padrões difusionais do espaço extracelular. O exercício físico em diferentes janelas temporais exerceu influência sobre todos os padrões citados anteriormente incluindo ainda o número de células reelina positivas. O aumento do tamanho da ninhada e o envelhecimento reduziram o desempenho cognitivo em testes de reconhecimento espacial e de objeto, e esses efeitos foram reduzidos pelo exercício físico.

### *1- Tamanho da ninhada, crescimento e maturação somática.*

A manipulação do tamanho da ninhada utilizada no presente trabalho baseou-se no protocolo de Celedon e colaboradores (Celedon et al, 1979) e já utilizado em estudos anteriores (Picanço-Diniz et al, 1998; Borba et al, 2000; Rocha-de-Melo et al, 2004; Maia et al, 2006; Viana et al, 2007) com uma adaptação a fim de reduzir o número de filhotes das ninhadas grandes para 12 evitando assim o desenvolvimento de um quadro de subnutrição.

No presente estudo, os animais criados nos grupos de ninhadas grandes tiveram uma taxa de filhotes por nutriz de 12:1, enquanto os grupos de ninhadas pequenas tiveram uma taxa de 6:1 filhotes por nutriz. O pressuposto é que, em média, uma taxa maior de filhotes por mãe resulta em diversas alterações que podem comprometer o desenvolvimento dos filhotes, como o aumento do nível de competição entre os filhotes

da mesma ninhada (Stockley e Parker, 2002), aumento do nível de estresse (Meaney e Szyf, 2005), redução da quantidade de cuidados maternos individuais recebidos pelos filhotes (Priestnall, 1972), e redução do número de mamadas/quantidade de leite por filhote comparados aos animais criados nos grupos com uma taxa menor de filhotes por mãe (Kounig et al, 2009).

Os pressupostos supracitados parecem ser razoáveis, e corroboram os dados observados na primeira e segunda fases do presente estudo com relação ao peso corporal dos animais. Em ambas as fases, observamos diferenças significativas nos pesos corporais entre as ninhadas até o 30º dia de vida pós-natal, fase crítica para o estabelecimento da circuitaria neural (Dobbing e Sands, 1979). Nos grupos experimentais da primeira fase do presente estudo, essa diferença desaparece no 90º dia, porém reaparece na próxima janela temporal observada. Na segunda fase, observamos essas diferenças em todas as janelas temporais observadas do período pós-natal.

Em ambas as fases, as diferenças de peso corporal observadas entre as ninhadas grandes e pequenas apresentam uma diferença proporcional mais marcante na infância, até o 30º dia pós-natal, tendo como período mais marcante o 14º dia pós-natal, seguido de uma redução dessa diferença nas fases posteriores. Isso pode estar relacionado ao fato de que, em ratos Wistar, até o 16º dia de vida pós-natal a mãe configura fonte exclusiva de alimentos e estímulos aos filhotes. A partir desse período, os filhotes começam a alimentar-se de alimentos sólidos e deslocar-se mais frequentemente (Whishaw e Kolb, 2004), o que pode contribuir para uma leve recuperação do peso corporal e maturação somática nos animais provenientes das ninhadas maiores.

Ainda, é importante lembrar que o período onde observamos no presente estudo as diferenças mais marcantes com relação ao peso corporal dos animais coincide com o período de hiporresponsividade ao estresse (Vazquez, 1998; Silveira et al, 2007), que consiste em um período de proteção fisiológica aos estímulos estressores, e sua interrupção pode resultar em níveis elevados de corticosteroides, com efeitos catabólicos profundamente deletérios para esta fase, podendo resultar em inibição do crescimento do encéfalo, da neurogênese, da arborização dendrítica e do metabolismo neural (Meaney et al, 1985).

Estudos anteriores demonstraram que a estimulação tátil proveniente da mãe estimula a liberação do hormônio do crescimento (GH) nos filhotes (Schanberg et al,

1984). Filhotes submetidos a períodos de separação materna apresentam níveis elevados de glicocorticóides e reduzidos de GH, e esses efeitos podem ser reduzidos através da mimetização do estímulo táctil proveniente da mãe, com o uso de uma escova (Schanberg et al, 1984).

Apesar das diferenças significativas nos pesos corporais observadas entre os animais de ninhadas grandes e pequenas, uma série de experimentos anteriores demonstraram que o tamanho normal da ninhada para ratos Wistar pode variar entre 1 e 13 filhotes, entretanto sem a ocorrência de subnutrição induzida pelo modelo experimental com uma taxa de 6 ou 12 filhotes por mãe durante o período de lactação (Chahoud e Paumgarten, 2009; Bulfin et al, 2011).

Estudos anteriores (Chahoud e Paumgarten, 2009) demonstraram a existência de três classes de tamanhos naturais de ninhada em ratos Wistar, nas quais apenas pequenas diferenças no crescimento e maturação somática foram detectados: Classe 1, ninhadas de 6, 7 e 8 filhotes (representando 27% de todas as ninhadas); Classe 2, ninhadas com 9 e 10 filhotes (42% de todas as ninhadas); e classe 3, ninhadas com 11 e 12 filhotes (23% de todas as ninhadas). Nosso desenho experimental engloba as classes 1 (6 filhotes por mãe) e 3 (12 filhotes por mãe).

De fato, nosso desenho experimental não objetiva o alcance de diferenças de peso corporal causadas por condições de subnutrição. Isso sugere que as diferenças de cuidado materno induzidas pelo número diferente de filhotes por mãe parecem ser relevantes para os nossos resultados, envolvendo diversos mecanismos ligados a fatores estressores, e não necessariamente nutricionais. É razoável supor pelo conjunto de dados que os filhotes nas ninhadas grandes foram expostos a um menor número de lambidas e cuidados maternos comparados aos de ninhadas pequenas, como foi confirmado nas observações comportamentais realizadas na segunda fase deste estudo.

As diferenças de peso corporal observadas na infância permaneceram significativas nos animais adultos e idosos, corroborando dados anteriores que demonstram que as alterações de cuidados sofridas nas primeiras fases de vida podem gerar alterações no desenvolvimento que permanecem mesmo na vida adulta (Gudsnuk e Champagne, 2011). Estudos anteriores demonstraram que alterações do tamanho da ninhada interferem no padrão de ingestão alimentar do adulto. Esse efeito deve-se à interação de dois fatores principais: a imaturidade dos mecanismos de controle da

ingestão alimentar dos filhotes nas primeiras fases de vida (McMillen et al, 2005) associado ao ajuste inicial da síntese de leite materno em função do número de filhotes (Davidowa e Plagemann, 2001). Em animais provenientes de ninhadas muito pequenas (3 ou 4 filhotes) observa-se a indução de obesidade no adulto resultante desses fatores (Davidowa e Plagemann, 2001).

O exercício físico na fase adulta parece influenciar na recuperação do peso corporal de maneira diferenciada de acordo com a janela temporal. Aos 155 dias de vida pós-natal, o exercício extinguiu as diferenças de peso entre os animais provenientes de ninhadas grandes e pequenas, e podemos observar que esse efeito deve-se à redução do peso corporal dos animais exercitados de ninhadas pequenas. Já durante o envelhecimento (600 dias pós-natais), o efeito inverso foi observado, não havendo diferenças de peso entre os animais sedentários de ninhadas grandes e pequenas, com diferença significativa entre as ninhadas no subgrupo exercitado. Observamos que nessa fase o efeito deve-se ao aumento de peso corporal dos animais exercitados provenientes de ninhadas pequenas.

Existem alguns possíveis mecanismos que podem estar implicados nas alterações de peso observadas nos animais adultos e idosos e alteradas pelo exercício de maneiras diferentes: em primeiro lugar podemos citar a inegável relação entre o padrão de amamentação no período perinatal e as repercussões na vida adulta, como já citamos. McMillen e colaboradores (McMillen et al, 2005) demonstraram que o rato neonato não exerce controle sobre a ingestão de leite durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, confirmando achados anteriores (Haupt e Epstein, 1973), e que as quantidades ingeridas nesse período regulam o comportamento alimentar do animal na vida adulta (Plagemann et al, 1998).

As diferenças relacionadas aos níveis de estresse induzidos por alterações no tamanho da ninhada e ao padrão de responsividade ao mesmo, resultante dessa exposição, são fatores importantes no controle do peso corporal do animal adulto, bem como na responsividade ao exercício físico. Alterações no padrão de secreção de cortisol, para mais ou para menos, implicam em alterações de peso, envolvendo outras vias de sinalização neuroendócrina, estando relacionadas até mesmo com a obesidade no adulto (Bjorntorp e Rosmond, 2000; Daubenmier et al, 2013). Nos animais adultos verificamos um efeito de perda de peso induzida pelo exercício, observada apenas nos

animais provenientes de ninhadas pequenas. A não efetividade do exercício físico nos animais provenientes de ninhadas grandes pode estar relacionada à alterações na secreção de cortisol induzida pelas condições perinatais adversas, como já sugerido anteriormente (Ader e Grota, 1969; Meaney et al, 1993; Meaney et al, 1993; Davidowa e Plagemann, 2004; Meaney e Szyf, 2005). Entretanto, se os níveis de glicocorticóides desses animais encontram-se elevados ou se a quantidade de estresse provocado pelo aumento do tamanho da ninhada foi suficiente para induzir resposta diminuída ao cortisol por carga alostática (Badanes et al, 2011), é uma questão que demanda futuras investigações.

Nos animais idosos de ninhadas pequenas, nos quais o exercício físico induziu um aumento de peso, dentre os fatores já sugeridos, não podemos descartar o fato que esse resultado pode estar ligado à ação já bem documentada do exercício físico na recuperação da sarcopenia característica do envelhecimento (Freiberger et al, 2011; Pasini et al, 2012; Watanabe et al, 2013). É consenso que a prática de exercícios regulares predominantemente aeróbios leva a alterações na composição corporal com aumento da mobilização dos estoques lipídicos em prol da preservação da massa magra (Oscari e Holloszy, 1969; Silveira et al, 2008). Todavia, como não foram realizadas medidas a fim de aferir a composição corporal desses animais, sugerimos em estudos posteriores a verificação da composição de massa magra e gorda utilizando o mesmo protocolo.

Ainda, o exercício parece ser mais efetivo na regulação do peso corporal nos animais provenientes de ninhadas pequenas. Achados anteriores indicam que o tamanho da ninhada pode influenciar a efetividade do exercício nos animais adultos (Nery et al, 2011), o que pode estar ligado à alterações metabólicas induzidas pelas condições perinatais diferentes. Todavia, no presente estudo não foram realizadas medidas envolvendo marcadores metabólicos ou mensuração da composição corporal, que nos permitam afirmar ou refutar tal hipótese, havendo necessidade de estudos posteriores a fim de elucidar tais questões. Apesar de existirem diversas evidências para tais alterações induzidas por alterações perinatais em animais provenientes de ninhadas muito pequenas (Bassett e Craig, 1988; Plagemann et al, 1999; Davidowa e Plagemann, 2001; Davidowa et al, 2003), não existem estudos correlacionando aumento do tamanho da ninhada e alterações metabólicas no adulto.

## ***2- Tamanho da ninhada e alterações no cuidado materno.***

As observações comportamentais das fêmeas cuidadoras de ninhadas grandes e pequenas revelaram uma diferença na quantidade de cuidados maternos relacionados ao tamanho da ninhada, analisados aqui de acordo com o protocolo descrito por Meaney e colaboradores (Meaney, 2001), que considera a frequência dos comportamentos de lambidas para a classificação entre mães muito e pouco cuidadoras. Os resultados demonstraram que tais comportamentos exibem uma distribuição normal não bimodal, quando analisamos os resultados de ambos os grupos em um grande conjunto, com as fêmeas muito e pouco cuidadoras representando dois extremos de um contínuo (Champagne et al, 2001).

Ao analisarmos os dois grupos, observamos que existe uma diferença significativa não somente entre a quantidade de lambidas, mas também na ocorrência de filhotes fora do ninho. Estes resultados corroboram os achados de Grotta e colaboradores (Grotta e Ader, 1969; Grotta e Ader, 1969; Grotta, 1973) de que o comportamento de cuidados da fêmea pode ser influenciado pelo tamanho da ninhada, sendo melhores cuidadoras as ratas com ninhadas pequenas. Um dos fatores que pode explicar tal diferença é a demanda energética aumentada nas mães que amamentam um número maior de filhotes. De acordo com Priestnall (Priestnall, 1972), essas fêmeas demandam maior parte de seu tempo fora do ninho alimentando-se a fim de atender às exigências nutricionais que uma ninhada maior demanda.

No presente estudo, as fêmeas que apresentaram maior frequência de cuidados (classificadas como muito cuidadoras) estavam com as ninhadas pequenas, e vice-versa. Assim, ao selecionar fêmeas que se dedicam ao comportamento de lambida que está 1 desvio padrão abaixo ou acima da média de corte é possível comparar grupos de proles que experimentaram uma diferença de 2 a 3 vezes no cuidado materno, sem contar a divisão dos cuidados pela quantidade de filhotes, tendo as ninhadas grandes o dobro do número de indivíduos das ninhadas pequenas. Mesmo em estudos empregando diferentes tamanhos de ninhada nos quais não foram detectadas diferenças significativas no comportamento de cuidado das mães, a quantidade de cuidados individuais recebidos por filhote foi significativamente reduzido nas ninhadas maiores (Dimitsantos et al, 2007).

Na segunda fase do presente estudo, foram utilizadas 14 ninhadas, tendo sido 3 delas excluídas da amostra por razão da mortalidade de filhotes, sendo todas elas ninhadas grandes, o que confirma achados anteriores que afirmam que em ninhadas grandes o nível de competição pelas tetas é aumentado, podendo ser fatal em alguns casos (Cameron, 1973; Stockley e Parker, 2002).

### ***3- Tamanho da ninhada, envelhecimento, exercício e desempenho cognitivo.***

Os testes de desempenho cognitivo hipocampo-dependentes realizados no presente estudo demonstraram que o tamanho da ninhada, o exercício físico e o envelhecimento afetam a capacidade de reconhecimento espacial e de reconhecimento de objetos. O envelhecimento prejudicou tanto a memória espacial quanto a de reconhecimento da identidade dos objetos, entretanto o exercício parece agir como fator de recuperação desses danos, sendo efetivo apenas nos animais provenientes de ninhadas pequenas. O estilo de vida sedentário afetou ambas as memórias principalmente nos animais de ninhadas grandes ainda na idade adulta.

Os achados previamente relatados reforçam os dados já bem elucidados na literatura que demonstram a característica perda cognitiva relacionada ao envelhecimento (Foster et al, 2012; Friedman, 2013; Jellinger e Attems, 2013). Porém, é importante atentar para o fato que apesar do declínio cognitivo ser um fator fortemente ligado ao envelhecimento, prejuízos significativos no aprendizado e memória não são inevitáveis ou estritamente ligados à idade cronológica, havendo uma marcante variabilidade produzida especialmente por fatores ambientais (van Praag et al, 2000; Bredy et al, 2004).

O exercício físico moderado tem sido vastamente relatado como fator ambiental com alta capacidade neuroprotetora (Anderson et al, 2000; Aguiar et al, 2011; Dornbos e Ding, 2012; Marques-Aleixo et al, 2012). Evidências provenientes de estudos tanto em animais quanto em humanos apoiam o papel do exercício físico na proteção dos aspectos metabólicos, estruturais e funcionais do encéfalo e na preservação do desempenho cognitivo durante o envelhecimento, aparentemente em um padrão dose-dependente (Gomez-Pinilla e Hillman, 2013; Kirk-Sanchez e McGough, 2014).

O tamanho da ninhada foi outro fator importante para as diferenças no desempenho cognitivo observadas no presente estudo. Estudos anteriores obtiveram resultados similares induzidos por alterações perinatais relacionadas ao cuidado materno no desempenho cognitivo, com recuperação parcial induzida por enriquecimento ambiental e exercício físico (Bredy et al, 2003; Bredy et al, 2004; Viana et al, 2007). Ainda, uma das principais consequências do aumento do tamanho da ninhada e redução do cuidado materno é a alteração dos níveis de estresse com consequente influência nas funções do eixo HPA e no padrão de expressão dos rGCs.

Evidências indicam que o estresse orchestra o funcionamento de múltiplos sistemas de memória no encéfalo. Em particular, estudos em modelos humanos e animais demonstram que o estresse facilita a memória de procedimentos, dependente do estriado dorsal em detrimento da memória "cognitiva" dependente do hipocampo (Lozano et al, 2013; Schwabe, 2013). Além de ser uma estrutura encefálica particularmente vulnerável ao processo de envelhecimento, o hipocampo é um alvo primário para os glicocorticóides. Foi demonstrado que a exposição prolongada a níveis elevados de glicocorticóides comprometem os padrões eletrofisiológicos, a estrutura e a função do hipocampo (Myers et al, 2013; Schoenfeld e Gould, 2013). Yau e Seckl (Yau e Seckl, 2012) demonstraram uma correlação entre o aumento dos níveis sanguíneos de glicocorticóides e prejuízo de memória espacial durante o envelhecimento. Assim, podemos sugerir que os prejuízos cognitivos observados nos animais idosos e provenientes de ninhadas grandes neste estudo podem estar relacionados à ação diferenciada dos sistemas de resposta ao estresse induzidos pelas condições perinatais adversas e pelo envelhecimento.

#### ***4- Tamanho da ninhada, envelhecimento, exercício e desempenho cognitivo: correlações com alterações microgliais.***

Análises consideráveis têm explorado os efeitos epigenéticos do cuidado materno sobre os filhotes. Muito desse trabalho foi desenvolvido pioneiramente pelo grupo de Michael J. Meaney (Meaney e Szyf, 2005), que demonstraram que o comportamento materno nas primeiras semanas de vida apresentam profundos efeitos

epigenéticos nos genes que regulam o eixo HPA. Tem sido demonstrado também que a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação da micróglia é fortemente influenciada por hormônios tireoidianos durante o desenvolvimento pós-natal (Lima et al, 2001). Os glicocorticóides exercem profunda influência nas células microgliais ao longo da vida (Nichols et al, 2005; Li et al, 2007), e existem evidências de que o tamanho da ninhada afeta os níveis de corticosterona (Rodel et al, 2010).

Estudos empregando análise da densidade óptica da imunoreatividade para IBA-1 no giro denteado de gerbos (*Meriones unguiculatus*) adultos (mas não idosos), submetidos ou não a estresse por imobilização, demonstraram que, comparados aos controles, os animais estressados mostraram diferenças significativas na morfologia do giro denteado, além disso, essas diferenças estavam associadas a níveis elevados de corticosterona nos animais estressados em relação ao grupo controle (Park et al, 2011). Tomando em conjunto esses resultados, é razoável propor que a micróglia pode sofrer alterações em função do tamanho da ninhada. Como não foram realizadas medidas dos perfis hormonais no presente estudo, fica aberta a questão de as alterações que observamos estão conectadas ou não ao estresse pós-natal.

Tem sido sugerido também que o tamanho da ninhada pode afetar o desenvolvimento das interações sociais entre os filhotes nas primeiras fases de vida, o que pode levar a uma variedade de mudanças permanentes na ansiedade, comportamentos de exploração de novidade, e adaptação a situações estressoras, que não podem ser explicadas direta e exclusivamente pelas diferenças no cuidado materno (Dimitsantos et al, 2007). Contudo, as contribuições relativas da redução do cuidado materno e interações entre os filhotes necessitam ser quantificadas, e até o momento não existem determinações indicando se essas variáveis interagem para afetar a cognição e emocionalidade na vida adulta.

Até o momento, não foram publicados outros estudos que investiguem o impacto do tamanho da ninhada sobre o número de micróglia e sua morfologia nas fases adulta e de envelhecimento. No presente trabalho demonstramos um efeito vigoroso e de longa duração do tamanho da ninhada sobre a distribuição laminar e a morfologia da micróglia no giro denteado de ratos jovens e idosos. A ocorrência da redistribuição laminar da micróglia parece estar principalmente associada ao tamanho da ninhada e ao envelhecimento, e o exercício parece reduzir a ocorrência dessas modificações.

Estudos anteriores demonstraram que a redução do cuidado materno interfere com a resposta imune inata na fase adulta e no envelhecimento devido ao *imprinting*, que causa alterações permanentes no sistema imune da prole (Barja-Fidalgo et al, 2003; Silva et al, 2010). É provável que, em ninhadas grandes, o desenvolvimento encefálico está associado a mudanças permanentes no sistema imune inato no encéfalo, com um impacto significativo na homeostase nos animais idosos.

As estimativas estereológicas do presente trabalho revelaram um aumento significativo no número de micróglia em todas as camadas do giro denteado nos animais idosos e esse efeito foi mais pronunciado nos animais provenientes de ninhadas grandes, corroborando estudos previamente realizados em camundongos (Mouton et al, 2002; Lei et al, 2003; Kohman et al, 2012). Outros autores encontraram resultados discrepantes aos observados em nossos experimentos. De acordo com Mouton e colaboradores, esse efeito do envelhecimento parece ser influenciado pelo gênero, com um aumento do número de micróglia no giro denteado somente nos camundongos fêmeas (Mouton et al, 2002). VanGuilder e colaboradores (VanGuilder et al, 2011), por sua vez, demonstraram utilizando procedimentos não estereológicos que não há aumento no número de micróglia no giro denteado de animais idosos. Não temos explicações para essa disparidade entre os resultados dos autores e os que observamos em nosso laboratório, todavia pode ser possível que procedimentos distintos de quantificação celular, grau de imunomarcção e ambiguidades na definição dos objetos e limites da área de interesse podem explicar ao menos em parte esses resultados conflitantes. Infelizmente não existem estimativas estereológicas disponíveis para a quantidade de micróglia no rato idoso que possam ser comparadas com nossos achados. Há a necessidade ainda de ser estabelecido se existe uma correlação direta entre o tamanho da ninhada, efeitos relacionados à idade na plasticidade do giro denteado e mudanças no número de micróglia e na sua morfologia.

Em condições homeostáticas, a micróglia em diferentes regiões do sistema nervoso central exibe morfologia tipicamente ramificada que as distinguem dos macrófagos teciduais (Ransohoff e Perry, 2009). Entretanto, foi previamente demonstrado que, mesmo na ausência de doença neurológica, fenótipos altamente reativos de astrócitos e micróglia são expressos durante o envelhecimento como parte de um perfil pró-inflamatório elevado e persistente (Ogura et al, 1994; Godbout e Johnson, 2009). Mudanças fisiológicas microgliais relacionadas à idade incluem alteração na

produção de citocinas (Ye e Johnson, 2001; Sierra et al, 2007), na ativação de marcadores de expressão (Perry et al, 1993; Kullberg et al, 2001) e morfologia distrófica (Streit et al, 2004). Em adição, as interações neurônio-micróglia durante o envelhecimento parece ser desregulado, com uma perda concomitante de fatores derivados dos neurônios que controlam a ativação microglial (Jurgens e Johnson, 2012). Entretanto, uma indução marcante do perfil microglial pró-inflamatório relacionada à idade no hipocampo e no giro denteado não está necessariamente associada com déficit cognitivo (VanGuilder et al, 2011). Além disso, esses perfis no giro denteado são encontrados mais frequentemente em indivíduos sedentários que em indivíduos fisicamente ativos (Kohman et al, 2012).

Mais recentemente tem sido demonstrado que as mudanças morfológicas microgliais parecem ser dinamicamente influenciadas por sinais extracelulares como o ATP e quimiocinas provenientes de outras células vizinhas (Davalos et al, 2005; Liang et al, 2009). Essas influências mediadas via ATP extracelular, liberadas em resposta à neurotransmissão glutamatérgica é feita através de hemicanais panexina sensíveis à probenecida (Fontainhas et al, 2011) e o envelhecimento parece afetar esse comportamento dinâmico microglial (Damani et al, 2011). No presente estudo quantificamos uma série de alterações morfométricas microgliais que parecem ser afetadas tanto pelo tamanho da ninhada quanto pelo envelhecimento e muitas dessas mudanças aqui observadas podem ser encontradas descritas em estudos anteriores aqui citados. Por exemplo, encontramos um aumento no número de protrusões (estruturas semelhantes a espinhas dendríticas) e espessamento de ramos nas células microgliais de indivíduos idosos provenientes de ninhadas grandes comparados aos outros grupos. Entretanto, pelo fato de não termos realizado medidas de sinais extracelulares como ATP ou quimiocinas torna-se difícil estabelecer uma correlação direta entre nossos achados e essas vias de sinalização extracelular. Torna-se difícil também associar diretamente as alterações microgliais aos prejuízos de memória.

Todavia, tem sido demonstrado também que o exercício age atenuando a proliferação microglial e aumenta a expressão de um fenótipo proneurogênico no hipocampo e no giro denteado (Kohman et al, 2012). Em concordância com esses achados, não observamos no presente estudo disfunção cognitiva nos animais exercitados, com exceção dos animais idosos das ninhadas grandes, nos quais o exercício não atenuou o declínio na memória espacial. Um número elevado de

micróglia foi observado em todas as camadas do giro denteado nesse grupo (idosos de ninhadas grandes) comparado aos animais exercitados de mesma faixa de idade. Por não termos realizado medidas de mediadores inflamatórios ou marcadores de superfície para a distinção fenotípica, permanece a necessidade de investigações complementares para elucidar a presença ou não de dois fenótipos microgliais no giro denteado desses indivíduos, e se os animais exercitados apresentam ou não predominância do fenótipo proneurogênico.

Nossos achados demonstram que somente os animais adultos das ninhadas pequenas e os animais exercitados mantiveram preservada a memória de reconhecimento de objeto, bem como obtiveram valores reduzidos nas estimativas da quantidade de micróglia e perfis morfológicos microgliais mais distantes daqueles descritos para a micróglia ativada, para revisão ver (Sarma et al, 2013). Esses resultados sugerem que, como já previamente descrito em camundongos (Kohman et al, 2012), existem dois fenótipos da micróglia (pró-neurogênico e pró-inflamatório) no giro denteado dos ratos Wistar. Assim, os animais adultos jovens provenientes de ninhadas pequenas e os animais exercitados podem ter exibido os efeitos dominantes do fenótipo pró-neurogênico, o que poderia explicar o desempenho superior comparado aos outros grupos no teste de reconhecimento de objeto. Além disso, pesquisas anteriores desenvolvidas em nosso laboratório demonstraram que gaiolas padrão de laboratório proporcionam um ambiente empobrecido que induz a prejuízos na memória espacial de ratos adultos e idosos criados em condições sedentárias (Diniz et al, 2010).

Dados anteriores revelam que animais idosos criados em condições semelhantes apresentaram perdas tanto na memória espacial (Long et al, 2009; Bergado et al, 2011) quanto na memória de reconhecimento de objeto (Platano et al, 2008). Consistentemente com essa visão, tem sido demonstrado que o ambiente enriquecido e a atividade física reduzem o número de micróglia, sugerindo que a homeostase microglial pode ser também modulada por alterações funcionais dependentes de atividade (Ehninger et al, 2011; Kohman et al, 2012). Há ainda evidências que apontam para uma indução de tolerância a situações agressivas e estressantes pelo treinamento físico, através da ativação de mecanismos adaptativos do sistema imune (Leandro et al, 2007).

Os mecanismos que associam o tamanho da ninhada às alterações microgliais e ao declínio cognitivo ainda necessitam ser determinados. A sobrevivência microglial é governada por duas moléculas-chave: fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor) e fator estimulante de colônias de macrófagos 1 (M-CSF-1: macrophage colony-stimulating factor 1). Camundongos osteopetróticos (op/op), que apresentam deficiência de M-CSF-1, têm sido alvo de estudos nesse campo por possuírem cerca de 24% menos células microgliais no córtex cerebral comparados aos animais controle, entretanto, possuem morfologia microglial relativamente normal (Kondo e Duncan, 2009). Após injúria, a microgliose apresenta-se significativamente inibida no animal M-CSF-1 deficiente comparado aos animais controle, e a morfologia microglial modifica-se para um perfil de micróglia ativada tanto nos animais mutantes quanto nos controles (Kondo e Duncan, 2009).

Recentemente, um novo ligante para o receptor M-CSF-1 (M-CSF-1R) foi identificado, chamado IL-34. Esse ligante encontra-se expresso em altos níveis no encéfalo, e em um nível mais baixo em outros tecidos (Burns e Wilks, 2011). Em contraste, o G-CSF controla a produção de células sanguíneas circulantes pela medula óssea. O mesmo tem sido também implicado na modulação de respostas imunes sistêmicas pela inibição de citocinas pró-inflamatórias (Hartung et al, 1998). Interessantemente, estudos têm demonstrado que baixos níveis plasmáticos de G-CSF estão associados a disfunção cognitiva em camundongos transgênicos para Alzheimer (Sanchez-Ramos et al, 2009); além disso, baixos níveis plasmáticos de G-CSF em humanos predizem a conversão de declínio cognitivo moderado para demência característica de Alzheimer (Ray et al, 2007).

Se as alterações morfológicas que descrevemos no presente trabalho estão relacionadas à ativação microglial e/ou a aceleração na diferenciação é uma questão que requer futuras investigações. Em particular, a fim de averiguar se a morfologia alterada está relacionada à ativação microglial, seria interessante investigar a produção de citosinas e expressão de marcadores de ativação, particularmente M-CSF e IL-34 (Wang et al, 2012). Coerentemente com a hipótese de ativação microglial foi anteriormente observada uma redução na expressão de CD11b, um marcador de ativação microglial, no fórnix e no córtex parietal de ratos idosos e uma restauração da morfologia microglial para os padrões encontrados nos animais adultos jovens após a inibição das atividades da colinesterase (ChE) e da monoamina oxidase (MAO), e este efeito

antienvhecimento foi acompanhado da preservação da memória de reconhecimento de objetos (Weinstock et al, 2013). Entretanto permanece desconhecido se o MCSF ou a IL-34 são influenciados pelo tamanho da ninhada ou se o G-CSF apresenta-se reduzido nos animais sedentários, jovens e idosos provenientes de ninhadas grandes. Essas questões necessitam do desenvolvimento de investigações futuras.

#### ***5- Alterações nos parâmetros difusionais do espaço extracelular induzidos pelo tamanho da ninhada e exercício físico.***

Neste estudo observamos diferenças nos parâmetros difusionais da matriz extracelular do giro denteado e de CA1 induzidas por alterações no tamanho da ninhada e pelo exercício físico. As propriedades de difusão no espaço extracelular no encéfalo constituem importantes fatores na determinação da excitabilidade do tecido. O espaço extracelular constitui o microambiente dos neurônios e células gliais e serve como um importante canal de comunicação entre essas células. Alterações no volume, composição e geometria do espaço extracelular aparecem como consequência da atividade neural, alterações homeostáticas de composição iônica e pH, remodelação de elementos da matriz extracelular ou mudanças na morfologia, proliferação e função das células gliais (Sykova e Nicholson, 2008).

A transmissão extrassináptica, mediada pela difusão de substâncias neuroativas pelo espaço extracelular apresenta um importante papel na comunicação a curta e longa distância entre os neurônios e as células gliais. O espalhamento (*spillover*) do glutamato e a comunicação cruzada (*cross-talk*) entre sinapses, nas quais a difusão tem um papel essencial, têm sido descritos na literatura como mecanismos importantes especialmente nos processos de LTP e LTD, e diversas evidências experimentais para sua importância foram encontradas no hipocampo (Kullmann et al, 1996; Kullmann e Asztely, 1998; Stafford et al, 2010; Chalifoux e Carter, 2011).

Diversos autores demonstraram que os parâmetros difusionais do espaço extracelular não são estáveis, sendo significativamente alterados em estados patológicos, como inflamação, desmielinização, anóxia ou isquemia, ou mesmo em estados fisiológicos, como durante o desenvolvimento, envelhecimento, atividade neural

e lactação (Nicholson e Phillips, 1981; McBain et al, 1990; Mazel et al, 1998; Sykova et al, 1998; Sykova e Chvatal, 2000; Hrabitova e Nicholson, 2007). Atualmente, entretanto, não existem estudos correlacionando os efeitos do tamanho da ninhada e da atividade física sobre os padrões difusionais no encéfalo.

Muitos dos estudos realizados no intuito de verificar alterações nos parâmetros de difusão no encéfalo utilizam métodos que permitem somente a estimativa de mudanças relativas no volume do espaço extracelular, como o imageamento por ressonância magnética (DW-MRI: *diffusion-weighted magnetic resonance imaging*) ou imageamento óptico integrativo (IOI) (Sykova e Nicholson, 2008). Atualmente, o método RTI-TMA é o único método que permite a determinação dos valores absolutos de tortuosidade e fração de volume extracelular, bem como suas alterações dinâmicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Sykova, 1997; Sykova e Nicholson, 2008).

É fato já esclarecido que em certas estruturas, de acordo com as propriedades citoarquitetônicas e de matriz extracelular, as barreiras difusionais podem canalizar a migração de moléculas, o que facilita a difusão em uma direção em particular, gerando uma anisotropia tecidual (Mazel et al, 1998). O aparecimento e desaparecimento de anisotropia pode acontecer em alguns tecidos e reflete um padrão persistente de plasticidade e remodelação tecidual, e.g. mielinização durante o desenvolvimento ou perda da organização característica dos processos astrocíticos no hipocampo durante o envelhecimento (Sykova et al, 1998; Sykova, 2004). No presente trabalho, as medidas dos parâmetros difusionais na matriz extracelular não indicaram a presença de anisotropia no giro denteado ou no estrato radiado de CA1.

Diferentemente do que observamos aqui, em estudos *in vivo* das medidas dos parâmetros de difusão do espaço extracelular do hipocampo, utilizando ratos Wistar, Mazel e colaboradores observaram um padrão de difusão anisotrópico no hipocampo, sendo esta anisotropia mais pronunciada em CA1 que em CA3 e no giro denteado (Mazel et al, 1998). Esses estudos, entretanto, estão em discordância com estudos anteriores que demonstram valores diferentes de fração de volume extracelular, especialmente em CA1 (McBain et al, 1990; Perez-Pinzon et al, 1995). Outro fator que pode explicar essa discordância entre os resultados relaciona-se à posição dos eletrodos utilizada no referido estudo, que os localizou nas camadas dorsais de CA1 (alveus, stratum oriens e stratum pyramidale). É importante lembrar também que as técnicas *in*

*in vivo* apresentam algumas desvantagens incluindo a influência de anestésicos e a localização imprecisa do eletrodo, havendo uma margem de erro considerável com relação à profundidade de penetração em estruturas em particular, havendo a necessidade de se levar em consideração a possível influência de barreiras que separam o corpo caloso de CA1 e CA1 do giro denteado. De fato, os autores relatam a exclusão de algumas medidas da amostra, em particular no eixo z, nas quais foram observados altíssimos valores ilógicos de tortuosidade. Uma suposição simples para tal evento provém do entendimento que os parâmetros difusionais devem ser considerados como médias das concentrações da substância sobre a área que separa as pontas da micropipeta e do microeletrodo. Nesses casos, pode-se supor que os valores altíssimos de tortuosidade são um resultado do posicionamento da micropipeta iontoforética no corpo caloso e do microeletrodo em CA1 (Mazel et al, 1998).

Outras medidas de difusão realizadas através de DW-MRI revelaram anisotropia em outras regiões hipocâmpais (Pereira et al, 2013; Zhang et al, 2014), entretanto, esse método, que mensura o coeficiente de difusão aparente da água, não faz distinções entre os compartimentos intra- e extracelular, e a correlação entre os métodos não é uma tarefa simples. Enquanto o método RTI-TMA mede os parâmetros geométricos e de viscosidade do espaço extracelular, o método DW-MRI mede o coeficiente de difusão global no tecido, logo, esses estudos não podem servir de base para a confirmação da anisotropia no espaço extracelular.

Entretanto, em outras pesquisas empregando o método RTI-TMA, Hrabětová (Hrabetova, 2005) não detectou anisotropia em CA1, tendo realizado medidas similares às que desenvolvemos, no estrato radiado de CA1 de ratos, e encontrado valores de tortuosidade e fração de volume extracelular semelhantes aos observados em nossos estudos ( $\lambda$ : 1.45,  $\alpha$ : 0.24). Outros estudos (Sykova et al, 2005) desenvolvidos em camundongos confirmaram valores similares de  $\alpha$  e  $\lambda$  na região de CA1. Não existem dados disponíveis na literatura para comparação dos valores aqui encontrados nas medidas no giro denteado, uma vez que este é o primeiro ensaio utilizando o método RTI-TMA para medidas de difusão *in vitro* nesta região em ratos. Um resumo dos valores observados em estudos anteriores no hipocampo utilizando este método pode ser visto no quadro 9.

REGIÃO	ESPÉCIE	IDADE	PREP.	°C	$\alpha$	$\lambda$	REFS
CA1	rato	adulto	in vivo	37	0.21 - 0.22	(1.46, 1.61, 1.76)*	(Mazel et al, 1998); (Sykova et al, 1998)
CA1 str. pyr.	rato	adulto	in vitro	31-35	0.12 - 0.14	1.50 - 1.67	(McBain et al, 1990); (Perez-Pinzon et al, 1995)
CA1 str. rad.	rato	adulto	in vitro	31-35	0.13	1.71	(McBain et al, 1990)
CA1 str. rad.	rato	adulto	in vitro	34	0.24	1.45	(Hrabetova, 2005)
GD	rato	adulto	in vivo	37	0.20 - 0.22	(1.50, 1.62, 1.71)*	(Mazel et al, 1998); (Sykova et al, 1998)
CA1, DG	rato	Idoso	in vivo	37	0.18 - 0.20	(1.52, 1.56, 1.69)*	(Sykova et al, 2002); (Sykova et al, 1998)
CA1	cam.	5-9m	in vivo	37	0.17	1.57	(Sykova et al, 2005)

Quadro 9. Medidas de difusão realizadas em outros estudos utilizando o método RTI-TMA em tecido normal. GD: giro denteado; \* tortuosidade anisotrópica ( $\lambda_x$ ,  $\lambda_y$ ,  $\lambda_z$ ). Adaptado de (Sykova e Nicholson, 2008).

A fração de volume extracelular foi significativamente afetada pelo exercício e a tortuosidade foi afetada pelo exercício físico e pelo tamanho da ninhada. As alterações aqui observadas acerca do número e morfologia das células microgliais em animais submetidos às mesmas condições (Viana et al, 2013) e as verificações realizadas através da morfometria confocal nesses animais suportam tais achados, com aumento similar da área dos astrócitos nos animais exercitados provenientes de ninhadas pequenas. Alterações morfológicas, bem como na quantidade de células são fatores que afetam a tortuosidade do tecido (Rusakov e Kullmann, 1998; Chen e Nicholson, 2000; Tao et al, 2005). Sabe-se que os astrócitos, por serem células de grande porte, influenciam dramaticamente os parâmetros difusionais no encéfalo, especialmente a tortuosidade (Simonova et al, 1996; Roitbak e Sykova, 1999; Anderova et al, 2011).

O aumento no número de células reelin-positivas observadas nos grupos exercitados sugere um melhor padrão de migração e organização celular no tecido desses animais, o que pode também contribuir para os parâmetros difusionais observados (Frotscher, 2010).

## ***6- Tamanho da ninhada e exercício físico: Alterações gliais e de matriz extracelular detectadas por microscopia confocal.***

Um aumento na área dos astrócitos nos animais exercitados provenientes de ninhadas pequenas foi detectado em CA1 e na camada polimórfica do giro denteado, sendo essas medidas realizadas em secções imunomarcadas para GFAP. Essas diferenças de área reforçam nossos achados acerca dos parâmetros difusionais, sendo observada uma relação direta entre as alterações de área dos astrócitos e mudanças na fração de volume extracelular e tortuosidade. Estudos anteriores demonstraram um aumento na expressão de GFAP no hipocampo de ratos como consequência do exercício (Saur et al, 2014). De Senna e colaboradores (de Senna et al, 2011) demonstraram, em animais diabéticos, que o exercício físico auxiliou na manutenção dos níveis de expressão de GFAP, que foram encontrados reduzidos nos animais diabéticos sedentários em relação aos animais controle. Não existem relatos na literatura acerca dos efeitos do tamanho da ninhada sobre a expressão de GFAP ou proliferação de astrócitos.

As diferenças de área foram acompanhadas por um aumento no número de astrócitos na camada polimórfica, mas não em CA1. Isso pode sugerir que em CA1 o efeito do aumento da área pode ser devido a alterações morfológicas nas células, enquanto que na camada polimórfica do giro denteado a proliferação celular explica tal evento. Como não realizamos análises morfométricas nessas células, essas alterações podem simplesmente ser sugeridas, havendo necessidade de averiguações futuras a fim de verificar tais hipóteses. Todavia, foi demonstrado anteriormente que o exercício físico induz aumento de proliferação dos astrócitos (Li et al, 2005; Saur et al, 2013). Saur e colaboradores observaram também alterações morfológicas nos astrócitos induzidas pelo exercício, com aumento no grau de ramificação e no comprimento dos processos astrocíticos (Saur et al, 2014).

Resultados distintos foram encontrados por Bernardi e colaboradores (Bernardi et al, 2013), que observaram uma redução na expressão de GFAP e aumento na atividade da enzima glutamina sintetase em animais treinados em esteira, porém, medidas plasmáticas de corticosterona realizados no mesmo estudo revelaram níveis elevados nesse grupo podendo ser os responsáveis por tais alterações. Estudos

anteriores demonstraram efeitos da corticosterona sobre astrócitos, com redução do número de astrócitos por mecanismos envolvendo apoptose e redução da proliferação dos mesmos (Yu et al, 2011; Unemura et al, 2012; Anacker et al, 2013; Guo et al, 2013). Os glicocorticóides agem como reguladores de transcrição nos astrócitos (Carter et al, 2012). É importante considerar ainda que o exercício em esteira, diferentemente do exercício voluntário, pode se apresentar como um fator estressor para o animal (Cook et al, 2013; Greenwood et al, 2013).

O fato de que o exercício promoveu um aumento na área e número dos astrócitos somente nos animais provenientes de ninhadas pequenas pode sugerir mais uma vez que o efeito diferenciado do exercício de acordo com o tamanho da ninhada relaciona-se à diferente susceptibilidade aos níveis de glicocorticóides induzida pelas condições perinatais. Animais que recebem cuidado materno reduzido tendem a ser mais sensíveis a fatores estressores que animais que receberam muito ou adequado cuidado materno (Caldji et al, 1998; Meaney, 2001; Fish et al, 2004; Enthoven et al, 2008). A realização de medidas dos níveis de corticosterona nesses grupos torna-se uma proposição interessante para futuras investigações.

Nossos dados demonstraram alterações astrocíticas promovidas pelo exercício físico. Não obstante, devemos considerar que quantificações utilizando imunomarcagem por GFAP fornecem apenas estimativas aproximadas, uma vez que os filamentos intermediários não estendem-se por toda a extensão dos processos celulares. Esse fator tem efeito dramático sobre as medidas de volume das células, tendo sido essa a razão pela qual apenas realizamos mensurações das áreas de superfície imunomarcadas nas secções.

A área ocupada pelas células NG2-positivas nas amostras estudadas apresentou diferenças significativas entre os grupos, induzidas pelo tamanho da ninhada no giro denteado e em CA1. Os animais criados em ninhadas grandes e mantidos sob condição de sedentarismo apresentaram uma área significativamente maior ocupada por estas células que os animais dos demais grupos experimentais. As contagens do número de células NG2-positivas revelaram um aumento significativo do número dessas células somente em CA1, com aumento significativo da quantidade de células observada nos animais sedentários das ninhadas grandes em relação aos das ninhadas pequenas.

As células NG2-positivas, que diferenciam-se em oligodendrócitos durante o desenvolvimento, no encéfalo adulto apresentam-se como células mais complexas, com grande potencial de reatividade aos danos teciduais (Nishiyama et al, 2002; Nishiyama, 2007). Apesar de serem amplamente descritas como células precursoras de oligodendrócitos, no adulto, é bastante provável que as funções das células NG2 sejam bastante amplas e distintas. Tem sido sugerido que no período pós-natal essas células diferenciam-se em um novo tipo de célula glial funcionalmente diverso dos astrócitos, da micróglia e dos oligodendrócitos maduros, e podem apresentar-se como um tipo celular altamente reativo (Greenwood e Butt, 2003; Nishiyama, 2007), estando provavelmente envolvidas em mecanismos de reparo. Richardson e colaboradores observaram que, em cultura, as células NG2 positivas podem reverter a um estado multipotente, servindo como precursoras para diversos tipos gliais, podendo agir como reguladoras da plasticidade neural (Richardson et al, 2011).

Entretanto, Gao e colaboradores (Gao et al, 2010) demonstraram que a expressão da condroitina sulfato NG2 está envolvida na resposta inflamatória da micróglia ativada através da mediação da indução da iNOS e expressão de citocinas inflamatórias. Esses achados sugerem uma possível relação entre as alterações observadas nas células NG2 e nossos resultados da primeira fase deste trabalho, onde observamos um aumento da proliferação microglial nos animais criados em ninhadas grandes e mantidos sedentários, bem como diferenças morfológicas na micróglia desses animais que sugerem um diferenciado padrão de ativação quando comparados com os animais criados em ninhadas pequenas e exercitados (Viana et al, 2013).

Recentemente, Klaissle e colaboradores (Klaissle et al, 2012) observaram, em modelos experimentais da doença de Parkinson, que o exercício físico induziu um aumento do nível de expressão de NG2 na substância negra, porém através de mecanismo dependente dos níveis de dopamina. Não existem dados na literatura correlacionando exercício físico ou tamanho da ninhada e expressão de NG2 no hipocampo. Entretanto, tomando esses dados conjuntamente podemos sugerir que o aumento de expressão de NG2 observado nos grupos provenientes de ninhadas grandes e mantidos sob condições sedentárias pode estar relacionado às alterações microgliais observadas em animais mantidos sob as mesmas condições, podendo ainda, por conta de suas funções como células progenitoras, estar envolvidas em mecanismos de recuperação de danos provocados por tais condições ambientais. Todavia, os

mecanismos regulatórios que governam a proliferação e as funções das células NG2-positivas no encéfalo maduro permanecem desconhecidos, e a persistência numerosa dessas células no encéfalo adulto levanta questões que ainda necessitam ampla investigação acerca de sua identidade e suas relações com outros tipos celulares.

Finalmente, observamos um aumento significativo no número de células reelina positivas induzidas pelo exercício físico, independentemente do tamanho da ninhada. A reelina está implicada nos mecanismos neuroprotetores associados ao exercício físico, de acordo com resultados descritos em estudos anteriores (Kim et al, 2013; Yin et al, 2013). Considerando o papel da reelina em mecanismos envolvendo a plasticidade sináptica e a organização da citoarquitetura de diversas áreas encefálicas, o aumento da expressão de reelina em consequência da atividade física parece desencadear mecanismos pelos quais o exercício físico pode recuperar efeitos causados por fatores estressogênicos sobre a neurogênese, a plasticidade sináptica e o desempenho cognitivo (Lussier et al, 2011).

Alterações na citoarquitetura hipocampal estão relacionadas à deficiência de reelina, acarretando o desenvolvimento de distúrbios cognitivos na idade adulta e durante o envelhecimento (Stranahan et al, 2011; Rideau Batista Novais et al, 2013). Reforçando tais achados, a suplementação de reelina *in vivo* aumenta a plasticidade sináptica, aumentando a densidade de espinhas sinápticas, aumento da LTP hipocampal e melhora no desempenho em testes de memória espacial e associativos (Rogers et al, 2011). Seo e colaboradores demonstraram que o exercício em esteira é acompanhado do aumento da expressão de reelina no hipocampo de ratos autistas, com aumento da neurogênese e melhora do desempenho em testes comportamentais (Seo et al, 2013). Esses dados podem ser relacionados aos efeitos do exercício físico sobre os resultados dos testes comportamentais descritos na primeira fase deste trabalho, e corroboram os aumentos aqui observados na quantidade de células reelina-positivas nos animais submetidos ao exercício físico em esteira.

Apesar de não termos observado diferenças no número de células reelina-positivas induzidas pelo tamanho da ninhada, dados na literatura demonstram que filhotes criados com mães muito cuidadoras apresentaram aumento da expressão de reelina comparados aos filhotes criados com mães pouco cuidadoras, e essas alterações estão associadas a alterações morfológicas nos neurônios piramidais do córtex

somatosensorial (Smit-Rigter et al, 2009). Aparentemente, existe uma relação entre os níveis de ocitocina e de reelina no desenvolvimento pós-natal que podem também estar implicados na ligação entre cuidado materno e alterações dos níveis de reelina (Pappas e Carter, 2008). Déficits na expressão de reelina estão relacionados à vulnerabilidade aos efeitos depressogênicos da corticosterona, com efeitos dose-dependentes sobre os comportamentos depressivos, redução da expressão de reelina e da neurogênese hipocampal (Lussier et al, 2011; Lussier et al, 2013).

Em animais submetidos a separação materna, Zhang e colaboradores observaram uma redução da expressão de reelina no hipocampo durante o desenvolvimento (Zhang et al, 2013), todavia, no 90º dia pós-natal os mesmos autores verificaram que os níveis de reelina no hipocampo estavam aumentados, sugerindo que os efeitos da separação maternal sobre a expressão da reelina são dependentes da idade, o que nos induz a assumir a possibilidade de não termos observado tais diferenças entre nossos grupos em consequência da janela temporal na qual as amostras foram processadas. Entretanto, estudos posteriores correlacionando os níveis de cuidado materno às medidas plasmáticas de glicocorticóides e expressão de reelina em diferentes janelas temporais seriam necessários para elucidar tais questões.

### ***7- Limitações técnicas.***

É difícil estimar o número de objetos em secções histológicas através de métodos estereológicos, devido a ambiguidades na definição e áreas de interesse (Mouton et al, 2002). A fim de reduzir essas fontes de erro em potencial, para as comparações dos grupos experimentais do presente estudo, todas as amostras foram processadas utilizando o mesmo protocolo, e todos os dados foram coletados e analisados utilizando o mesmo método estereológico, o mesmo software e hardware. As amostras submetidas a morfometria confocal foram sondadas sob as mesmas condições de iluminação, abertura confocal e intensidade do laser. Para as secções imunomarcadas para GFAP é importante lembrar que essa marcação é limitada aos ramos primários e secundários, logo as medidas de área dos astrócitos aqui realizadas são aproximações

das medidas reais, e os processos terciários e quaternários são importantes na formação de barreiras difusionais adicionais, influenciando o aumento da tortuosidade.

A fim de detectar possíveis variações de critérios de identificação dos objetos de interesse, foram realizados procedimentos de checagem através da realização de contagens das mesmas secções (mesmas regiões, reagidas pelos mesmos procedimentos com o mesmo marcador) por diferentes investigadores com comparações posteriores dos resultados. Como resultado, fomos capazes de reduzir a níveis aceitáveis as possíveis variações associadas a fontes não-biológicas. Por outro lado, reconstruções tridimensionais com auxílio de microscópio podem ser afetadas por fatores mecânicos associados a procedimentos de secção em vibrátomo, o que pode induzir uma retração não uniforme do tecido especialmente no eixo ortogonal z da secção (Hosseini-Sharifabad e Nyengaard, 2007). Esta última observação é válida para todos os procedimentos morfométricos utilizados no presente estudo. Assim, estimativas de modificações nas dimensões x e y durante o processamento tecidual não podem ser extrapoladas para a dimensão z de forma linear. Estas restrições metodológicas impõem limitações que devem ser consideradas quando da interpretação dos resultados do presente trabalho.

Uma questão importante a ser considerada é se os indivíduos submetidos a uma condição em particular pertenciam à mesma ninhada ou a ninhadas diferentes. Como previamente descrito na seção Material e Métodos, animais provenientes de 4 a seis ninhadas, nascidas no mesmo dia, foram primeiramente misturados em um grande grupo com 40 a 72 filhotes, de onde foram selecionados preferencialmente os filhotes do sexo masculino, que foram distribuídos de forma randômica entre as mães para formar as ninhadas grandes e pequenas que compõem o estudo. Por causa da seleção e distribuição randômica dos filhotes por mãe é razoável assumir que todas as ninhadas podem apresentar uma mistura de irmãos e não irmãos, minimizando a possibilidade de aumento artificial do valor F causado pelo desempenho característico de filhotes de uma mesma ninhada nos testes comportamentais. Finalmente, a plasticidade microglial, a proliferação astrocítica e a expressão de reelina podem ser afetadas por corticosteroides (Nichols, 1999; Sugama et al, 2012; Guo et al, 2013; Lussier et al, 2013). No presente estudo, poderíamos argumentar que o estresse induzido pela manipulação durante os testes comportamentais podem ter alterado os níveis plasmáticos de corticosteroides, podendo contribuir para a alteração do número de micróglia, astrócitos e células

reelina-positivas. Embora todos os animais tenham sido submetidos aos mesmos procedimentos, não foram realizadas medidas dos níveis plasmáticos de corticosteroides em nenhuma janela temporal, portanto não podemos excluir a possibilidade de que diferentes níveis plasmáticos de corticosteroides possam ter contribuído para nossas observações.

A utilização de reconstruções tridimensionais através de microscopia confocal permitem a obtenção de imagens de alta resolução, com algumas limitações especialmente envolvendo o efeito de desbotamento do corante fluorescente, que ocorre quando o mesmo perde permanentemente a propriedade fluorescente por danos fotoquímicos e modificação covalente. A fim de evitar alterações na intensidade de captação do sinal induzida por foto desbotamento, as secções foram imunomarcadas em grupos de secções separadas de forma aleatória, que eram submetidas ao scanner a laser em microscópio confocal dentro de um breve intervalo de tempo, em seguida outro grupo era reagido para o mesmo processo, e assim sucessivamente. No intervalo entre a marcação e o processamento digital, as secções foram mantidas sob total abrigo da luz e sob refrigeração, e todas as secções foram submetidas a um único escaneamento a fim de evitar diferenças induzidas por múltiplas exposições ao laser. Além disso, os corantes AlexaFluor têm sido amplamente utilizados com sucesso para a marcação e processamento de amostras de tecido encefálico, e nas condições aqui descritas é bastante estável contra foto desbotamento (Chvatal et al, 2007; Anderova et al, 2011).

Experimentos *in vitro* carregam a possibilidade de possíveis artefatos resultantes da propensão de algumas áreas hipocampais à anóxia. Entretanto, além de as amostras terem sido seccionadas a uma espessura (400 $\mu$ m) que permite a difusão do oxigênio a partir da solução de perfusão, os valores de  $\alpha$  e  $\lambda$  apresentam alterações características, com redução dramática no valor de  $\alpha$  acompanhado de aumento dramático no valor de  $\lambda$ , o que permite a identificação imediata do evento, descartando a amostra. Existem ainda outros argumentos persuasivos contra tais preocupações. Um número de estudos realizados no córtex tanto *in vivo* (Cserr et al, 1991; Lehmenkuhler et al, 1993; Vorisek e Sykova, 1997) como *in vitro* (Perez-Pinzon et al, 1995) não encontraram diferenças significativas (Sykova e Nicholson, 2008).

## CONCLUSÕES

No presente trabalho demonstramos que alterações no tamanho da ninhada durante o período de lactação seguido por um período de acesso *ad libitum* ao alimento em condições padrão de laboratório e sedentarismo podem ter um efeito significativo sobre a população de células microgliais, sua morfologia e distribuição laminar bem como sobre a área de superfície ocupada por astrócitos, células NG2-positivas e sobre a expressão de reelina em ratos adultos. Essas alterações estão refletidas diretamente nos padrões difusionais do espaço extracelular, alterando a fração de volume extracelular e a tortuosidade, podendo influenciar a difusão de substâncias neuroativas importantes para o funcionamento da circuitaria neural (Sykova e Nicholson, 2008). As alterações microgliais tendem a ser mais marcantes com o advento da senescência, e o exercício parece atenuar tais alterações. Um período relativamente breve de exercícios logo após o desmame, na idade adulta ou no envelhecimento influenciam esses efeitos sobre a micróglia de forma diferenciada de acordo com a janela temporal. O exercício reduz a disfunção cognitiva associada ao aumento do tamanho da ninhada, atenua a proliferação microglial, aumenta a área de superfície ocupada por astrócitos e a expressão de reelina no hipocampo. Sugerimos que ao menos em parte a disfunção cognitiva observada nos animais sedentários pode estar relacionada às alterações difusionais e nos perfis gliais e de matriz extracelular aqui observados. Os fatores celulares e moleculares que contribuem para as alterações nos números e fenótipos gliais e sua influência no desenvolvimento da memória ainda necessitam ser estabelecidos. A comparação de nossos dados com dados obtidos através de estudos em humanos e animais acerca dos padrões nutricionais perinatais e desenvolvimento cognitivo (Laus et al, 2011; Lutter e Lutter, 2012), podem auxiliar na elucidação da importância do controle do tamanho da ninhada em estudos envolvendo células neurais e gliais e variáveis comportamentais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ader, R.Grota, L. J. (1969). "Effects of early experience on adrenocortical reactivity " Physiology & Behavior **4**(3): 303-305.

Ader, R.Grota, L. J. (1970). "Rhythmicity in the maternal behaviour of *Rattus norvegicus*." Anim Behav **18**(1): 144-150.

Aggarwal, N. T., Wilson, R. S., et al (2014). "Perceived stress and change in cognitive function among adults 65 years and older." Psychosom Med **76**(1): 80-85.

Aguiar, A. S., Jr., Castro, A. A., et al (2011). "Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling." Mech Ageing Dev **132**(11-12): 560-567.

Aguiar, P., Sousa, M., et al (2013). "Versatile morphometric analysis and visualization of the three-dimensional structure of neurons." Neuroinformatics **11**(4): 393-403.

Allen, N. J.Barres, B. A. (2009). "Neuroscience: Glia - more than just brain glue." Nature **457**(7230): 675-677.

Alvarez-Lopez, M. J., Castro-Freire, M., et al (2013). "Long-term exercise modulates hippocampal gene expression in senescent female mice." J Alzheimers Dis **33**(4): 1177-1190.

Anacker, C., Cattaneo, A., et al (2013). "Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis." Neuropsychopharmacology **38**(5): 872-883.

Anderova, M., Vorisek, I., et al (2011). "Cell death/proliferation and alterations in glial morphology contribute to changes in diffusivity in the rat hippocampus after hypoxia-ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **31**(3): 894-907.

Anderson, B. J., Alcantara, A. A., et al (1996). "Motor-skill learning: changes in synaptic organization of the rat cerebellar cortex." Neurobiol Learn Mem **66**(2): 221-229.

Anderson, B. J., Eckburg, P. B., et al (2002). "Alterations in the thickness of motor cortical subregions after motor-skill learning and exercise." Learn Mem **9**(1): 1-9.

Anderson, B. J., Li, X., et al (1994). "Glial hypertrophy is associated with synaptogenesis following motor-skill learning, but not with angiogenesis following exercise." Glia **11**(1): 73-80.

Anderson, B. J., Rapp, D. N., et al (2000). "Exercise influences spatial learning in the radial arm maze." Physiol Behav **70**(5): 425-429.

- Andrews, M. H., Kostaki, A., et al (2004). "Developmental regulation of the 5-HT7 serotonin receptor and transcription factor NGFI-A in the fetal guinea-pig limbic system: influence of GCs." J Physiol **555**(Pt 3): 659-670.
- Angulo, M. C., Kozlov, A. S., et al (2004). "Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus." J Neurosci **24**(31): 6920-6927.
- Antonucci, F., Turola, E., et al (2012). "Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism." EMBO J.
- Araque, A., Parpura, V., et al (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." Trends Neurosci **22**(5): 208-215.
- Araujo, J. A., Studzinski, C. M., et al (2005). "Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(3): 411-422.
- Archer, T. (2011). "Effects of exogenous agents on brain development: stress, abuse and therapeutic compounds." CNS Neurosci Ther **17**(5): 470-489.
- Auld, D. S., Robitaille, R. (2003). "Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function." Neuron **40**(2): 389-400.
- Azevedo, E. P., Ledo, J. H., et al (2013). "Activated microglia mediate synapse loss and short-term memory deficits in a mouse model of transthyretin-related oculoleptomeningeal amyloidosis." Cell Death Dis **4**: e789.
- Badanes, L. S., Watamura, S. E., et al (2011). "Hypocortisolism as a potential marker of allostatic load in children: associations with family risk and internalizing disorders." Dev Psychopathol **23**(3): 881-896.
- Baek, S. B., Bahn, G., et al (2011). "The phosphodiesterase type-5 inhibitor, tadalafil, improves depressive symptoms, ameliorates memory impairment, as well as suppresses apoptosis and enhances cell proliferation in the hippocampus of maternal-separated rat pups." Neurosci Lett **488**(1): 26-30.
- Baek, S. S., Jun, T. W., et al (2012). "Effects of postnatal treadmill exercise on apoptotic neuronal cell death and cell proliferation of maternal-separated rat pups." Brain Dev **34**(1): 45-56.
- Bagot, R. C., van Hasselt, F. N., et al (2009). "Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus." Neurobiol Learn Mem **92**(3): 292-300.
- Baig, S., Wilcock, G. K., et al (2005). "Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **110**(4): 393-401.
- Barili, P., De Carolis, G., et al (1998). "Sensitivity to ageing of the limbic dopaminergic system: a review." Mech Ageing Dev **106**(1-2): 57-92.

Barja-Fidalgo, C., Souza, E. P., et al (2003). "Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid." Inflamm Res **52**(11): 470-476.

Bassett, D. R. Craig, B. W. (1988). "Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats." J Appl Physiol (1985) **64**(3): 1249-1256.

Baxter, M. G., Frick, K. M., et al (1999). "Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status." Neuroscience **89**(3): 771-779.

Beauquis, J., Pavia, P., et al (2013). "Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease." Exp Neurol **239**: 28-37.

Ben Menachem-Zidon, O., Avital, A., et al (2011). "Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling." Brain Behav Immun **25**(5): 1008-1016.

Bender, R. A., Zhou, L., et al (2010). "Roles of 17 $\beta$ -estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the dentate gyrus." Cereb Cortex **20**(12): 2985-2995.

Bergado, J. A., Almaguer, W., et al (2011). "Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral-statistical analysis." Neuroscience **172**: 256-269.

Bergles, D. E., Roberts, J. D., et al (2000). "Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus." Nature **405**(6783): 187-191.

Bernardi, C., Tramontina, A. C., et al (2013). "Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats." Neural Plast **2013**: 709732.

Beynon, S. B. Walker, F. R. (2012). "Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology." Neuroscience.

Biber, K., Neumann, H., et al (2007). "Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia." Trends Neurosci **30**(11): 596-602.

Bilbo, S. D. (2010). "Early-life infection is a vulnerability factor for aging-related glial alterations and cognitive decline." Neurobiol Learn Mem **94**(1): 57-64.

Billiards, S. S., Haynes, R. L., et al (2006). "Development of microglia in the cerebral white matter of the human fetus and infant." J Comp Neurol **497**(2): 199-208.

Birnstiel, S., List, T. J., et al (1995). "Chronic corticosterone treatment maintains synaptic activity of CA1 hippocampal pyramidal cells: acute high corticosterone administration increases action potential number." Synapse **20**(2): 117-124.

Bjorntorp, P. Rosmond, R. (2000). "Obesity and cortisol." Nutrition **16**(10): 924-936.

Black, J. E., Isaacs, K. R., et al (1990). "Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5568-5572.

Blaze, J. Roth, T. L. (2013). "Exposure to caregiver maltreatment alters expression levels of epigenetic regulators in the medial prefrontal cortex." Int J Dev Neurosci **31**(8): 804-810.

Blaze, J., Scheuing, L., et al (2013). "Differential methylation of genes in the medial prefrontal cortex of developing and adult rats following exposure to maltreatment or nurturing care during infancy." Dev Neurosci **35**(4): 306-316.

Blowby, J. (1952). "Maternal care and mental health." World Health Organization Palais des Nations Geneva.

Bogen, I. L., Risa, O., et al (2008). "Distinct changes in neuronal and astrocytic amino acid neurotransmitter metabolism in mice with reduced numbers of synaptic vesicles." J Neurochem **105**(6): 2524-2534.

Bonsall, M. B. Klug, H. (2011). "The evolution of parental care in stochastic environments." J Evol Biol **24**(3): 645-655.

Bonthuis, D. J., McKim, R., et al (2004). "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 **14**(1): 45-57.

Borba, J. M., Araujo, M. S., et al (2000). "Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase-containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition." Brain Res Bull **53**(2): 193-201.

Brady, L. S., Lynn, A. B., et al (1992). "Intrahippocampal colchicine alters hypothalamic corticotropin-releasing hormone and hippocampal steroid receptor mRNA in rat brain." Neuroendocrinology **55**(2): 121-133.

Bredy, T. W., Grant, R. J., et al (2003). "Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat." Eur J Neurosci **18**(10): 2903-2909.

Bredy, T. W., Humpartzoomian, R. A., et al (2003). "Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment." Neuroscience **118**(2): 571-576.

Bredy, T. W., Zhang, T. Y., et al (2004). "Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression." Eur J Neurosci **20**(5): 1355-1362.

Bridges, R. S. (1996). "Biochemical basis of parental behavior in the rat." Adv. Study Behav. **25**: 215-242.

Broer, S. Brookes, N. (2001). "Transfer of glutamine between astrocytes and neurons." J Neurochem **77**(3): 705-719.

Brown, E. S., Rush, A. J., et al (1999). "Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders." Neuropsychopharmacology **21**(4): 474-484.

Bruce-Keller, A. J. (1999). "Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery." J Neurosci Res **58**(1): 191-201.

Buckner, R. L. (2004). "Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate." Neuron **44**(1): 195-208.

Bulfin, L. J., Clarke, M. A., et al (2011). "Anxiety and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychological stress are attenuated in male rats made lean by large litter rearing." Psychoneuroendocrinology **36**(7): 1080-1091.

Buma, P. (1988). "Synaptic and nonsynaptic release of neuromediators in the central nervous system." Acta Morphol Neerl Scand **26**(2-3): 81-113.

Burke, S. N. Barnes, C. A. (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." Nat Rev Neurosci **7**(1): 30-40.

Burns, C. J. Wilks, A. F. (2011). "c-FMS inhibitors: a patent review." Expert Opin Ther Pat **21**(2): 147-165.

Bushong, E. A., Martone, M. E., et al (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." J Neurosci **22**(1): 183-192.

Cabrera, V., Ramos, E., et al (2013). "Lactation reduces glial activation induced by excitotoxicity in the rat hippocampus." J Neuroendocrinol **25**(6): 519-527.

Caldji, C., Tannenbaum, B., et al (1998). "Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5335-5340.

Cameron, G. N. (1973). "Effect of litter size on postnatal growth and survival in the desert woodrat." J Mammal **54**(2): 489-493.

Cantoni, D. Brown, R. E. (1997). "Paternal investment and reproductive success in the California mouse, *Peromyscus californicus*." Anim Behav **54**(2): 377-386.

Carrasco, G. A. Van de Kar, L. D. (2003). "Neuroendocrine pharmacology of stress." Eur J Pharmacol **463**(1-3): 235-272.

Carter, B. S., Meng, F., et al (2012). "Glucocorticoid treatment of astrocytes results in temporally dynamic transcriptome regulation and astrocyte-enriched mRNA changes in vitro." Physiol Genomics **44**(24): 1188-1200.

Celedon, J. M., Santander, M., et al (1979). "Long-term effects of early undernutrition and environmental stimulation on learning performance of adult rats." J Nutr **109**(11): 1880-1886.

Celio, M. R., Spreafico, R., et al (1998). "Perineuronal nets: past and present." Trends Neurosci **21**(12): 510-515.

Cerbai, F., Lana, D., et al (2012). "The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus." PLoS One **7**(9): e45250.

Chae, C. H. Kim, H. T. (2009). "Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats." Neurochem Int **55**(4): 208-213.

Chahoud, I. Paumgarten, F. J. (2009). "Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies?" Environ Res **109**(8): 1021-1027.

Chalifoux, J. R. Carter, A. G. (2011). "Glutamate spillover promotes the generation of NMDA spikes." J Neurosci **31**(45): 16435-16446.

Champagne, D. L., Bagot, R. C., et al (2008). "Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress." J Neurosci **28**(23): 6037-6045.

Champagne, F., Diorio, J., et al (2001). "Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12736-12741.

Champagne, F. A., Francis, D. D., et al (2003). "Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development." Physiol Behav **79**(3): 359-371.

Chang, Y. K., Pan, C. Y., et al (2011). "Effect of Resistance Exercise Training on Cognitive Function in Healthy Older Adults: A Review." J Aging Phys Act.

Charchat-Fichman, H., Caramelli, P., et al (2005). "[Decline of cognitive capacity during aging]." Rev Bras Psiquiatr **27**(1): 79-82.

Chen, K. C., Hoistad, M., et al (2002). "Quantitative dual-probe microdialysis: mathematical model and analysis." J Neurochem **81**(1): 94-107.

Chen, K. C. Nicholson, C. (2000). "Changes in brain cell shape create residual extracellular space volume and explain tortuosity behavior during osmotic challenge." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8306-8311.

- Chen, K. C. Nicholson, C. (2002). "Measurement of diffusion parameters using a sinusoidal iontophoretic source in rat cortex." J Neurosci Methods **122**(1): 97-108.
- Cheng, L., Sun, R. Z., et al (2010). "[Role of reelin signaling pathway in the development of the neocortex]." Sheng Li Ke Xue Jin Zhan **41**(5): 373-375.
- Chepuri, N. B., Yen, Y. F., et al (2002). "Diffusion anisotropy in the corpus callosum." AJNR Am J Neuroradiol **23**(5): 803-808.
- Christopherson, K. S., Ullian, E. M., et al (2005). "Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis." Cell **120**(3): 421-433.
- Chugh, D., Nilsson, P., et al (2013). "Brain inflammation induces post-synaptic changes during early synapse formation in adult-born hippocampal neurons." Exp Neurol **250**: 176-188.
- Chvatal, A., Anderova, M., et al (2007). "Three-dimensional confocal morphometry - a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices." J Anat **210**(6): 671-683.
- Chvatal, A. Sykova, E. (2000). "Glial influence on neuronal signaling." Prog Brain Res **125**: 199-216.
- Conde, J. R. Streit, W. J. (2006). "Microglia in the aging brain." J Neuropathol Exp Neurol **65**(3): 199-203.
- Cook, M. D., Martin, S. A., et al (2013). "Forced treadmill exercise training exacerbates inflammation and causes mortality while voluntary wheel training is protective in a mouse model of colitis." Brain Behav Immun **33**: 46-56.
- Coutellier, L., Friedrich, A. C., et al (2009). "Effects of foraging demand on maternal behaviour and adult offspring anxiety and stress response in C57BL/6 mice." Behav Brain Res **196**(2): 192-199.
- Cserr, H. F., DePasquale, M., et al (1991). "Extracellular volume decreases while cell volume is maintained by ion uptake in rat brain during acute hypernatremia." J Physiol **442**: 277-295.
- Curtis, A. L., Bethea, T., et al (2006). "Sexually dimorphic responses of the brain norepinephrine system to stress and corticotropin-releasing factor." Neuropsychopharmacology **31**(3): 544-554.
- Curtis, A. L., Pavcovich, L. A., et al (1995). "Previous stress alters corticotropin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus." Neuroscience **65**(2): 541-550.
- D'Arcangelo, G. (2005). "Apoer2: a reelin receptor to remember." Neuron **47**(4): 471-473.

Dageville, C., Casagrande, F., et al (2011). "[The mother-infant encounter at birth must be protected]." Arch Pediatr **18**(9): 994-1000.

Damani, M. R., Zhao, L., et al (2011). "Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia." Aging Cell **10**(2): 263-276.

Dang, Y. H., Yan, C. X., et al (2011). "[Epigenetic mechanisms of the influence of maternal care on offspring development]." Yi Chuan **33**(9): 919-924.

Daubenmier, J., Lustig, R. H., et al (2013). "A New biomarker of hedonic eating? A preliminary investigation of cortisol and nausea responses to acute opioid blockade." Appetite.

Davalos, D., Grutzendler, J., et al (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." Nat Neurosci **8**(6): 752-758.

Davidowa, H., Li, Y., et al (2003). "Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats." Eur J Neurosci **18**(3): 613-621.

Davidowa, H., Plagemann, A. (2001). "Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding." Neuroreport **12**(15): 3201-3204.

Davidowa, H., Plagemann, A. (2004). "Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones." Neurosci Lett **371**(1): 64-68.

de Kloet, E. R., Rots, N. Y., et al (1996). "Brain-corticosteroid hormone dialogue: slow and persistent." Cell Mol Neurobiol **16**(3): 345-356.

de Senna, P. N., Ilha, J., et al (2011). "Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats." Metab Brain Dis **26**(4): 269-279.

Dekaban, A. S. (1978). "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights." Ann Neurol **4**(4): 345-356.

Dere, E., Huston, J. P., et al (2005). "Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory." Brain Res Brain Res Protoc **16**(1-3): 10-19.

Dere, E., Huston, J. P., et al (2007). "The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents." Neurosci Biobehav Rev **31**(5): 673-704.

Desgranges, B., Kalpouzos, G., et al (2008). "[Cerebral imaging in healthy aging: contrast with Alzheimer disease]." Rev Neurol (Paris) **164 Suppl 3**: S102-107.

Dickstein, D. L., Kabaso, D., et al (2007). "Changes in the structural complexity of the aged brain." Aging Cell **6**(3): 275-284.

Diers-Fenger, M., Kirchhoff, F., et al (2001). "AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia." Glia **34**(3): 213-228.

Dimitsantos, E., Escorihuela, R. M., et al (2007). "Litter size affects emotionality in adult male rats." Physiol Behav **92**(4): 708-716.

Diniz, D. G., Foro, C. A., et al (2010). "Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes." Eur J Neurosci **32**(3): 509-519.

Diniz, D. G., Foro, C. A. R., et al (2010). "Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes." European Journal of Neuroscience **32**(3): 509-519.

Dityatev, A. Rusakov, D. A. (2011). "Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse." Curr Opin Neurobiol **21**(2): 353-359.

Dityatev, A. Schachner, M. (2003). "Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **4**(6): 456-468.

Diz-Chaves, Y., Pernia, O., et al (2012). "Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice." J Neuroinflammation **9**(1): 71.

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

Dobbing, J. (1974). "The later growth of the brain and its vulnerability." Pediatrics **53**(1): 2-6.

Dobbing, J. Sands, J. (1971). "Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt." Biol Neonate **19**(4): 363-378.

Dobbing, J. Sands, J. (1973). "Quantitative growth and development of human brain." Arch Dis Child **48**(10): 757-767.

Dobbing, J. Sands, J. (1979). "Comparative aspects of the brain growth spurt." Early Hum Dev **3**(1): 79-83.

Doehner, J. Knuesel, I. (2010). "Reelin-mediated Signaling during Normal and Pathological Forms of Aging." Aging Dis **1**(1): 12-29.

Dornbos, D., 3rd Ding, Y. (2012). "Mechanisms of neuronal damage and neuroprotection underlying ischemia/reperfusion injury after physical exercise." Curr Drug Targets **13**(2): 247-262.

Drakew, A., Frotscher, M., et al (1998). "Developmental distribution of a reeler gene-related antigen in the rat hippocampal formation visualized by CR-50 immunocytochemistry." Neuroscience **82**(4): 1079-1086.

Du, F., Yin, L., et al (2010). "Involvement of microglial cells in infrasonic noise-induced stress via upregulated expression of corticotrophin releasing hormone type 1 receptor." Neuroscience **167**(3): 909-919.

Ehninger, D., Wang, L. P., et al (2011). "Enriched environment and physical activity reduce microglia and influence the fate of NG2 cells in the amygdala of adult mice." Cell Tissue Res **345**(1): 69-86.

Engert, V., Efanov, S. I., et al (2010). "Perceived early-life maternal care and the cortisol response to repeated psychosocial stress." J Psychiatry Neurosci **35**(6): 370-377.

Ennaceur, A., Michalikova, S., et al (2005). "Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks." Behav Brain Res **159**(2): 247-266.

Enthoven, L., de Kloet, E. R., et al (2008). "Differential development of stress system (re)activity at weaning dependent on time of disruption of maternal care." Brain Res **1217**: 62-69.

Epstein, H. T. (1978). "The effect of litter size on weight gain in mice." J Nutr **108**(1): 120-123.

Eroglu, C. Barres, B. A. (2010). "Regulation of synaptic connectivity by glia." Nature **468**(7321): 223-231.

Eto, R., Abe, M., et al (2008). "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 **23**(4): 399-409.

Eyo, U. B. Wu, L. J. (2013). "Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain." Neural Plast **2013**: 456857.

Fabel, K., Tam, B., et al (2003). "VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis." Eur J Neurosci **18**(10): 2803-2812.

Fiala, J. C. Harris, K. M. (2001). "Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes." J Am Med Inform Assoc **8**(1): 1-16.

Fields, R. D., Araque, A., et al (2013). "Glial Biology in Learning and Cognition." Neuroscientist.

Fink, G. (2010). "Stress Science: Neuroendocrinology." Academic Press. Elsevier Inc.

- Fish, E. W., Shahrokh, D., et al (2004). "Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care." Ann N Y Acad Sci **1036**: 167-180.
- Fitch, M. T., Silver, J. (1997). "Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration." Cell Tissue Res **290**(2): 379-384.
- Fleming, A. S., Rosenblatt, J. S. (1974). "Maternal behavior in the virgin and lactating rat." J Comp Physiol Psychol **86**(5): 957-972.
- Fontainhas, A. M., Wang, M., et al (2011). "Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission." PLoS One **6**(1): e15973.
- Fontana, D. J., Daniels, S. E., et al (1995). "Ondansetron improves cognitive performance in the Morris water maze spatial navigation task." Psychopharmacology (Berl) **120**(4): 409-417.
- Fordyce, D. E., Farrar, R. P. (1991). "Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning." Behav Brain Res **46**(2): 123-133.
- Fordyce, D. E., Wehner, J. M. (1993). "Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice." Brain Res **619**(1-2): 111-119.
- Forster, E., Bock, H. H., et al (2010). "Emerging topics in Reelin function." Eur J Neurosci **31**(9): 1511-1518.
- Forster, E., Zhao, S., et al (2006). "Laminating the hippocampus." Nat Rev Neurosci **7**(4): 259-267.
- Foster, T. C., Defazio, R. A., et al (2012). "Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models." Front Aging Neurosci **4**: 12.
- Frade, J. M., Barde, Y. A. (1998). "Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina." Neuron **20**(1): 35-41.
- Francis, D., Diorio, J., et al (1999). "Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat." Science **286**(5442): 1155-1158.
- Francis, P. T., Webster, M. T., et al (1993). "Neurotransmitters and second messengers in aging and Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **695**: 19-26.
- Franco, S. J., Muller, U. (2011). "Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system." Dev Neurobiol **71**(11): 889-900.
- Frank, M. G., Baratta, M. V., et al (2007). "Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses." Brain Behav Immun **21**(1): 47-59.

Frank, M. G., Thompson, B. M., et al (2012). "Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses." Brain Behav Immun **26**(2): 337-345.

Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S., et al (2004). "An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia." Lancet Neurol **3**(6): 343-353.

Freeman, M. R. (2010). "Specification and morphogenesis of astrocytes." Science **330**(6005): 774-778.

Freiberger, E., Sieber, C., et al (2011). "Physical activity, exercise, and sarcopenia - future challenges." Wien Med Wochenschr **161**(17-18): 416-425.

Friedman, D. (2013). "The cognitive aging of episodic memory: a view based on the event-related brain potential." Front Behav Neurosci **7**: 111.

Frotscher, M. (2010). "Role for Reelin in stabilizing cortical architecture." Trends Neurosci **33**(9): 407-414.

Galeeva, A., Ordyan, N., et al (2006). "Expression of glucocorticoid receptors in the hippocampal region of the rat brain during postnatal development." J Chem Neuroanat **31**(3): 216-225.

Gao, Q., Lu, J., et al (2010). "NG2, a member of chondroitin sulfate proteoglycans family mediates the inflammatory response of activated microglia." Neuroscience **165**(2): 386-394.

Garcia-Marin, V., Garcia-Lopez, P., et al (2007). "Cajal's contributions to glia research." Trends Neurosci **30**(9): 479-487.

Garcia-Matas, S., Gutierrez-Cuesta, J., et al (2008). "Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity." Aging Cell **7**(5): 630-640.

Gardella, D., Hatton, W. J., et al (2003). "Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections." J Neurosci Methods **124**(1): 45-59.

Garden, G. A. Moller, T. (2006). "Microglia biology in health and disease." J Neuroimmune Pharmacol **1**(2): 127-137.

Ge, W. P., Miyawaki, A., et al (2012). "Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex." Nature **484**(7394): 376-380.

Geinisman, Y., Detolledo-Morrell, L., et al (1995). "Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives." Prog Neurobiol **45**(3): 223-252.

- Gemma, C., Bachstetter, A. D., et al (2010). "Neuron-Microglia Dialogue and Hippocampal Neurogenesis in the Aged Brain." Aging Dis **1**(3): 232-244.
- Genetic\_Science\_Learning\_Center (2014). "Lick Your Rats." Learn.Genetics **11** **January** (<<http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/rats/>> ).
- Gibbs, R. B., Mauk, R., et al (2009). "Donepezil treatment restores the ability of estradiol to enhance cognitive performance in aged rats: evidence for the cholinergic basis of the critical period hypothesis." Horm Behav **56**(1): 73-83.
- Glaser, E. M. Wilson, P. D. (1998). "The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators." J Microsc **192**(Pt 2): 163-171.
- Glaser, J. R. Glaser, E. M. (1990). "Neuron imaging with NeuroLucida--a PC-based system for image combining microscopy." Comput Med Imaging Graph **14**(5): 307-317.
- Glaser, J. R. Glaser, E. M. (2000). "Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts." J Chem Neuroanat **20**(1): 115-126.
- Godbout, J. P. Johnson, R. W. (2009). "Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences." Immunol Allergy Clin North Am **29**(2): 321-337.
- Gomez-Pinilla, F. Hillman, C. (2013). "The influence of exercise on cognitive abilities." Compr Physiol **3**(1): 403-428.
- Gonzalez-Perez, O., Chavez-Casillas, O., et al (2011). "Stress by noise produces differential effects on the proliferation rate of radial astrocytes and survival of neuroblasts in the adult subgranular zone." Neurosci Res **70**(3): 243-250.
- Gonzalez, A. S., Rodriguez Echandia, E. L., et al (1994). "Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats: II. Effects on estrous cycle in females." Physiol Behav **56**(3): 591-595.
- Graeber, M. B. Streit, W. J. (1990). "Microglia: immune network in the CNS." Brain Pathol **1**(1): 2-5.
- Graham, R. K., Ehrnhoefer, D. E., et al (2011). "Caspase-6 and neurodegeneration." Trends Neurosci **34**(12): 646-656.
- Greenwood, B. N., Spence, K. G., et al (2013). "Exercise-induced stress resistance is independent of exercise controllability and the medial prefrontal cortex." Eur J Neurosci **37**(3): 469-478.
- Greenwood, K. Butt, A. M. (2003). "Evidence that perinatal and adult NG2-glia are not conventional oligodendrocyte progenitors and do not depend on axons for their survival." Mol Cell Neurosci **23**(4): 544-558.
- Grota, L. J. (1973). "Effects of litter size, age of young, and parity on foster mother behaviour in *Rattus norvegicus*." Anim Behav **21**(1): 78-82.

- Grota, L. J.Ader, R. (1969). "CONTINUOUS RECORDING OF MATERNAL BEHAVIOUR IN RATTUS NOR VEGICUS " Anim. Behav **17**: 722-729.
- Grota, L. J.Ader, R. (1969). "Effects of litter size on emotionality, adrenocortical reactivity, and susceptibility to gastric erosions in the rat." Psychol Rep **24**(2): 547-549.
- Gudsnuk, K. M.Champagne, F. A. (2011). "Epigenetic effects of early developmental experiences." Clin Perinatol **38**(4): 703-717.
- Gundersen, H. J.Jensen, E. B. (1987). "The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction." J Microsc **147**(Pt 3): 229-263.
- Guo, W. Z., Miao, Y. L., et al (2013). "Midazolam provides cytoprotective effect during corticosterone-induced damages in rat astrocytes by stimulating steroidogenesis." Neurosci Lett **547**: 53-58.
- Guo, Z., Zhang, L., et al (2013). "In Vivo Direct Reprogramming of Reactive Glial Cells into Functional Neurons after Brain Injury and in an Alzheimer's Disease Model." Cell Stem Cell.
- Halassa, M. M., Fellin, T., et al (2007). "The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease." Trends Mol Med **13**(2): 54-63.
- Halassa, M. M., Fellin, T., et al (2007). "Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte." J Neurosci **27**(24): 6473-6477.
- Hartley, R. S., Margulis, M., et al (1999). "Functional synapses are formed between human NTera2 (NT2N, hNT) neurons grown on astrocytes." J Comp Neurol **407**(1): 1-10.
- Hartung, T., von Aulock, S., et al (1998). "Role of granulocyte colony-stimulating factor in infection and inflammation." Med Microbiol Immunol **187**(2): 61-69.
- Hasan, K. M., Gupta, R. K., et al (2005). "Diffusion tensor fractional anisotropy of the normal-appearing seven segments of the corpus callosum in healthy adults and relapsing-remitting multiple sclerosis patients." J Magn Reson Imaging **21**(6): 735-743.
- Hasegawa-Ishii, S., Takei, S., et al (2011). "Morphological impairments in microglia precede age-related neuronal degeneration in senescence-accelerated mice." Neuropathology **31**(1): 20-28.
- Haug, H.Eggers, R. (1991). "Morphometry of the human cortex cerebri and corpus striatum during aging." Neurobiol Aging **12**(4): 336-338; discussion 352-335.
- Haydon, P. G. (2001). "GLIA: listening and talking to the synapse." Nat Rev Neurosci **2**(3): 185-193.
- Hayes, K., Sprague, S., et al (2008). "Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke." Acta Neuropathol **115**(3): 289-296.

Hayes, U. L., De Vries, G. J. (2007). "Role of pregnancy and parturition in induction of maternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*)."  
Horm Behav **51**(2): 265-272.

Hedden, T., Gabrieli, J. D. (2004). "Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience."  
Nat Rev Neurosci **5**(2): 87-96.

Hellstrom, I., Diorio, J., et al (2004). "Ex vivo characterization of maternal programming of stress responses through modulation of the epigenome. ."  
Soc Neurosci Abstr. **662**(11-xx).

Hellstrom, I. C., Dhir, S. K., et al (2012). "Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone-serotonin-NGFI-A signalling cascade."  
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1601): 2495-2510.

Hellwig, S., Hack, I., et al (2011). "Role for Reelin in neurotransmitter release." J Neurosci **31**(7): 2352-2360.

Hertz, L., Gibbs, M. E., et al (1996). "Astrocyte-neuron interaction during one-trial aversive learning in the neonate chick." Neurosci Biobehav Rev **20**(3): 537-551.

Hilbig, H., Bidmon, H. J., et al (2002). "Enriched environmental conditions reverse age-dependent gliosis and losses of neurofilaments and extracellular matrix components but do not alter lipofuscin accumulation in the hindlimb area of the aging rat brain." J Chem Neuroanat **23**(3): 199-209.

Homola, A., Zoremba, N., et al (2006). "Changes in diffusion parameters, energy-related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient hypoxia/ischemia." Neurosci Lett **404**(1-2): 137-142.

Honda, T., Kobayashi, K., et al (2011). "Regulation of cortical neuron migration by the Reelin signaling pathway." Neurochem Res **36**(7): 1270-1279.

Horner, P. J., Thallmair, M., et al (2002). "Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS." J Neurocytol **31**(6-7): 469-480.

Hosseini-Sharifabad, M., Nyengaard, J. R. (2007). "Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus." J Neurosci Methods **162**(1-2): 206-214.

Haupt, K. A., Epstein, A. N. (1973). "Ontogeny of controls of food intake in the rat: GI fill and glucoprivation." Am J Physiol **225**(1): 58-66.

Howard, C., Reed, M. (2005). "Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy."

Hrabetova, S. (2005). "Extracellular diffusion is fast and isotropic in the stratum radiatum of hippocampal CA1 region in rat brain slices." Hippocampus **15**(4): 441-450.

Hrabitova, S.Nicholson, C. (2007). "Biophysical Properties of Brain Extracellular Space Explored with Ion-Selective Microelectrodes, Integrative Optical Imaging and Related Techniques."

Hudson, R., Bautista, A., et al (2011). "The effect of siblings on early development: a potential contributor to personality differences in mammals." Dev Psychobiol **53**(6): 564-574.

Husum, H., Termeer, E., et al (2002). "Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats." Neuropharmacology **42**(6): 798-806.

Hwang, I. K., Yi, S. S., et al (2011). "Effect of treadmill exercise on blood glucose, serum corticosterone levels and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the hippocampus in chronic diabetic rats." Neurochem Res **36**(2): 281-287.

Isaacs, E. B., Fischl, B. R., et al (2010). "Impact of breast milk on intelligence quotient, brain size, and white matter development." Pediatr Res **67**(4): 357-362.

Jankord, R.Herman, J. P. (2008). "Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress." Ann N Y Acad Sci **1148**: 64-73.

Janssen, C. I.Kiliaan, A. J. (2013). "Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration." Prog Lipid Res **53C**: 1-17.

Jellinger, K. A.Attems, J. (2013). "Neuropathological approaches to cerebral aging and neuroplasticity." Dialogues Clin Neurosci **15**(1): 29-43.

Ji, K., Miyauchi, J., et al (2013). "Microglia: An Active Player in the Regulation of Synaptic Activity." Neural Plast **2013**: 627325.

Jiang, L. H., Shi, Y., et al (2008). "The influence of orally administered docosahexaenoic acid on cognitive ability in aged mice." J Nutr Biochem.

Jones, E. V., Cook, D., et al (2012). "A neuron-astrocyte co-culture system to investigate astrocyte-secreted factors in mouse neuronal development." Methods Mol Biol **814**: 341-352.

Jossin, Y., Bar, I., et al (2003). "The reelin signaling pathway: some recent developments." Cereb Cortex **13**(6): 627-633.

Jurgens, H. A.Johnson, R. W. (2012). "Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation." Exp Neurol **233**(1): 40-48.

Kaneko, Y. S., Nakashima, A., et al (2012). "Microglial Activation in Neuroinflammation: Implications for the Etiology of Neurodegeneration." Neurodegener Dis.

- Karadottir, R., Hamilton, N. B., et al (2008). "Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter." Nat Neurosci **11**(4): 450-456.
- Karram, K., Chatterjee, N., et al (2005). "NG2-expressing cells in the nervous system: role of the proteoglycan in migration and glial-neuron interaction." J Anat **207**(6): 735-744.
- Kashon, M. L., Ross, G. W., et al (2004). "Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status." J Alzheimers Dis **6**(6): 595-604; discussion 673-581.
- Katz, H. B. Davies, C. A. (1982). "The effects of early-life undernutrition and subsequent environment on morphological parameters of the rat brain." Behav Brain Res **5**(1): 53-64.
- Keller, J. N. (2006). "Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease." Ageing Res Rev **5**(1): 1-13.
- Kelly, K. A., Miller, D. B., et al (2012). "Chronic Exposure to Corticosterone Enhances the Neuroinflammatory and Neurotoxic Responses to Methamphetamine." J Neurochem.
- Kerchner, G. A., Bernstein, J. D., et al (2013). "Shared vulnerability of two synaptically-connected medial temporal lobe areas to age and cognitive decline: a seven tesla magnetic resonance imaging study." J Neurosci **33**(42): 16666-16672.
- Kerr, A. L. Swain, R. A. (2011). "Rapid cellular genesis and apoptosis: effects of exercise in the adult rat." Behav Neurosci **125**(1): 1-9.
- Kilb, W., Dierkes, P. W., et al (2006). "Hypoosmolar conditions reduce extracellular volume fraction and enhance epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus." J Neurosci Res **84**(1): 119-129.
- Kim, J. E., Shin, M. S., et al (2013). "Treadmill exercise ameliorates motor disturbance through inhibition of apoptosis in the cerebellum of valproic acid-induced autistic rat pups." Mol Med Rep **8**(2): 327-334.
- Kinsley, C. H. Amory-Meyer, E. (2011). "Why the maternal brain?" J Neuroendocrinol **23**(11): 974-983.
- Kirk-Sanchez, N. J. McGough, E. L. (2014). "Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives." Clin Interv Aging **9**: 51-62.
- Klaissle, P., Lesemann, A., et al (2012). "Physical activity and environmental enrichment regulate the generation of neural precursors in the adult mouse substantia nigra in a dopamine-dependent manner." BMC Neurosci **13**: 132.
- Kohman, R. A., Deyoung, E. K., et al (2011). "Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice." Brain Behav Immun.

Kohman, R. A., DeYoung, E. K., et al (2012). "Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice." Brain Behav Immun **26**(5): 803-810.

Kondo, Y., Duncan, I. D. (2009). "Selective reduction in microglia density and function in the white matter of colony-stimulating factor-1-deficient mice." J Neurosci Res **87**(12): 2686-2695.

Korn, M. J., Koppel, S. J., et al (2011). "Astrocyte-secreted factors modulate the developmental distribution of inhibitory synapses in nucleus laminaris of the avian auditory brainstem." J Comp Neurol.

Korosi, A., Baram, T. Z. (2010). "Plasticity of the stress response early in life: mechanisms and significance." Dev Psychobiol **52**(7): 661-670.

Korosi, A., Shanabrough, M., et al (2010). "Early-life experience reduces excitation to stress-responsive hypothalamic neurons and reprograms the expression of corticotropin-releasing hormone." J Neurosci **30**(2): 703-713.

Kounig, B., Riester, J., et al (2009). "Maternal care in house mice (*Mus musculus*): II. The energy cost of lactation as a function of litter size." Journal of Zoology **216**(2): 195-210.

Kramer, A. F., Colcombe, S. J., et al (2005). "Fitness, aging and neurocognitive function." Neurobiol Aging **26 Suppl 1**: 124-127.

Kramer, A. F., Hahn, S., et al (1999). "Ageing, fitness and neurocognitive function." Nature **400**(6743): 418-419.

Kramer, J. H., Mungas, D., et al (2007). "Longitudinal MRI and cognitive change in healthy elderly." Neuropsychology **21**(4): 412-418.

Kubinova, L., Janacek, J. (2001). "Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images." Microsc Res Tech **53**(6): 425-435.

Kullberg, S., Aldskogius, H., et al (2001). "Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord." Brain Res **899**(1-2): 169-186.

Kullmann, D. M., Asztely, F. (1998). "Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications." Trends Neurosci **21**(1): 8-14.

Kullmann, D. M., Erdemli, G., et al (1996). "LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spillover." Neuron **17**(3): 461-474.

Kumaresan, P., Anderson, R. R., et al (1967). "Effect of litter size upon milk yield and litter weight gains in rats." Proc. Soc. exp. biol. Med. **126**: 41-45.

Kume-Kick, J., Mazel, T., et al (2002). "Independence of extracellular tortuosity and volume fraction during osmotic challenge in rat neocortex." J Physiol **542**(Pt 2): 515-527.

Lakatosova, S.Ostatnikova, D. (2012). "Reelin and its complex involvement in brain development and function." Int J Biochem Cell Biol **44**(9): 1501-1504.

Landers, M. S.Sullivan, R. M. (2012). "The development and neurobiology of infant attachment and fear." Dev Neurosci **34**(2-3): 101-114.

Lanosa, X. A., Santacrose, I., et al (2011). "Exposure to environmental enrichment prior to a cerebral cortex stab wound attenuates the postlesional astroglia response in rats." Neuron Glia Biol **7**(2-4): 163-175.

Laplante, P., Diorio, J., et al (2002). "Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT7 receptor." Brain Res Dev Brain Res **139**(2): 199-203.

Laus, M. F., Vales, L. D., et al (2011). "Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies." Int J Environ Res Public Health **8**(2): 590-612.

Leandro, C. G., Castro, R. M. d., et al (2007). "Adaptative mechanisms of the immune system in response to physical training." Rev Bras Med Esporte **13**(5): 343 - 348.

LeBlanc, A. C. (2005). "The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death." Curr Alzheimer Res **2**(4): 389-402.

Lee, C. H., Yoo, K. Y., et al (2010). "Neuronal damage is much delayed and microgliosis is more severe in the aged hippocampus induced by transient cerebral ischemia compared to the adult hippocampus." J Neurol Sci **294**(1-2): 1-6.

Leem, Y. H., Lee, Y. I., et al (2011). "Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23." Biochem Biophys Res Commun **406**(3): 359-365.

Leemhuis, J.Bock, H. H. (2011). "Reelin modulates cytoskeletal organization by regulating Rho GTPases." Commun Integr Biol **4**(3): 254-257.

Lehmenkuhler, A., Sykova, E., et al (1993). "Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis." Neuroscience **55**(2): 339-351.

Lei, D. L., Long, J. M., et al (2003). "Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice." Neuroscience **121**(3): 659-666.

Leiderman, P. H.Seashore, M. J. (1975). "Mother-infant neonatal separation: some delayed consequences." Ciba Found Symp(33): 213-239.

Levine, J. M. Nishiyama, A. (1996). "The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells." Perspect Dev Neurobiol **3**(4): 245-259.

Levine, S. (1994). "The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors." Ann N Y Acad Sci **746**: 275-288; discussion 289-293.

Levine, S. (2000). "Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Eur J Pharmacol **405**(1-3): 149-160.

Levine, S. (2001). "Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat." Physiol Behav **73**(3): 255-260.

Levison, S. W. Goldman, J. E. (1993). "Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain." Neuron **10**(2): 201-212.

Levison, S. W., Young, G. M., et al (1999). "Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia." J Neurosci Res **57**(4): 435-446.

Levy, D. A., Bayley, P. J., et al (2004). "The anatomy of semantic knowledge: medial vs. lateral temporal lobe." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6710-6715.

Li, J., Ding, Y. H., et al (2005). "Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise." Neurosci Lett **386**(3): 160-164.

Li, M. Fleming, A. S. (2003). "Differential involvement of nucleus accumbens shell and core subregions in maternal memory in postpartum female rats." Behav Neurosci **117**(3): 426-445.

Li, M., Wang, Y., et al (2007). "Glucocorticoids impair microglia ability to induce T cell proliferation and Th1 polarization." Immunol Lett **109**(2): 129-137.

Li, T., Giaume, C., et al (2014). "Connexins-Mediated Glia Networking Impacts Myelination and Remyelination in the Central Nervous System." Mol Neurobiol.

Liang, K. J., Lee, J. E., et al (2009). "Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(9): 4444-4451.

Liddell, B. J., Paul, R. H., et al (2007). "Rates of decline distinguish Alzheimer's disease and mild cognitive impairment relative to normal aging: integrating cognition and brain function." J Integr Neurosci **6**(1): 141-174.

Lima, F. R., Gervais, A., et al (2001). "Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone." J Neurosci **21**(6): 2028-2038.

Ling, E. A., Ng, Y. K., et al (2001). "Microglia: its development and role as a neuropathology sensor." Prog Brain Res **132**: 61-79.

- Ling, E. A. Wong, W. C. (1993). "The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts." *Glia* **7**(1): 9-18.
- Ling, J. M., Pena, A., et al (2012). "Biomarkers of increased diffusion anisotropy in semi-acute mild traumatic brain injury: a longitudinal perspective." *Brain* **135**(Pt 4): 1281-1292.
- Liu, D., Diorio, J., et al (2000). "Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats." *Nat Neurosci* **3**(8): 799-806.
- Long, J. M., Kalehua, A. N., et al (1998). "Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus." *Neurobiol Aging* **19**(5): 497-503.
- Long, L. H., Liu, R. L., et al (2009). "Age-related synaptic changes in the CA1 stratum radiatum and spatial learning impairment in rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**(7): 675-681.
- Lonstein, J. S. De Vries, G. J. (2000). "Maternal behaviour in lactating rats stimulates c-fos in glutamate decarboxylase-synthesizing neurons of the medial preoptic area, ventral bed nucleus of the stria terminalis, and ventrocaudal periaqueductal gray." *Neuroscience* **100**(3): 557-568.
- Lonstein, J. S., Greco, B., et al (2000). "Maternal behavior stimulates c-fos activity within estrogen receptor alpha-containing neurons in lactating rats." *Neuroendocrinology* **72**(2): 91-101.
- Lozano, Y. R., Serafin, N., et al (2013). "Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory." *Neurobiol Learn Mem* **101**: 55-64.
- Luine, V. Hearn, M. (1990). "Spatial memory deficits in aged rats: contributions of the cholinergic system assessed by ChAT." *Brain Res* **523**(2): 321-324.
- Lupien, S. J. McEwen, B. S. (1997). "The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies." *Brain Res Brain Res Rev* **24**(1): 1-27.
- Lussier, A. L., Lebedeva, K., et al (2013). "The progressive development of depression-like behavior in corticosterone-treated rats is paralleled by slowed granule cell maturation and decreased reelin expression in the adult dentate gyrus." *Neuropharmacology* **71**: 174-183.
- Lussier, A. L., Romay-Tallon, R., et al (2011). "Reelin as a putative vulnerability factor for depression: examining the depressogenic effects of repeated corticosterone in heterozygous reeler mice." *Neuropharmacology* **60**(7-8): 1064-1074.
- Lutter, C. K. Lutter, R. (2012). "Fetal and early childhood undernutrition, mortality, and lifelong health." *Science* **337**(6101): 1495-1499.

- Maia, L. M., Frazao, M. F., et al (2006). "L-arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early-malnourished adult rats." Brain Res **1072**(1): 19-25.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). "Stereological tools in biomedical research." An Acad Bras Cienc **75**(4): 469-486.
- Mandell, A. J., Chapman, L. F., et al (1963). "Plasma Corticosteroids: Changes in Concentration after Stimulation of Hippocampus and Amygdala." Science **139**(3560): 1212.
- Maniam, J., Morris, M. J. (2010). "Voluntary exercise and palatable high-fat diet both improve behavioural profile and stress responses in male rats exposed to early life stress: role of hippocampus." Psychoneuroendocrinology **35**(10): 1553-1564.
- Marin, I., Kipnis, J. (2013). "Learning and memory ... and the immune system." Learn Mem **20**(10): 601-606.
- Marques-Aleixo, I., Oliveira, P. J., et al (2012). "Physical exercise as a possible strategy for brain protection: evidence from mitochondrial-mediated mechanisms." Prog Neurobiol **99**(2): 149-162.
- Matteri, R. L., Carroll, J. A., et al (2000). "The Biology of Animal Stress." CAB International **3**(1): 1-32.
- Mayhew, T. M., Gundersen, H. J. (1996). "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 **188** ( Pt 1): 1-15.
- Mazel, T., Simonova, Z., et al (1998). "Diffusion heterogeneity and anisotropy in rat hippocampus." Neuroreport **9**(7): 1299-1304.
- McBain, C. J., Traynelis, S. F., et al (1990). "Regional variation of extracellular space in the hippocampus." Science **249**(4969): 674-677.
- McEwen, B. S., Sapolsky, R. M. (1995). "Stress and cognitive function." Curr Opin Neurobiol **5**(2): 205-216.
- McEwen, B. S., Weiss, J. M., et al (1968). "Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain." Nature **220**(5170): 911-912.
- McGeer, P. L. (1984). "The 12th J. A. F. Stevenson memorial lecture. Aging, Alzheimer's disease, and the cholinergic system." Can J Physiol Pharmacol **62**(7): 741-754.
- McMillen, I. C., Adam, C. L., et al (2005). "Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system." J Physiol **565**(Pt 1): 9-17.

- Meaney, M. J. (2001). "Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations." Annu Rev Neurosci **24**: 1161-1192.
- Meaney, M. J., Bhatnagar, S., et al (1993). "Molecular basis for the development of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response." Cell Mol Neurobiol **13**(4): 321-347.
- Meaney, M. J., Bhatnagar, S., et al (1993). "Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system." Ann N Y Acad Sci **697**: 70-85.
- Meaney, M. J., Sapolsky, R. M., et al (1985). "The development of the glucocorticoid receptor system in the rat limbic brain. I. Ontogeny and autoregulation." Brain Res **350**(1-2): 159-164.
- Meaney, M. J., Szyf, M. (2005). "Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome." Dialogues Clin Neurosci **7**(2): 103-123.
- Meltzer, C. C., Smith, G., et al (1998). "Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging." Neuropsychopharmacology **18**(6): 407-430.
- Messripour, M., Mesripour, A. (2013). "Age related interaction of dopamine and serotonin synthesis in striatal synaptosomes." Biocell **37**(2): 17-21.
- Meydani, S. N., Wu, D. (2008). "Nutrition and age-associated inflammation: implications for disease prevention." JPEN J Parenter Enteral Nutr **32**(6): 626-629.
- Meyer, U., Nyffeler, M., et al (2006). "The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology." J Neurosci **26**(18): 4752-4762.
- Michaelsen, K. F., Lauritzen, L., et al (2009). "Effects of breast-feeding on cognitive function." Adv Exp Med Biol **639**: 199-215.
- Michel, G. F., Tyler, A. N. (2007). "Can knowledge of developmental processes illuminate the evolution of parental care?" Dev Psychobiol **49**(1): 33-44.
- Middeldorp, J., Hol, E. M. (2011). "GFAP in health and disease." Prog Neurobiol **93**(3): 421-443.
- Mirescu, C., Peters, J. D., et al (2004). "Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress." Nat Neurosci **7**(8): 841-846.
- Moore, C. L., Chadwick-Dias, A. M. (1986). "Behavioral responses of infant rats to maternal licking: variations with age and sex." Dev Psychobiol **19**(5): 427-438.

- Moore, C. L., Morelli, G. A. (1979). "Mother rats interact differently with male and female offspring." J Comp Physiol Psychol **93**(4): 677-684.
- Moore, C. L., Wong, L., et al (1997). "Mother-infant interactions in two strains of rats: implications for dissociating mechanism and function of a maternal pattern." Dev Psychobiol **30**(4): 301-312.
- Mora, F. (2013). "Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle." Dialogues Clin Neurosci **15**(1): 45-52.
- Mora, F., Segovia, G., et al (2007). "Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain." Brain Res Rev **55**(1): 78-88.
- Morgane, P. J., Mokler, D. J., et al (2002). "Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation." Neurosci Biobehav Rev **26**(4): 471-483.
- Moriceau, S., Sullivan, R. M. (2005). "Neurobiology of infant attachment." Dev Psychobiol **47**(3): 230-242.
- Mouton, P. R., Long, J. M., et al (2002). "Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice." Brain Res **956**(1): 30-35.
- Murphy, S. (1993). "Astrocytes. In: Pharmacology and Function." Academic Press Inc., New York.
- Musholt, K., Cirillo, G., et al (2009). "Neonatal separation stress reduces glial fibrillary acidic protein- and S100beta-immunoreactive astrocytes in the rat medial precentral cortex." Dev Neurobiol **69**(4): 203-211.
- Mustafa, N., Ahearn, T. S., et al (2012). "Brain structural complexity and life course cognitive change." Neuroimage **61**(3): 694-701.
- Myers, B., McKlveen, J. M., et al (2013). "Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: Implications for the energetics of stress." Front Neuroendocrinol.
- Nadkarni, S., Jung, P. (2007). "Modeling synaptic transmission of the tripartite synapse." Phys Biol **4**(1): 1-9.
- Nadler, J. V. (2012). "Plasticity of Glutamate Synaptic Mechanisms."
- Namba, T., Mochizuki, H., et al (2005). "The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus." Eur J Neurosci **22**(8): 1928-1941.
- Nassar, M. F., Younis, N. T., et al (2011). "Neuro-developmental outcome and brain-derived neurotrophic factor level in relation to feeding practice in early infancy." Matern Child Nutr **7**(2): 188-197.

- Nery, C. d. S., Pinheiro, I. L., et al (2011). "Murinometric Evaluations and Feed Efficiency in Rats from Reduced Litter During Lactation and Submitted or Not to Swimming Exercise." Rev Bras Med Esporte **17**(1): 49-56.
- Ng, K. T., Gibbs, M. E., et al (1992). "Ion involvement in memory formation: the potential role of astrocytes." Prog Brain Res **94**: 109-115.
- Nichol, K., Deeny, S. P., et al (2009). "Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in APOE epsilon4 mice." Alzheimers Dement **5**(4): 287-294.
- Nichols, N. R. (1999). "Glial responses to steroids as markers of brain aging." J Neurobiol **40**(4): 585-601.
- Nichols, N. R., Agolley, D., et al (2005). "Glucocorticoid regulation of glial responses during hippocampal neurodegeneration and regeneration." Brain Res Brain Res Rev **48**(2): 287-301.
- Nicholson, C. (1985). "Diffusion from an injected volume of a substance in brain tissue with arbitrary volume fraction and tortuosity." Brain Res **333**(2): 325-329.
- Nicholson, C., Phillips, J. M. (1981). "Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum." J Physiol **321**: 225-257.
- Nicholson, C., Phillips, J. M., et al (1979). "Diffusion from an iontophoretic point source in the brain: role of tortuosity and volume fraction." Brain Res **169**(3): 580-584.
- Nicholson, C., Sykova, E. (1998). "Extracellular space structure revealed by diffusion analysis." Trends Neurosci **21**(5): 207-215.
- Niehaus, A., Stegmuller, J., et al (1999). "Cell-surface glycoprotein of oligodendrocyte progenitors involved in migration." J Neurosci **19**(12): 4948-4961.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., et al (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." Science **308**(5726): 1314-1318.
- Nishiyama, A. (2007). "Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS." Neuroscientist **13**(1): 62-76.
- Nishiyama, A., Dahlin, K. J., et al (1991). "The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan." J Cell Biol **114**(2): 359-371.
- Nishiyama, A., Komitova, M., et al (2009). "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity." Nat Rev Neurosci **10**(1): 9-22.
- Nishiyama, A., Watanabe, M., et al (2002). "Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells." J Neurocytol **31**(6-7): 437-455.

- Nishiyama, A., Yang, Z., et al (2005). "Astrocytes and NG2-glia: what's in a name?" J Anat **207**(6): 687-693.
- Niu, S., Yabut, O., et al (2008). "The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons." J Neurosci **28**(41): 10339-10348.
- Nomura, Y., Yamanaka, Y., et al (1996). "Senescence-accelerated mouse. Neurochemical studies on aging." Ann N Y Acad Sci **786**: 410-418.
- Numan, M., Insel, T. R. (2003). "The Neurobiology of Parental Behavior." Springer, Science Jun 11: 1st Edition.
- Nyengaard, J. R., Gundersen, H. J. (2006). "Direct and efficient stereological estimation of total cell quantities using electron microscopy." J Microsc **222**(Pt 3): 182-187.
- Ogura, K., Ogawa, M., et al (1994). "Effects of ageing on microglia in the normal rat brain: immunohistochemical observations." Neuroreport **5**(10): 1224-1226.
- Oitzl, M. S., Workel, J. O., et al (2000). "Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats." Eur J Neurosci **12**(10): 3771-3780.
- Olah, M., Biber, K., et al (2011). "Microglia phenotype diversity." CNS Neurol Disord Drug Targets **10**(1): 108-118.
- Olazabal, D. E., Pereira, M., et al (2013). "New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals." Neurosci Biobehav Rev **37**(8): 1860-1874.
- Oostland, M., van Hooft, J. A. (2013). "The role of serotonin in cerebellar development." Neuroscience **248C**: 201-212.
- Orthmann-Murphy, J. L., Freidin, M., et al (2007). "Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and oligodendrocyte connexins." J Neurosci **27**(51): 13949-13957.
- Oscai, L. B., Holloszy, J. O. (1969). "Effects of weight changes produced by exercise, food restriction, or overeating on body composition." J Clin Invest **48**(11): 2124-2128.
- Ossowska, K. (1993). "Disturbances in neurotransmission processes in aging and age-related diseases." Pol J Pharmacol **45**(2): 109-131.
- Otis, T. S., Sofroniew, M. V. (2008). "Glia get excited." Nat Neurosci **11**(4): 379-380.
- Pappas, G. D., Carter, C. S. (2008). "The Relationship of Oxytocin and Reelin in the Brain." Reelin Glycoprotein **2008**: 217-116.
- Park, J. H., Yoo, K. Y., et al (2011). "Comparison of glucocorticoid receptor and ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity in the adult and aged gerbil hippocampus following repeated restraint stress." Neurochem Res **36**(6): 1037-1045.

- Parkhurst, C. N., Yang, G., et al (2013). "Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor." Cell **155**(7): 1596-1609.
- Pascual, O., Ben Achour, S., et al (2011). "Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Pasini, E., Le Douairon Lahaye, S., et al (2012). "Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats." Exp Gerontol **47**(1): 23-28.
- Pereira, J. B., Valls-Pedret, C., et al (2013). "Regional vulnerability of hippocampal subfields to aging measured by structural and diffusion MRI." Hippocampus.
- Perez-Garcia, C. G., Tissir, F., et al (2004). "Reelin receptors in developing laminated brain structures of mouse and human." Eur J Neurosci **20**(10): 2827-2832.
- Perez-Pinzon, M. A., Tao, L., et al (1995). "Extracellular potassium, volume fraction, and tortuosity in rat hippocampal CA1, CA3, and cortical slices during ischemia." J Neurophysiol **74**(2): 565-573.
- Perry, V. H., Matyszak, M. K., et al (1993). "Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS." Glia **7**(1): 60-67.
- Pertusa, M., Garcia-Matas, S., et al (2008). "Expression of GDNF transgene in astrocytes improves cognitive deficits in aged rats." Neurobiol Aging **29**(9): 1366-1379.
- Peterson, D. A. (1999). "Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures." Methods **18**(4): 493-507.
- Petit-Taboue, M. C., Landeau, B., et al (1998). "Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping." Neuroimage **7**(3): 176-184.
- Pfrieger, F. W., Barres, B. A. (1997). "Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro." Science **277**(5332): 1684-1687.
- Picanço-Diniz, C. W., Araújo, M. S., et al (1998). "NADPH-Diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development." Nutritional Neuroscience **1**: 35-48.
- Piet, R., Vargova, L., et al (2004). "Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2151-2155.
- Piguet, O., Double, K. L., et al (2009). "White matter loss in healthy ageing: a postmortem analysis." Neurobiol Aging **30**(8): 1288-1295.

Pittet, F., Le Bot, O., et al (2013). "Motherless quail mothers display impaired maternal behavior and produce more fearful and less socially motivated offspring." Dev Psychobiol.

Plagemann, A., Harder, T., et al (1999). "Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats." Brain Res **836**(1-2): 146-155.

Plagemann, A., Rake, A., et al (1998). "Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats." Neurosci Lett **258**(1): 13-16.

Platano, D., Fattoretti, P., et al (2008). "Long-term visual object recognition memory in aged rats." Rejuvenation Res **11**(2): 333-339.

Polazzi, E., Contestabile, A. (2002). "Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology." Rev Neurosci **13**(3): 221-242.

Pontifex, M. B., Hillman, C. H., et al (2009). "The effect of acute aerobic and resistance exercise on working memory." Med Sci Sports Exerc **41**(4): 927-934.

Porter, J. T., McCarthy, K. D. (1997). "Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo." Prog Neurobiol **51**(4): 439-455.

Price, M. L., Curtis, A. L., et al (1998). "Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity." Neuropsychopharmacology **18**(6): 492-502.

Priestnall, R. (1972). "Effects of litter size on the behaviour of lactating female mice (mus musculus)." Anim Behav **20**: 386-394.

Prilusky, J. (1981). "Induction of maternal behavior in the virgin rat by lactating-rat brain extracts." Physiol Behav **26**(2): 149-152.

Pryce, C. R., Bettschen, D., et al (2001). "Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat." Dev Psychobiol **38**(4): 239-251.

Pryce, C. R., Feldon, J. (2003). "Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms." Neurosci Biobehav Rev **27**(1-2): 57-71.

Ransohoff, R. M., Perry, V. H. (2009). "Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses." Annu Rev Immunol **27**: 119-145.

Ray, S., Britschgi, M., et al (2007). "Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins." Nat Med **13**(11): 1359-1362.

Rees, S. L., Lovic, V., et al (2005). "Maternal Behavior. In: The Behavior of the Laboratory rat: A handbook with tests." Wishaw, I.Q.; Kolbe, B. Oxford University Press(1): 257-266.

- Rey, J. M. (1995). "Perceptions of poor maternal care are associated with adolescent depression." J Affect Disord **34**(2): 95-100.
- Rhees, R. W., Lephart, E. D., et al (2001). "Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function." Behav Brain Res **123**(1): 1-10.
- Richardson, W. D., Young, K. M., et al (2011). "NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?" Neuron **70**(4): 661-673.
- Richter-Levin, G.Segal, M. (1993). "Age-related cognitive deficits in rats are associated with a combined loss of cholinergic and serotonergic functions." Ann N Y Acad Sci **695**: 254-257.
- Richter-Levin, G.Segal, M. (1996). "Serotonin, aging and cognitive functions of the hippocampus." Rev Neurosci **7**(2): 103-113.
- Riddle, D. R., Sonntag, W. E., et al (2003). "Microvascular plasticity in aging." Ageing Res Rev **2**(2): 149-168.
- Rideau Batista Novais, A., Guiramand, J., et al (2013). "N-acetyl-cysteine prevents pyramidal cell disarray and reelin-immunoreactive neuron deficiency in CA3 after prenatal immune challenge in rats." Pediatr Res **73**(6): 750-755.
- Robins, S. C., Trudel, E., et al (2013). "Evidence for NG2-glia Derived, Adult-Born Functional Neurons in the Hypothalamus." PLoS One **8**(10): e78236.
- Robins, S. C., Villemain, A., et al (2013). "Extensive regenerative plasticity among adult NG2-glia populations is exclusively based on self-renewal." Glia **61**(10): 1735-1747.
- Rocha-de-Melo, A. P., Picanco-Diniz, C. W., et al (2004). "NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes." Nutr Neurosci **7**(4): 207-216.
- Rodel, H. G., Meyer, S., et al (2010). "Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats." Physiol Behav **99**(5): 644-650.
- Rogers, J. T., Rusiana, I., et al (2011). "Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density." Learn Mem **18**(9): 558-564.
- Roitbak, T.Sykova, E. (1999). "Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis." Glia **28**(1): 40-48.
- Rosenzweig, M. R.Bennett, E. L. (1996). "Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior." Behav Brain Res **78**(1): 57-65.

- Rossini, P. M., Rossi, S., et al (2007). "Clinical neurophysiology of aging brain: from normal aging to neurodegeneration." Prog Neurobiol **83**(6): 375-400.
- Roth, G. S. (1995). "Changes in tissue responsiveness to hormones and neurotransmitters during aging." Exp Gerontol **30**(3-4): 361-368.
- Roth, G. S. Joseph, J. A. (1994). "Cellular and molecular mechanisms of impaired dopaminergic function during aging." Ann N Y Acad Sci **719**: 129-135.
- Roth, K. A.D'Sa, C. (2001). "Apoptosis and brain development." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **7**(4): 261-266.
- Roth, T. L., Lubin, F. D., et al (2009). "Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene." Biol Psychiatry **65**(9): 760-769.
- Rouach, N. Giaume, C. (2001). "Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction." Prog Brain Res **132**: 203-214.
- Rusakov, D. A. Kullmann, D. M. (1998). "Geometric and viscous components of the tortuosity of the extracellular space in the brain." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8975-8980.
- Russell, J. A. (1980). "Milk yield, suckling behaviour and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes." J Physiol **303**: 403-415.
- Sakry, D., Karram, K., et al (2011). "Synapses between NG2 glia and neurons." J Anat **219**(1): 2-7.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., et al (2009). "Granulocyte colony stimulating factor decreases brain amyloid burden and reverses cognitive impairment in Alzheimer's mice." Neuroscience **163**(1): 55-72.
- Sanchez, M. M. (2006). "The impact of early adverse care on HPA axis development: nonhuman primate models." Horm Behav **50**(4): 623-631.
- Santos, M. R. V., Souza, V. H., et al (2010). "Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe  
" SCIENTIA PLENA **6**(10): 1-6.
- Saper, C. B. Sawchenko, P. E. (2003). "Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry." J Comp Neurol **465**(2): 161-163.
- Sarma, S. D., Chatterjee, K., et al (2013). "Cytomorphological and Cytochemical Identification of Microglia." ISRN Immunology **2013**( ID 205431): 155 - 165.
- Saur, L., Baptista, P. P., et al (2014). "Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes." Brain Struct Funct **219**(1): 293-302.

Saur, L., Baptista, P. P., et al (2013). "Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes." Brain Struct Funct.

Schafer, D. P., Lehrman, E. K., et al (2012). "The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS." Glia.

Schanberg, S. M., Evoniuk, G., et al (1984). "Tactile and nutritional aspects of maternal care: specific regulators of neuroendocrine function and cellular development." Proc Soc Exp Biol Med **175**(2): 135-146.

Schmidt, M., Enthoven, L., et al (2004). "The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation." J Neuroendocrinol **16**(1): 52-57.

Schmitz, C.Hof, P. R. (2005). "Design-based stereology in neuroscience." Neuroscience **130**(4): 813-831.

Schoenfeld, T. J.Gould, E. (2013). "Differential effects of stress and glucocorticoids on adult neurogenesis." Curr Top Behav Neurosci **15**: 139-164.

Schwabe, L. (2013). "Stress and the engagement of multiple memory systems: integration of animal and human studies." Hippocampus **23**(11): 1035-1043.

Segovia, G., Porras, A., et al (2001). "Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective." Mech Ageing Dev **122**(1): 1-29.

Sekine, K., Kawauchi, T., et al (2012). "Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin alpha5beta1." Neuron **76**(2): 353-369.

Seo, T. B., Cho, H. S., et al (2013). "Treadmill exercise improves behavioral outcomes and spatial learning memory through up-regulation of reelin signaling pathway in autistic rats." J Exerc Rehabil **9**(2): 220-229.

Shoji, H.Kato, K. (2006). "Maternal behavior of primiparous females in inbred strains of mice: a detailed descriptive analysis." Physiol Behav **89**(3): 320-328.

Shu, S. Y., Ju, G., et al (1988). "The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system." Neurosci Lett **85**(2): 169-171.

Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A. C., et al (2007). "Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile." Glia **55**(4): 412-424.

Silva, S. V., Garcia-Souza, E. P., et al (2010). "Maternal protein restriction during early lactation induces changes on neutrophil activation and TNF-alpha production of adult offspring." Inflammation **33**(2): 65-75.

Silveira, L. R., Fiamoncini, J., et al (2008). "Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle." J Cell Physiol **217**(1): 1-12.

- Silveira, P. P., Portella, A. K., et al (2007). "Developmental origins of health and disease (DOHaD)." J Pediatr (Rio J) **83**(6): 494-504.
- Simon, C., Gotz, M., et al (2011). "Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury." Glia **59**(6): 869-881.
- Simonova, Z., Svoboda, J., et al (1996). "Changes of extracellular space volume and tortuosity in the spinal cord of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis." Physiol Res **45**(1): 11-22.
- Siskova, Z., Tremblay, M. E. (2013). "Microglia and Synapse: Interactions in Health and Neurodegeneration." Neural Plast **2013**: 425845.
- Slais, K., Vorisek, I., et al (2008). "Brain metabolism and diffusion in the rat cerebral cortex during pilocarpine-induced status epilepticus." Exp Neurol **209**(1): 145-154.
- Slomianka, L., West, M. J. (2005). "Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats." Neuroscience **136**(3): 757-767.
- Smit-Rigter, L. A., Champagne, D. L., et al (2009). "Lifelong impact of variations in maternal care on dendritic structure and function of cortical layer 2/3 pyramidal neurons in rat offspring." PLoS One **4**(4): e5167.
- Smith, C. D., Chebrolu, H., et al (2007). "Brain structural alterations before mild cognitive impairment." Neurology **68**(16): 1268-1273.
- Sobeih, M. M., Corfas, G. (2002). "Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system." Int J Dev Neurosci **20**(3-5): 349-357.
- Solari, S. V., Stoner, R. (2011). "Cognitive consilience: primate non-primary neuroanatomical circuits underlying cognition." Front Neuroanat **5**: 65.
- Son, T. G., Park, H. R., et al (2009). "Senescence marker protein 30 is up-regulated in kainate-induced hippocampal damage through ERK-mediated astrocytosis." J Neurosci Res **87**(13): 2890-2897.
- Spirduso, W. W., Farrar, R. P. (1981). "Effects of aerobic training on reactive capacity: an animal model." J Gerontol **36**(6): 654-662.
- Squire, L. R. (2004). "Memory systems of the brain: a brief history and current perspective." Neurobiol Learn Mem **82**(3): 171-177.
- Squire, L. R., Stark, C. E., et al (2004). "The medial temporal lobe." Annu Rev Neurosci **27**: 279-306.
- Srinivasan, B., Roque, C. H., et al (2004). "Microglia-derived proneurotrophin growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor." J Biol Chem **279**(40): 41839-41845.

- Stafford, M. M., Brown, M. N., et al (2010). "Glutamate spillover augments GABA synthesis and release from axodendritic synapses in rat hippocampus." Hippocampus **20**(1): 134-144.
- Steinbusch, H. W., Van Luijtelaar, M. G., et al (1990). "Aging and regenerative capacity of the rat serotonergic system. A morphological, neurochemical and behavioral analysis after transplantation of fetal raphe cells." Ann N Y Acad Sci **600**: 384-402; discussion 402-384.
- Stemmelin, J., Lazarus, C., et al (2000). "Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats." Neuroscience **96**(2): 275-289.
- Stevens, B. (2008). "Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits." Neurosignals **16**(4): 278-288.
- Stevens, S. L., Shaw, T. E., et al (2003). "Reduced cerebral injury in CRH-R1 deficient mice after focal ischemia: a potential link to microglia and astrocytes that express CRH-R1." J Cereb Blood Flow Metab **23**(10): 1151-1159.
- Stockley, P.Parker, G. A. (2002). "Life history consequences of mammal sibling rivalry." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12932-12937.
- Stolzenberg, D. S., Stevens, J. S., et al (2012). "Experience-facilitated improvements in pup retrieval; evidence for an epigenetic effect." Horm Behav **62**(2): 128-135.
- Stranahan, A. M., Erion, J. R., et al (2013). "Reelin signaling in development, maintenance, and plasticity of neural networks." Ageing Res Rev **12**(3): 815-822.
- Stranahan, A. M., Haberman, R. P., et al (2011). "Cognitive decline is associated with reduced reelin expression in the entorhinal cortex of aged rats." Cereb Cortex **21**(2): 392-400.
- Stratakis, C. A.Chrousos, G. P. (1995). "Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system." Ann N Y Acad Sci **771**: 1-18.
- Streit, W. J. (2001). "Microglia and macrophages in the developing CNS." Neurotoxicology **22**(5): 619-624.
- Streit, W. J. (2005). "Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease." Brain Res Brain Res Rev **48**(2): 234-239.
- Streit, W. J., Braak, H., et al (2009). "Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **118**(4): 475-485.
- Streit, W. J., Graeber, M. B., et al (1988). "Functional plasticity of microglia: a review." Glia **1**(5): 301-307.
- Streit, W. J., Sammons, N. W., et al (2004). "Dystrophic microglia in the aging human brain." Glia **45**(2): 208-212.

- Sugama, S., Takenouchi, T., et al (2012). "Corticosteroids limit microglial activation occurring during acute stress." Neuroscience **232C**: 13-20.
- Sui, L., Wang, Y., et al (2012). "Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex." Neurobiol Learn Mem **97**(4): 425-440.
- Suri, D. Vaidya, V. A. (2013). "Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity." Neuroscience **239**: 196-213.
- Swain, R. A., Harris, A. B., et al (2003). "Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat." Neuroscience **117**(4): 1037-1046.
- Sweatt, J. D. (2004). "Hippocampal function in cognition." Psychopharmacology (Berl) **174**(1): 99-110.
- Sykova, E. (1997). "Extracellular space in the CNS: its regulation, volume and geometry in normal and pathological neuronal function." Neuroscientist **3**: 28-41.
- Sykova, E. (2001). "Glial diffusion barriers during aging and pathological states." Prog Brain Res **132**: 339-363.
- Sykova, E. (2004). "Diffusion properties of the brain in health and disease." Neurochem Int **45**(4): 453-466.
- Sykova, E. (2004). "Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space." Neuroscience **129**(4): 861-876.
- Sykova, E. (2005). "Glia and volume transmission during physiological and pathological states." J Neural Transm **112**(1): 137-147.
- Sykova, E. Chvatal, A. (2000). "Glial cells and volume transmission in the CNS." Neurochem Int **36**(4-5): 397-409.
- Sykova, E., Mazel, T., et al (2002). "Learning deficits in aged rats related to decrease in extracellular volume and loss of diffusion anisotropy in hippocampus." Hippocampus **12**(2): 269-279.
- Sykova, E., Mazel, T., et al (1998). "Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging." Exp Gerontol **33**(7-8): 837-851.
- Sykova, E. Nicholson, C. (2008). "Diffusion in brain extracellular space." Physiol Rev **88**(4): 1277-1340.
- Sykova, E., Roitbak, T., et al (1999). "Astrocytes, oligodendroglia, extracellular space volume and geometry in rat fetal brain grafts." Neuroscience **91**(2): 783-798.

- Sykova, E., Vargova, L. (2008). "Extrasynaptic transmission and the diffusion parameters of the extracellular space." Neurochem Int **52**(1-2): 5-13.
- Sykova, E., Vorisek, I., et al (2005). "Reduced extracellular space in the brain of tenascin-R- and HNK-1-sulphotransferase deficient mice." Eur J Neurosci **22**(8): 1873-1880.
- Szyf, M., Weaver, I. C., et al (2005). "Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat." Front Neuroendocrinol **26**(3-4): 139-162.
- Tao, A., Tao, L., et al (2005). "Cell cavities increase tortuosity in brain extracellular space." J Theor Biol **234**(4): 525-536.
- Tasker, J. G., Oliet, S. H., et al (2011). "Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology." J Neuroendocrinol.
- Teixeira, G. R., Martins, O. A., et al (2008). "Respostas Biológicas ao estresse." Pubvet **2** (42)(31).
- Terry, A. V., Jr., Hernandez, C. M., et al (2000). "Deficits in spatial learning and nicotinic-acetylcholine receptors in older, spontaneously hypertensive rats." Neuroscience **101**(2): 357-368.
- Tewari, S., Majumdar, K. (2012). "A mathematical model for astrocytes mediated LTP at single hippocampal synapses." J Comput Neurosci **33**(2): 341-370.
- Thal, D. R., Del Tredici, K., et al (2004). "Neurodegeneration in normal brain aging and disease." Sci Aging Knowledge Environ **2004**(23): pe26.
- Thomas, A. J., O'Brien, J. T. (2008). "Depression and cognition in older adults." Curr Opin Psychiatry **21**(1): 8-13.
- Tichauer, J. E., Flores, B., et al (2013). "Age-dependent changes on TGFbeta1 Smad3 pathway modify the pattern of microglial cell activation." Brain Behav Immun.
- Tomporowski, P. D. (2003). "Effects of acute bouts of exercise on cognition." Acta Psychol (Amst) **112**(3): 297-324.
- Tomporowski, P. D., Lambourne, K., et al (2011). "Physical activity interventions and children's mental function: an introduction and overview." Prev Med **52** Suppl 1: S3-9.
- Torres, J. B., Assuncao, J., et al (2006). "NADPH-diaphorase histochemical changes in the hippocampus, cerebellum and striatum are correlated with different modalities of exercise and watermaze performances." Exp Brain Res **175**(2): 292-304.
- Traykov, L., Rigaud, A. S., et al (2007). "[Neuropsychological impairment in the early Alzheimer's disease]." Encephale **33**(3 Pt 1): 310-316.

- Tremblay, M. E. (2012). "The role of microglia at synapses in the healthy CNS: novel insights from recent imaging studies." Neuron Glia Biol: 1-10.
- Tremblay, M. E., Majewska, A. K. (2011). "A role for microglia in synaptic plasticity?" Commun Integr Biol **4**(2): 220-222.
- Tripathi, R. B., Rivers, L. E., et al (2010). "NG2 glia generate new oligodendrocytes but few astrocytes in a murine experimental autoimmune encephalomyelitis model of demyelinating disease." J Neurosci **30**(48): 16383-16390.
- Troulinaki, K., Tavernarakis, N. (2005). "Neurodegenerative conditions associated with ageing: a molecular interplay?" Mech Ageing Dev **126**(1): 23-33.
- Tulving, E. (2001). "Episodic memory and common sense: how far apart?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1413): 1505-1515.
- Tynan, R. J., Beynon, S. B., et al (2013). "Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes." Acta Neuropathol **126**(1): 75-91.
- Tyrka, A. R., Wier, L., et al (2008). "Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function." Biol Psychiatry **63**(12): 1147-1154.
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., et al (2001). "Control of synapse number by glia." Science **291**(5504): 657-661.
- Unemura, K., Kume, T., et al (2012). "Glucocorticoids decrease astrocyte numbers by reducing glucocorticoid receptor expression in vitro and in vivo." J Pharmacol Sci **119**(1): 30-39.
- Unger, J. W. (1998). "Glial reaction in aging and Alzheimer's disease." Microsc Res Tech **43**(1): 24-28.
- Uriarte, N., Breigeiron, M. K., et al (2007). "Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats." Dev Psychobiol **49**(5): 451-462.
- USP (2003). "Taxonomia e dados Biológicos do Rato." Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório **Institute of Laboratory Animal Resources**.
- van Hasselt, F. N., Cornelisse, S., et al (2012). "Adult hippocampal glucocorticoid receptor expression and dentate synaptic plasticity correlate with maternal care received by individuals early in life." Hippocampus **22**(2): 255-266.
- van Hasselt, F. N., Tieskens, J. M., et al (2012). "Within-litter variation in maternal care received by individual pups correlates with adolescent social play behavior in male rats." Physiol Behav **106**(5): 701-706.
- van Oers, H. J., de Kloet, E. R., et al (1998). "The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation." Endocrinology **139**(6): 2838-2846.

van Praag, H., Christie, B. R., et al (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13427-13431.

van Praag, H., Kempermann, G., et al (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." Nat Rev Neurosci **1**(3): 191-198.

VanGuilder, H. D., Bixler, G. V., et al (2011). "Concurrent hippocampal induction of MHC II pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment." J Neuroinflammation **8**: 138.

Vargova, L.Sykova, E. (2008). "Extracellular space diffusion and extrasynaptic transmission." Physiol Res **57 Suppl 3**: S89-99.

Vazquez, D. M. (1998). "Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis." Psychoneuroendocrinology **23**(7): 663-700.

Vazquez, D. M., Van Oers, H., et al (1996). "Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat." Brain Res **731**(1-2): 79-90.

Vehmas, A. K., Kawas, C. H., et al (2003). "Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **24**(2): 321-331.

Ventruiti, A., Kazdoba, T. M., et al (2011). "Reelin deficiency causes specific defects in the molecular composition of the synapses in the adult brain." Neuroscience **189**: 32-42.

Viana, L. C., Lima, C. M., et al (2013). "Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry." Neuroscience **238**: 280-296.

Viana, L. C., Torres, J. B., et al (2007). "Exercise and food ad libitum reduce the impact of early in life nutritional imbalances on nitrenergic activity of hippocampus and striatum." Nutr Neurosci **10**(5-6): 215-228.

Vizi, E. S., Kiss, J. P., et al (2004). "Nonsynaptic communication in the central nervous system." Neurochem Int **45**(4): 443-451.

Vorisek, I., Hajek, M., et al (2002). "Water ADC, extracellular space volume, and tortuosity in the rat cortex after traumatic injury." Magn Reson Med **48**(6): 994-1003.

Vorisek, I.Sykova, E. (1997). "Ischemia-induced changes in the extracellular space diffusion parameters, K+, and pH in the developing rat cortex and corpus callosum." J Cereb Blood Flow Metab **17**(2): 191-203.

Vorisek, I.Sykova, E. (2009). "Measuring diffusion parameters in the brain: comparing the real-time iontophoretic method and diffusion-weighted magnetic resonance." Acta Physiol (Oxf) **195**(1): 101-110.

Wagnerova, D., Jiru, F., et al (2009). "The correlation between 1H MRS choline concentrations and MR diffusion trace values in human brain tumors." MAGMA **22**(1): 19-31.

Wake, H., Moorhouse, A. J., et al (2012). "Functions of microglia in the central nervous system - beyond the immune response." Neuron Glia Biol: 1-7.

Walker, C. D. (2010). "Maternal touch and feed as critical regulators of behavioral and stress responses in the offspring." Dev Psychobiol **52**(7): 638-650.

Walker, R., Tynana, R., et al (2013). "Chronic stress induces profound structural atrophy of astrocytes within the prefrontal cortex: An emerging story in glial remodeling in response to stress." Brain, Behavior, and Immunity **32**(Supplement): e20-e21.

Walsh, J. G., Muruve, D. A., et al (2014). "Inflammasomes in the CNS." Nat Rev Neurosci **15**(2): 84-97.

Walz, W., Lang, M. K. (1998). "Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus." Neurosci Lett **257**(3): 127-130.

Wang, D. D., Bordey, A. (2008). "The astrocyte odyssey." Prog Neurobiol **86**(4): 342-367.

Wang, W., Ji, P., et al (2003). "Corticotropin-releasing hormone induces proliferation and TNF-alpha release in cultured rat microglia via MAP kinase signalling pathways." J Neurochem **84**(1): 189-195.

Wang, W., Ji, P., et al (2002). "Functional expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor 1 in cultured rat microglia." J Neurochem **80**(2): 287-294.

Wang, Y., Szretter, K. J., et al (2012). "IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia." Nat Immunol **13**(8): 753-760.

Wasserman, J. K., Yang, H., et al (2008). "Glial responses, neuron death and lesion resolution after intracerebral hemorrhage in young vs. aged rats." Eur J Neurosci **28**(7): 1316-1328.

Watanabe, Y., Madarame, H., et al (2013). "Effect of very low-intensity resistance training with slow movement on muscle size and strength in healthy older adults." Clin Physiol Funct Imaging.

Weaver, I. C. (2007). "Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: let's call the whole thing off." Epigenetics **2**(1): 22-28.

Weaver, I. C., Cervoni, N., et al (2004). "Epigenetic programming by maternal behavior." Nat Neurosci **7**(8): 847-854.

- Weaver, I. C., Meaney, M. J., et al (2006). "Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3480-3485.
- Weber, P. A., Chang, H. C., et al (2004). "The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities." Biophys J **87**(2): 958-973.
- Weinstock, M., Bejar, C., et al (2013). "Dose-dependent effects of ladostigil on microglial activation and cognition in aged rats." J Neuroimmune Pharmacol **8**(1): 345-355.
- West, M. J. (1999). "Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias." Trends Neurosci **22**(2): 51-61.
- West, M. J. (2002). "Design-based stereological methods for counting neurons." Prog Brain Res **135**: 43-51.
- West, M. J., Slomianka, L., et al (1991). "Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator." Anat Rec **231**(4): 482-497.
- Wharton, S. B., O'Callaghan, J. P., et al (2009). "Population variation in glial fibrillary acidic protein levels in brain ageing: relationship to Alzheimer-type pathology and dementia." Dement Geriatr Cogn Disord **27**(5): 465-473.
- Whishaw, I. Q., Kolb, B. (2004). "The Behavior of the Laboratory Rat : A Handbook with Tests." Oxford University Press **Aug 20**.
- Wigley, R., Hamilton, N., et al (2007). "Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons." J Anat **210**(6): 661-670.
- Wilkins, A. S., Logan, M., et al (1997). "Postnatal pup brain dopamine depletion inhibits maternal behavior." Pharmacol Biochem Behav **58**(4): 867-873.
- Williamson, L. L., Chao, A., et al (2012). "Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus." Brain Behav Immun **26**(3): 500-510.
- Wright, J. W., Kramar, E. A., et al (2002). "Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system." Peptides **23**(1): 221-246.
- Wu, C. W., Chang, Y. T., et al (2008). "Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice." J Appl Physiol **105**(5): 1585-1594.
- Wu, D., Meydani, S. N. (2008). "Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention." J Leukoc Biol **84**(4): 900-914.

- Wu, Y., Zhang, A. Q., et al (2005). "Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus." Neurochem Int **46**(7): 565-574.
- Yagil, R., Etzion, Z., et al (1976). "Changes in rat milk quantity and quality due to variations in litter size and high ambient temperature." Lab Anim Sci **26**(1): 33-37.
- Yamazaki, D.Saitoe, M. (2008). "[cAMP/PKA signaling underlies age-related memory impairment]." Brain Nerve **60**(7): 717-724.
- Yau, J. L., Noble, J., et al (2011). "11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 deficiency prevents memory deficits with aging by switching from glucocorticoid receptor to mineralocorticoid receptor-mediated cognitive control." J Neurosci **31**(11): 4188-4193.
- Yau, J. L.Seckl, J. R. (2012). "Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory." Front Aging Neurosci **4**: 24.
- Ye, S. M.Johnson, R. W. (2001). "An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice." Neuroimmunomodulation **9**(4): 183-192.
- Yin, M. M., Wang, W., et al (2013). "Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring." Behav Brain Res **253**: 297-304.
- Yirmiya, R.Goshen, I. (2011). "Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis." Brain Behav Immun **25**(2): 181-213.
- Yu, S., Yang, S., et al (2011). "Glucocorticoid regulation of astrocytic fate and function." PLoS One **6**(7): e22419.
- Zamecnik, J., Vargova, L., et al (2004). "Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours." Neuropathol Appl Neurobiol **30**(4): 338-350.
- Zavaschi, M. L. S., Satler, F., et al (2002). "Associação entre trauma por perda na infância e depressão na vida adulta." Rev Bras Psiquiatr **24**(4): 189-195.
- Zhang, B., Xu, Y., et al (2014). "The role of diffusion tensor imaging in detecting microstructural changes in prodromal Alzheimer's disease." CNS Neurosci Ther **20**(1): 3-9.
- Zhang, J., Qin, L., et al (2013). "Early repeated maternal separation induces alterations of hippocampus reelin expression in rats." J Biosci **38**(1): 27-33.
- Zhang, L. X., Levine, S., et al (2002). "Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain." Brain Res Dev Brain Res **133**(1): 1-11.

Zhang, T. Y., Labonte, B., et al (2013). "Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans." Neuropsychopharmacology **38**(1): 111-123.

Zhang, X. Y., Zhang, Q., et al (2011). "Litter size variation in hypothalamic gene expression determines adult metabolic phenotype in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*)." PLoS One **6**(5): e19913.

Zhao, G. Flavin, M. P. (2000). "Differential sensitivity of rat hippocampal and cortical astrocytes to oxygen-glucose deprivation injury." Neurosci Lett **285**(3): 177-180.

Zheng, H., Liu, Y., et al (2006). "Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats." Behav Brain Res **168**(1): 47-55.

Zoremba, N., Homola, A., et al (2008). "Extracellular diffusion parameters in the rat somatosensory cortex during recovery from transient global ischemia/hypoxia." J Cereb Blood Flow Metab **28**(10): 1665-1673.

## **ANEXO I – TAXONOMIA E DADOS BIOLÓGICOS DO RATO**

## ***Taxonomia e Dados Biológicos***

<b>Rato</b>	
Classe	Mamífera
Ordem	Rodentia
Família	Muridae
Gênero	<i>Rattus</i>
Espécie	<i>Rattus norvegicus</i>
<b>Macho</b>	
Peso ao nascer	6-4 g
Peso ao desmame	45-60±10g
Peso adulto	350-500±100g
Adulto jovem (idade)	8 semanas
Idade reprodutiva	8-10 semanas
Final idade reprodutiva	10-12 meses
Idade do desmame	21 dias
<b>Fêmea</b>	
Peso ao nascer	6-4 g
Peso ao desmame	45-60±10g
Peso adulto	250-350±100g
Adulto jovem (idade)	8 semanas
Idade reprodutiva	8 - 10 semanas
Final idade reprodutiva	10-12 meses
Ciclo estral	4-5 dias
Período da gestação	20-22 dias
Idade do desmame	21 dias

O rato nasce desprovido de pêlos, corpo avermelhado, com olhos fechados, pavilhão auricular fechado e aderido à cabeça. Ao 3º dia as orelhas começam a se afastar da cabeça e a se abrirem.

Os pêlos começam a despontar no 3º ou 4º dia do nascimento e no 7º dia o corpo está totalmente recoberto de pêlos e as tetas são visíveis nas fêmeas.

Por volta do 10º dia os olhos se abrem. Aos 16 dias de idade começam a se alimentar de alimentos sólidos, além do leite materno, fonte principal de alimentação até o desmame.

As fêmeas de rato e camundongo possuem 10 tetas sendo que 2 das tetas superiores não produzem leite.

O rato não possui glândulas sudoríparas.

### **Informações adicionais**

#### **Consumo de alimento**

	<b>Rato adulto</b>
Água	10-20 ml/dia
Ração	10-20 g/dia

#### **Espaço físico adequado para roedores de laboratório**

<b>Espécie</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Área do piso/animal (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Altura (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>Rato</b>	< 100	109,65	45,15
	Até 200	148,35	45,15
	Até 300	187,05	45,15
	Até 400	258	45,15
	Até 500	387	45,15
	> 500	451,5	45,15

**Fonte:** Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, 2003

Institute of Laboratory Animal Resources

**ANEXO II – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL ACERCA DO PROJETO**



Recife, 10 de fevereiro de 2008

Ofício nº 107/08

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

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

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

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

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

Atenciosamente,

  
Prof. Maria Tereza Jansen  
Presidente do CEEA  
UFPE

Observação: Aluna do Doutorado em Nutrição; Manuella Batista de Oliveira  
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição; Animal; Ratos Wistar; Machos; Idade: até 680 dias; Número de animais previsto no protocolo: 288 animais.

**ANEXO III – TABELAS COM OS DADOS ESTEREOLÓGICOS DAS  
CONTAGENS DE CÉLULAS MICROGLIAIS PARA TODOS OS GRUPOS  
EXPERIMENTAIS**

## SSS - NP

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
DOR EXP 122	29.5 $\pm$ 3.89	29682,22	0,043	0.26246 $\pm$ 0.0469	197	304
SM G01B	18.6 $\pm$ 0.31	24145,84	0,039	0.37799 $\pm$ 0.0063	198	380
VME G04B	18.9 $\pm$ 0.29	21524,84	0,044	0.37045 $\pm$ 0.0056	207	330
VSD G04B	21.6 $\pm$ 0.64	22572,45	0,046	0.32548 $\pm$ 0.0105	212	304
VSE G01	19.8 $\pm$ 0.58	21415,26	0,045	0.35566 $\pm$ 0.0105	211	316
Média	21.7 $\pm$ 2.02	23868,122	0,044			
D.P.		3430,274				
CV2=(D.P./Média)2		0,021				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,092				
<b>CVB2</b>		<b>0,019</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>90,790</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
DOR EXP 122	27.6 $\pm$ 4.06	4501,15	0,077	0.28391 $\pm$ 0.049	155	88
SM G01B	18.1 $\pm$ 0.06	4644,68	0,071	0.38762 $\pm$ 0.0012	171	134
VME G04B	19.2 $\pm$ 0.40	4642,5	0,071	0.36579 $\pm$ 0.0073	194	125
VSD G04B	21.5 $\pm$ 0.69	4862,41	0,068	0.32709 $\pm$ 0.01113	173	118
VSE G01	20.2 $\pm$ 0.34	4112,38	0,074	0.34806 $\pm$ 0.0062	190	106
Média	21.3 $\pm$ 1.66	4552,620	0,072			
D.P.		277,930				
CV2=(D.P./Média)2		0,004				
CE2		0,005				
CE2/CV2		1,396				
<b>CVB2</b>		<b>-0,001</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>-0,396</b>				

**Polimórfica**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
DOR EXP 122	30.4 $\pm$ 3.91	18690,85	0,053	0.25673 $\pm$ 0.0488	161	187
SM G01B	19.3 $\pm$ 0.20	15951,26	0,055	0.36399 $\pm$ 0.0037	165	239
VME G04B	19.4 $\pm$ 0.52	16177,82	0,050	0.36233 $\pm$ 0.0093	191	243
VSD G04B	22.2 $\pm$ 0.72	17137,98	0,047	0.31674 $\pm$ 0.0114	212	227
VSE G01	21.2 $\pm$ 0.33	21281,11	0,042	0.33095 $\pm$ 0.0053	219	290
Média	22.5 $\pm$ 2.04	17847,804	0,049			
D.P.		2201,584				
CV2=(D.P./Média)2		0,015				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,159				
<b>CVB2</b>		<b>0,013</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>84,074</b>				

Tabela 1. Estimativas da quantidade de microglias para ratos idosos sedentários criados em ninhadas pequenas. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliciais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## SSE – NP

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SMG23EX56	22.7 $\pm$ 0.26	22578,74	0,045	0.30915 $\pm$ 0.036	211	289
VIEG23EX58	22.1 $\pm$ 1.50	21724,54	0,048	0.32328 $\pm$ 0.0208	210	293
VSDG01A	18.4 $\pm$ 0.61	23877,26	0,040	0.38229 $\pm$ 0.0117	215	378
VSEG23EX59	24.8 $\pm$ 1.17	22193,94	0,051	0.28497 $\pm$ 0.0131	209	261
VSEG25	22.4 $\pm$ 0.59	23503,34	0,043	0.31407 $\pm$ 0.0082	228	305
Média	22.1 $\pm$ 1.03	22775,564	0,045			
D.P.		897,924				
CV2=(D.P./Média)2		0,002				
CE2		0,002				
CE2/CV2		1,317				
<b>CVB2</b>		<b>0,000</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>-31,700</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SMG23EX56	22.2 $\pm$ 0.71	4345,33	0,075	0.31726 $\pm$ 0.010	203	100
VIEG23EX58	21.4 $\pm$ 1.21	4493,32	0,072	0.3332 $\pm$ 0.0192	195	110
VSDG01A	18.7 $\pm$ 0.62	4277,57	0,076	0.37613 $\pm$ 0.0115	196	117
VSEG23EX59	24.4 $\pm$ 1.04	4738,17	0,080	0.2886 $\pm$ 0.0121	196	99
VSEG25	22.1 $\pm$ 0.76	4506,42	0,079	0.31938 $\pm$ 0.0112	223	105
Média	21.8 $\pm$ 0.91	4472,162	0,076			
D.P.		177,717				
CV2=(D.P./Média)2		0,002				
CE2		0,006				
CE2/CV2		3,668				
<b>CVB2</b>		<b>-0,004</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>-266,776</b>				

**Polimórfica**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SMG23EX56	22.6 $\pm$ 0.52	19418,85	0,048	0.31013 $\pm$ 0.0074	206	254
VIEG23EX58	22.8 $\pm$ 0.90	19125,14	0,046	0.30915 $\pm$ 0.0120	223	248
VSDG01A	18.6 $\pm$ 0.27	18840,02	0,044	0.37798 $\pm$ 0.0055	214	294
VSEG23EX59	25.5 $\pm$ 0.68	20141,05	0,046	0.27546 $\pm$ 0.0073	207	229
VSEG25	23.1 $\pm$ 1.09	17835,57	0,045	0.30664 $\pm$ 0.0146	213	226
Média	22.5 $\pm$ 1.11	19072,126	0,046			
D.P.		843,885				
CV2=(D.P./Média)2		0,002				
CE2		0,002				
CE2/CV2		1,067				
<b>CVB2</b>		<b>0,000</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>-6,745</b>				

Tabela 2. Estimativas da quantidade de microglias para ratos idosos exercitados criados em ninhadas pequenas. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliciais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## SS – NP

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
PPD+ PAD G52 EXP 136	16.0 $\pm$ 0.44	16082,51	0,045	0.44093 $\pm$ 0.0126	213	291
PPE G52 EXP 135	14.1 $\pm$ 0.92	16272,66	0,051	0.50586 $\pm$ 0.0332	226	327
SM G32 EXP 148	15.9 $\pm$ 0.19	15834,46	0,049	0.44207 $\pm$ 0.0053	201	292
SM G52 EXP 134	19.4 $\pm$ 0.98	24809,92	0,038	0.36532 $\pm$ 0.0181	268	373
VSDE G37 EXP 71	15.8 $\pm$ 0.92	18657,07	0,048	0.45204 $\pm$ 0.0259	216	340
Média	16.2 $\pm$ 0.86	18331,324	0,046			
D.P.		3794,994				
CV2=(D.P./Média) <sup>2</sup>		0,043				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,050				
<b>CVB2</b>		<b>0,041</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>95,011</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
PPD+ PAD G52 EXP 136	15.6 $\pm$ 0.35	3193,78	0,076	0.45047 $\pm$ 0.010	181	106
PPE G52 EXP 135	13.9 $\pm$ 0.90	3322,62	0,076	0.51485 $\pm$ 0.0340	200	123
SM G32 EXP 148	15.5 $\pm$ 0.37	3090,66	0,080	0.45337 $\pm$ 0.0106	186	103
SM G52 EXP 134	18.9 $\pm$ 0.82	4153,19	0,100	0.37469 $\pm$ 0.0154	206	113
VSDE G37 EXP 71	14.8 $\pm$ 0.68	3928,22	0,068	0.47913 $\pm$ 0.0215	187	137
Média	15.7 $\pm$ 0.84	3537,694	0,080			
D.P.		473,212				
CV2=(D.P./Média) <sup>2</sup>		0,018				
CE2		0,006				
CE2/CV2		0,357				
<b>CVB2</b>		<b>0,012</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>64,297</b>				

**Polimórfica**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
PPD+ PAD G52 EXP 136	16.3 $\pm$ 0.30	11971,18	0,054	0.43199 $\pm$ 0.0081	202	214
PPE G52 EXP 135	14.5 $\pm$ 0.91	13099,32	0,047	0.49211 $\pm$ 0.0322	200	259
SM G32 EXP 148	15.3 $\pm$ 0.29	11548,52	0,050	0.46129 $\pm$ 0.0095	201	220
SM G52 EXP 134	18.9 $\pm$ 0.92	15869,08	0,046	0.37463 $\pm$ 0.0172	222	243
VSDE G37 EXP 71	15.6 $\pm$ 0.75	14771,88	0,047	0.45619 $\pm$ 0.0211	212	275
Média	16.1 $\pm$ 0.75	13451,996	0,049			
D.P.		1838,804				
CV2=(D.P./Média)2		0,019				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,127				
<b>CVB2</b>		<b>0,016</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>87,323</b>				

Tabela 3. Estimativas da quantidade de microglias para ratos jovens sedentários criados em ninhadas pequenas. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliciais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## SE - NP

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB+DOR G51 EXP 126	23.4 $\pm$ 1.01	21531,2	0,049	0.30404 $\pm$ 0.0139	236	268
CAB G32 EXP 124	23.9 $\pm$ 0.28	20991,13	0,055	0.29707 $\pm$ 0.0041	234	255
VID G37 EXP 70	19.4 $\pm$ 1.43	21096,16	0,046	0.37021 $\pm$ 0.0315	224	320
VMD EXP 52	19.8 $\pm$ 0.77	17486,28	0,050	0.3587 $\pm$ 0.0139	224	254
VME G36 EXP 67	20.0 $\pm$ 1.49	23311,8	0,048	0.35838 $\pm$ 0.0232	217	344
Média	21.3 $\pm$ 0.96	20883,314	0,050			
D.P.		2116,251				
CV2=(D.P./Média)2		0,010				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,239				
<b>CVB2</b>		<b>0,008</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>76,125</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB+DOR G51 EXP 126	22.9 $\pm$ 0.98	3861,76	0,086	0.3093 $\pm$ 0.0142	214	87
CAB G32 EXP 124	23.2 $\pm$ 0.31	3417,89	0,095	0.30306 $\pm$ 0.0038	195	76
VID G37 EXP 70	18.5 $\pm$ 1.15	3875,78	0,078	0.38589 $\pm$ 0.0275	185	108
VMD EXP 52	19.0 $\pm$ 0.89	3348,55	0,080	0.37429 $\pm$ 0.0178	193	93
VME G36 EXP 67	19.3 $\pm$ 1.36	4112,68	0,074	0.36877 $\pm$ 0.0218	193	112
Média	20.6 $\pm$ 1.01	3723,332	0,082			
D.P.		327,013				
CV2=(D.P./Média)2		0,008				
CE2		0,007				
CE2/CV2		0,881				
<b>CVB2</b>		<b>0,001</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>11,875</b>				

**Polimórfica**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB+DOR G51 EXP 126	24.0 $\pm$ 1.11	12888,41	0,065	0.29575 $\pm$ 0.0146	216	156
CAB G32 EXP 124	24.4 $\pm$ 0.35	14652,8	0,059	0.28867 $\pm$ 0.0040	210	174
VID G37 EXP 70	19.4 $\pm$ 0.97	16278,53	0,049	0.3668 $\pm$ 0.0195	212	248
VMD EXP 52	20.1 $\pm$ 0.91	14034,62	0,055	0.35444 $\pm$ 0.0166	208	204
VME G36 EXP 67	19.5 $\pm$ 1.26	15602,15	0,049	0.36604 $\pm$ 0.0217	210	235
Média	21.5 $\pm$ 1.11	14691,302	0,055			
D.P.		1325,903				
CV2=(D.P./Média)2		0,008				
CE2		0,003				
CE2/CV2		0,377				
<b>CVB2</b>		<b>0,005</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>62,318</b>				

Tabela 4. Estimativas da quantidade de microglias para ratos jovens exercitados criados em ninhadas pequenas. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliciais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## ES – NP

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VMD G36 EXP 72	23.5 ± 0.45	16323,32	0,059	0.30057 ± 0.0066	212	203
CAB+DOR G60 EXP 150	27.8 ± 1.03	20868,04	0,058	0.25426 ± 0.0095	214	217
VID G37 EXP 37	22.8 ± 0.32	16538,9	0,057	0.30854 ± 0.0045	211	212
VIDE G37 EXP 43	25.1 ± 0.47	17684,14	0,056	0.27947 ± 0.0054	202	207
VSD G36 EXP 74	21.4 ± 0.67	18900,45	0,052	0.33045 ± 0.0115	209	257
Média	24.1 ± 1.09	18062,970	0,056			
D.P.		1874,998				
CV2=(D.P./Média)2		0,011				
CE2		0,003				
CE2/CV2		0,296				
<b>CVB2</b>		<b>0,008</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>70,435</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VMD G36 EXP 72	24.4 ± 0.53	4364,94	0,082	0.2882 ± 0.0006	179	93
CAB+DOR G60 EXP 150	26.6 ± 0.86	3741,35	0,092	0.26468 ± 0.00861	184	73
VID G37 EXP 37	22.2 ± 0.49	4675,07	0,077	0.31753 ± 0.00754	214	109
VIDE G37 EXP 43	23.5 ± 0.30	3880,27	0,093	0.3003 ± 0.01314	233	86
VSD G36 EXP 74	20.6 ± 0.80	3185,27	0,088	0.34288 ± 0.01362	176	80
Média	23.5 ± 1.01	3969,380	0,086			
D.P.		576,462				
CV2=(D.P./Média)2		0,021				
CE2		0,007				
CE2/CV2		0,353				
<b>CVB2</b>		<b>0,014</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>64,722</b>				

**Polimórfica**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VMD G36 EXP 72	24.4 $\pm$ 0.68	16625,17	0,052	0.28896 $\pm$ 0.0080	194	199
CAB+DOR G60 EXP 150	28.1 $\pm$ 0.71	18004,43	0,051	0.25094 $\pm$ 0.0066	216	186
VID G37 EXP 37	23.5 $\pm$ 0.39	16121,93	0,055	0.29917 $\pm$ 0.0055	203	199
VIDE G37 EXP 43	24.4 $\pm$ 0.66	14408,13	0,061	0.28818 $\pm$ 0.0087	205	172
VSD G36 EXP 74	21.5 $\pm$ 0.68	15525,68	0,050	0.32812 $\pm$ 0.0105	204	211
Média	24.4 $\pm$ 1.07	16137,068	0,054			
D.P.		1331,215				
CV2=(D.P./Média) <sup>2</sup>		0,007				
CE <sup>2</sup>		0,003				
CE <sup>2</sup> /CV <sup>2</sup>		0,428				
<b>CVB2</b>		<b>0,004</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>57,217</b>				

Tabela 5. Estimativas da quantidade de microglias para ratos jovens exercitados logo após o desmame criados em ninhadas pequenas. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## EE - NP

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB G55 EXP 139	26.8 $\pm$ 2.45	20334,36	0,056	0.27245 $\pm$ 0.0259	216	230
CAU G55 EXP 138	29.5 $\pm$ 0.65	22094,15	0,055	0.23866 $\pm$ 0.0052	217	217
DOR G55 EXP 137	30.6 $\pm$ 0.57	22755,9	0,058	0.23083 $\pm$ 0.0045	209	216
VMD G38 EXP 49	25.4 $\pm$ 1.81	14814,88	0,063	0.28251 $\pm$ 0.0181	217	173
VMDE G38 EXP 45	33.9 $\pm$ 2.76	21974,84	0,060	0.21271 $\pm$ 0.0165	193	188
Média	29.2 $\pm$ 1.48	20394,826	0,058			
D.P.		3244,159				
CV2=(D.P./Média)2		0,025				
CE2		0,003				
CE2/CV2		0,134				
<b>CVB2</b>		<b>0,022</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>86,585</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB G55 EXP 139	23.5 $\pm$ 1.46	4832,98	0,077	0.30529 $\pm$ 0.01981	188	109
CAU G55 EXP 138	27.2 $\pm$ 0.59	3209,73	0,106	0.25903 $\pm$ 0.00538	176	62
DOR G55 EXP 137	29.3 $\pm$ 0.49	3803,73	0,098	0.24099 $\pm$ 0.00422	182	69
VMD G38 EXP 49	24.1 $\pm$ 1.32	3211,34	0,095	0.2947 $\pm$ 0.0147	250	72
VMDE G38 EXP 45	30.9 $\pm$ 2.43	3078,93	0,100	0.23263 $\pm$ 0.01767	222	65
Média	27.0 $\pm$ 1.43	3627,342	0,095			
D.P.		326,565				
CV2=(D.P./Média)2		0,008				
CE2		0,009				
CE2/CV2		1,117				
<b>CVB2</b>		<b>-0,001</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>-11,691</b>				

**Polimórfica**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu m</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB G55 EXP 139	24.0 $\pm$ 1.44	16190,3	0,056	0.2981 $\pm$ 0.0185	204	196
CAU G55 EXP 138	28.9 $\pm$ 0.87	16623,53	0,055	0.2446 $\pm$ 0.0071	201	165
DOR G55 EXP 137	32.0 $\pm$ 0.15	19149,51	0,059	0.2192 $\pm$ 0.0012	204	174
VMD G38 EXP 49	25.3 $\pm$ 1.81	11559,62	0,067	0.28439 $\pm$ 0.0193	218	132
VMDE G38 EXP 45	32.7 $\pm$ 2.79	18925,41	0,059	0.221 $\pm$ 0.0184	210	170
Média	28.6 $\pm$ 1.73	16489,674	0,059			
D.P.		3058,615				
CV2=(D.P./Média)2		0,034				
CE2		0,004				
CE2/CV2		0,102				
<b>CVB2</b>		<b>0,031</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>89,752</b>				

Tabela 6. Estimativas da quantidade de microglias para ratos jovens exercitados logo após o desmame e quando adultos criados em ninhadas pequenas. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## SSS-NG

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SMG20 EX62	31.8 $\pm$ 7.43	31315,52	0,047	0.25328 $\pm$ 0.0357	199	305
VIE G21 EX66	23.4 $\pm$ 0.24	35491,54	0,040	0.2992 $\pm$ 0.0031	213	439
VSDE G21 EX64	33.1 $\pm$ 5.21	36923,36	0,044	0.2332 $\pm$ 0.0344	203	338
VSDE G29EX119	26.7 $\pm$ 0.41	32348,03	0,045	0.2621 $\pm$ 0.004	203	351
VSDE G29EX120	32.4 $\pm$ 1.80	34783,94	0,045	0.21924 $\pm$ 0.0111	216	311
Média	29.5 $\pm$ 1.89	34172,478	0,044			
D.P.		2300,651				
CV2=(D.P./Média)2		0,005				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,429				
<b>CVB2</b>		<b>0,003</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>57,125</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SMG20 EX62	31.5 $\pm$ 7.55	7354,49	0,070	0.25765 $\pm$ 0.037	198	126
VIE G21 EX66	23.5 $\pm$ 0.22	8337,7	0,059	0.29759 $\pm$ 0.0029	206	184
VSDE G21 EX64	32.7 $\pm$ 5.33	9083,46	0,062	0.2358 $\pm$ 0.0341	199	146
VSDE G29EX119	26.7 $\pm$ 0.39	7679,83	0,068	0.26265 $\pm$ 0.0039	201	150
VSDE G29EX120	32.2 $\pm$ 3.10	5493,52	0,085	0.22436 $\pm$ 0.0174	200	90
Média	29.3 $\pm$ 1.80	7589,800	0,069			
D.P.		1346,128				
CV2=(D.P./Média)2		0,031				
CE2		0,005				
CE2/CV2		0,151				
<b>CVB2</b>		<b>0,027</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>84,929</b>				

**Polimórfica**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu m</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SMG20 EX62	32.4 $\pm$ 7.69	27768,73	0,045	0.24902 $\pm$ 0.0351	208	265
VIE G21 EX66	24.4 $\pm$ 0.30	30496,62	0,041	0.28782 $\pm$ 0.0035	200	363
VSDE G21 EX64	33.9 $\pm$ 5.18	33614,91	0,042	0.22659 $\pm$ 0.0321	200	302
VSDE G29EX119	27.1 $\pm$ 0.28	33714,75	0,048	0.25827 $\pm$ 0.0027	214	362
VSDE G29EX120	33.4 $\pm$ 2.57	26736,54	0,052	0.21409 $\pm$ 0.0136	215	234
Média	30.2 $\pm$ 1.89	30466,310	0,046			
D.P.		3227,038				
CV2=(D.P./Média) <sup>2</sup>		0,011				
CE <sup>2</sup>		0,002				
CE <sup>2</sup> /CV <sup>2</sup>		0,186				
<b>CVB2</b>		<b>0,009</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>81,392</b>				

Tabela 7. Estimativas da quantidade de microglias para ratos idosos sedentários criados em ninhadas grandes. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## SSE - NG

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
PAE G13	17.7 $\pm$ 0.38	26842,82	0,038	0.39595 $\pm$ 0.0083	224	443
SM G13	40.2 $\pm$ 0.65	28099	0,052	0.1748 $\pm$ 0.0028	212	203
SM G32	30.5 $\pm$ 3.55	27355,25	0,050	0.24432 $\pm$ 0.0281	210	266
VIE G32 A	25.8 $\pm$ 1.64	22590,08	0,047	0.27671 $\pm$ 0.0163	198	258
VSE G32 A	28.1 $\pm$ 1.47	24445,39	0,049	0.25196 $\pm$ 0.0132	211	255
Média	28.5 $\pm$ 3.63	25866,508	0,047			
D.P.		2286,270				
CV2=(D.P./Média)2		0,008				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,287				
<b>CVB2</b>		<b>0,006</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>71,349</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
PAE G13	17.5 $\pm$ 0.14	5088,23	0,063	0.39928 $\pm$ 0.0031	220	151
SM G13	40.2 $\pm$ 0.81	6841,19	0,083	0.17475 $\pm$ 0.0034	213	89
SM G32	30.5 $\pm$ 3.11	6241,22	0,081	0.24117 $\pm$ 0.0246	184	108
VIE G32 A	24.9 $\pm$ 1.14	5440,69	0,073	0.28368 $\pm$ 0.0122	203	114
VSE G32 A	27.5 $\pm$ 1.44	4986,48	0,084	0.25716 $\pm$ 0.0129	210	94
Média	28.1 $\pm$ 3.70	5719,562	0,077			
D.P.		797,486				
CV2=(D.P./Média)2		0,019				
CE2		0,006				
CE2/CV2		0,303				
<b>CVB2</b>		<b>0,014</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>69,682</b>				

**Polimórfca**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu m</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
PAE G13	18.2 $\pm$ 0.29	21137,91	0,044	0.38607 $\pm$ 0.0063	216	338
SM G13	41.1 $\pm$ 0.60	23926,4	0,053	0.16998 $\pm$ 0.0026	211	168
SM G32	33.5 $\pm$ 3.12	23285,19	0,063	0.22165 $\pm$ 0.0228	205	205
VIE G32 A	26.2 $\pm$ 1.21	18720,87	0,052	0.26947 $\pm$ 0.0120	205	208
VSE G32 A	29.3 $\pm$ 1.30	20622,89	0,051	0.24105 $\pm$ 0.0103	204	206
Média	29.7 $\pm$ 3.80	21538,652	0,053			
D.P.		2103,024				
CV2=(D.P./Média) <sup>2</sup>		0,010				
CE2		0,003				
CE2/CV2		0,292				
<b>CVB2</b>		<b>0,007</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>70,820</b>				

Tabela 8. Estimativas da quantidade de microglias para ratos idosos exercitados criados em ninhadas grandes. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliciais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## SS - NG

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SM G39 EXP 96	21.2 $\pm$ 1.55	30981	0,046	0.34081 $\pm$ 0.0309	241	426
VIDE G38 EXP 86	19.7 $\pm$ 1.09	21664,67	0,053	0.36347 $\pm$ 0.0188	208	322
VIE G39 EXP 94	22.5 $\pm$ 1.16	27878,07	0,044	0.31643 $\pm$ 0.0175	211	368
VSD G38 EXP 89	19.6 $\pm$ 0.69	34254,02	0,035	0.36002 $\pm$ 0.0126	228	509
VSE+VID G39 EXP 92	20.3 $\pm$ 1.23	26981,75	0,041	0.34245 $\pm$ 0.0199	205	395
Média	20.7 $\pm$ 0.54	28351,902	0,044			
D.P.		4705,530				
CV2=(D.P./Média)2		0,028				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,070				
<b>CVB2</b>		<b>0,026</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>92,970</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SM G39 EXP 96	20.4 $\pm$ 1.07	6845,66	0,063	0.34883 $\pm$ 0.0208	204	174
VIDE G38 EXP 86	19.2 $\pm$ 1.09	4337,82	0,073	0.37183 $\pm$ 0.0196	193	117
VIE G39 EXP 94	21.8 $\pm$ 0.96	4777,27	0,074	0.32465 $\pm$ 0.0157	183	114
VSD G38 EXP 89	19.7 $\pm$ 0.87	5219,27	0,064	0.35915 $\pm$ 0.0152	189	137
VSE+VID G39 EXP 92	19.9 $\pm$ 1.75	4554,58	0,072	0.3624 $\pm$ 0.0288	197	126
Média	20.2 $\pm$ 0.44	5146,920	0,069			
D.P.		1004,129				
CV2=(D.P./Média)2		0,038				
CE2		0,005				
CE2/CV2		0,126				
<b>CVB2</b>		<b>0,033</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>87,432</b>				

**Polimórfca**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
SM G39 EXP 96	21.0 $\pm$ 0.95	22123,43	0,044	0.33803 $\pm$ 0.0173	207	305
VIDE G38 EXP 86	19.6 $\pm$ 1.06	16861,75	0,047	0.36307 $\pm$ 0.0180	198	253
VIE G39 EXP 94	22.2 $\pm$ 0.96	20119,39	0,050	0.31847 $\pm$ 0.0326	207	263
VSD G38 EXP 89	19.0 $\pm$ 0.57	21918,56	0,043	0.36965 $\pm$ 0.0108	209	336
VSE+VID G39 EXP 92	20.8 $\pm$ 1.79	18787,87	0,048	0.34715 $\pm$ 0.0278	203	274
Média	20.5 $\pm$ 0.56	19962,200	0,046			
D.P.		2208,778				
CV2=(D.P./Média) <sup>2</sup>		0,012				
CE <sup>2</sup>		0,002				
CE <sup>2</sup> /CV <sup>2</sup>		0,174				
<b>CVB2</b>		<b>0,010</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>82,606</b>				

Tabela 9. Estimativas da quantidade de microglias para ratos jovens sedentários criados em ninhadas grandes. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## SE - NG

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB G56 EXP 143	19.1 $\pm$ 0.58	25352,66	0,044	0.36946 $\pm$ 0.0109	247	388
DOR G56 EXP 142	19.6 $\pm$ 0.89	26975,39	0,042	0.36086 $\pm$ 0.0158	223	399
PPE G56 EXP 144	21.2 $\pm$ 0.94	28779,58	0,045	0.33401 $\pm$ 0.0159	215	399
VIDE G41 EXP 105	24.4 $\pm$ 0.42	26054,13	0,044	0.28773 $\pm$ 0.0049	204	310
VSD+VME G47 EXP 106	21.9 $\pm$ 1.66	29130,15	0,041	0.32774 $\pm$ 0.0258	225	389
Média	21.2 $\pm$ 0.94	27258,382	0,043			
D.P.		1656,777				
CV2=(D.P./Média)2		0,004				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,506				
<b>CVB2</b>		<b>0,002</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>49,400</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB G56 EXP 143	17.9 $\pm$ 0.39	3683,76	0,075	0.39138 $\pm$ 0.0082	195	107
DOR G56 EXP 142	18.8 $\pm$ 0.59	4990,08	0,063	0.37427 $\pm$ 0.0115	185	138
PPE G56 EXP 144	20.1 $\pm$ 0.72	3948,6	0,082	0.35045 $\pm$ 0.0127	188	102
VIDE G41 EXP 105	24.1 $\pm$ 0.46	4425,97	0,078	0.29119 $\pm$ 0.0057	183	96
VSD+VME G47 EXP 106	21.3 $\pm$ 1.38	5058,2	0,070	0.3346 $\pm$ 0.0227	191	124
Média	20.4 $\pm$ 1.08	4421,322	0,074			
D.P.		611,675				
CV2=(D.P./Média)2		0,019				
CE2		0,005				
CE2/CV2		0,283				
<b>CVB2</b>		<b>0,014</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>71,741</b>				

**Polimórfca**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu m</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
CAB G56 EXP 143	19.0 $\pm$ 0.64	16844,02	0,048	0.371 $\pm$ 0.0123	211	259
DOR G56 EXP 142	19.5 $\pm$ 0.56	21365,45	0,042	0.36074 $\pm$ 0.0101	211	320
PPE G56 EXP 144	20.4 $\pm$ 0.68	23465,51	0,042	0.34513 $\pm$ 0.0114	202	328
VIDE G41 EXP 105	24.5 $\pm$ 0.32	20521,48	0,047	0.28587 $\pm$ 0.0035	218	242
VSD+VME G47 EXP 106	21.5 $\pm$ 1.45	20123,41	0,048	0.33202 $\pm$ 0.0227	209	278
Média	21.0 $\pm$ 0.97	20463,974	0,045			
D.P.		2400,273				
CV2=(D.P./Média)2		0,014				
CE2		0,002				
CE2/CV2		0,150				
<b>CVB2</b>		<b>0,012</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>85,031</b>				

Tabela 10. Estimativas da quantidade de microglias para ratos jovens exercitados criados em ninhadas grandes. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliciais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## ES - NG

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VSE G47 EXP 98	30.8 $\pm$ 0.61	22927,52	0,057	0.22865 $\pm$ 0.0045	225	217
CAB+DOR G57 EXP 147	24.0 $\pm$ 1.09	17660,68	0,057	0.29418 $\pm$ 0.0122	199	216
PAE G57 EXP 146	23.4 $\pm$ 0.28	19854,75	0,054	0.29923 $\pm$ 0.0038	213	249
PAE+PPE G57 EXP 149	22.1 $\pm$ 0.48	21733,32	0,048	0.3179 $\pm$ 0.0078	197	285
PPD G57 EXP 145	23.7 $\pm$ 0.48	19117,88	0,058	0.29709 $\pm$ 0.0059	208	237
Média	24.8 $\pm$ 3.4	20258,830	0,055			
D.P.		2092,335				
CV2=(D.P./Média)2		0,011				
CE2		0,003				
CE2/CV2		0,280				
<b>CVB2</b>		<b>0,008</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>72,048</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VSE G47 EXP 98	29.6 $\pm$ 0.65	3471,38	0,108	0.23813 $\pm$ 0.0054	196	62
CAB+DOR G57 EXP 147	23.3 $\pm$ 0.95	3426,56	0,090	0.30349 $\pm$ 0.0129	179	77
PAE G57 EXP 146	23.1 $\pm$ 0.23	4007,8	0,084	0.30352 $\pm$ 0.0031	187	91
PAE+PPE G57 EXP 149	21.4 $\pm$ 0.44	4257,63	0,075	0.32977 $\pm$ 0.0072	171	103
PPD G57 EXP 145	22.3 $\pm$ 0.42	3150,23	0,089	0.31541 $\pm$ 0.0064	171	74
Média	23.9 $\pm$ 1.45	3662,720	0,089			
D.P.		454,980				
CV2=(D.P./Média)2		0,015				
CE2		0,008				
CE2/CV2		0,517				
<b>CVB2</b>		<b>0,007</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>48,255</b>				

**Polimórfca**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu m</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VSE G47 EXP 98	31.1 $\pm$ 0.43	15601,99	0,071	0.22587 $\pm$ 0.0033	208	146
CAB+DOR G57 EXP 147	23.6 $\pm$ 0.78	13230,99	0,057	0.29891 $\pm$ 0.0094	196	165
PAE G57 EXP 146	23.3 $\pm$ 0.38	14310,39	0,058	0.30104 $\pm$ 0.0051	208	180
PAE+PPE G57 EXP 149	20.8 $\pm$ 0.51	16844,96	0,052	0.33915 $\pm$ 0.0089	201	236
PPD G57 EXP 145	22.3 $\pm$ 0.44	13503,96	0,054	0.315 $\pm$ 0.0063	199	177
Média	24.2 $\pm$ 1.78	14698,458	0,058			
D.P.		1512,839				
CV2=(D.P./Média) <sup>2</sup>		0,011				
CE <sup>2</sup>		0,003				
CE <sup>2</sup> /CV <sup>2</sup>		0,322				
<b>CVB2</b>		<b>0,007</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>67,768</b>				

Tabela 11. Estimativas da quantidade de microglias para ratos jovens exercitados logo após o desmame criados em ninhadas grandes. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microgliais individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).

## EE - NG

### Molecular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VID G38 EXP 75	23.7 $\pm$ 0.43	17582,69	0,057	0.29509 $\pm$ 0.0052	203	216
VIE + VSE G39 EXP 84	23.9 $\pm$ 0.97	24143,98	0,048	0.29634 $\pm$ 0.0112	207	289
VME G39 EXP 85	34.9 $\pm$ 4.23	24033,02	0,060	0.21901 $\pm$ 0.0376	196	207
VSDE G39 EXP 81	28.0 $\pm$ 3.83	20683,4	0,062	0.26867 $\pm$ 0.0322	212	220
VSE G38 EXP 76	24.2 $\pm$ 0.73	19764,95	0,049	0.29174 $\pm$ 0.0098	182	236
Média	26.9 $\pm$ 2.1	21241,608	0,055			
D.P.		2832,646				
CV2=(D.P./Média)2		0,018				
CE2		0,003				
CE2/CV2		0,172				
<b>CVB2</b>		<b>0,015</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>82,804</b>				

### Granular

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu\text{m}</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VID G38 EXP 75	23.3 $\pm$ 0.47	4549,54	0,072	0.30163 $\pm$ 0.0062	183	102
VIE + VSE G39 EXP 84	23.0 $\pm$ 0.74	3565,67	0,081	0.30609 $\pm$ 0.0103	199	80
VME G39 EXP 85	32.3 $\pm$ 4.06	3733,76	0,113	0.23962 $\pm$ 0.0443	188	64
VSDE G39 EXP 81	27.6 $\pm$ 3.98	3275,9	0,107	0.27444 $\pm$ 0.0361	186	64
VSE G38 EXP 76	21.9 $\pm$ 0.79	3347,37	0,088	0.32215 $\pm$ 0.0125	186	80
Média	25.6 $\pm$ 1.93	3662,720	0,092			
D.P.		454,980				
CV2=(D.P./Média)2		0,015				
CE2		0,009				
CE2/CV2		0,552				
<b>CVB2</b>		<b>0,007</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>44,757</b>				

**Polimórfca**

<i>Animais</i>	<i>Espessura da Secção <math>\mu m</math></i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>tsf</i>	<i>No de caixas</i>	$\Sigma Q^-$
VID G38 EXP 75	23.5 $\pm$ 0.38	12882,39	0,057	0.29799 $\pm$ 0.0048	199	159
VIE + VSE G39 EXP 84	23.7 $\pm$ 1.20	17506,21	0,047	0.29935 $\pm$ 0.0152	198	212
VME G39 EXP 85	34.5 $\pm$ 4.08	18096,19	0,066	0.22086 $\pm$ 0.0378	200	163
VSDE G39 EXP 81	28.6 $\pm$ 3.53	14941,17	0,070	0.25917 $\pm$ 0.0282	212	152
VSE G38 EXP 76	23.4 $\pm$ 0.75	14146,3	0,061	0.30106 $\pm$ 0.0099	201	174
Média	26.7 $\pm$ 2.17	15514,452	0,060			
D.P.		2222,651				
CV2=(D.P./Média) <sup>2</sup>		0,021				
CE2		0,004				
CE2/CV2		0,177				
<b>CVB2</b>		<b>0,017</b>				
<b>CVB2 (% of CV2)</b>		<b>82,345</b>				

Tabela 12. Estimativas da quantidade de microglias para ratos jovens exercitados logo após o desmame e quando adultos criados em ninhadas grandes. Parâmetros experimentais, resultados das contagens pelo fracionador óptico, números das estimativas microglias individuais (N) e médias, com o coeficiente de erro (CE).