



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DO ESTADO DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO E EXTENSÃO  
CURSO DE MEDICINA**

**LUCAS MARTINS DO COUTO  
RAFAEL RAMOS BRAGA**

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA SOBRE A MORFOMETRIA DE  
ASTRÓCITOS DO GIRO DENTEADO EM MODELO MURINO**

**BELÉM - PA  
2020**

**LUCAS MARTINS DO COUTO  
RAFAEL RAMOS BRAGA**

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA SOBRE A MORFOMETRIA DE  
ASTRÓCITOS DO GIRO DENTEADO EM MODELO MURINO**

Trabalho de Curso apresentado ao Centro  
Universitário do Estado do Pará, como requisito  
parcial para conclusão de graduação em  
Medicina.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola de Carvalho  
Chaves de Siqueira Mendes

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Consentino  
Kronka Sosthenes

**BELÉM - PA  
2020**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)**  
**Biblioteca do CESUPA, Belém – PA**

---

Couto, Lucas Martins do.

Influência da atividade mastigatória sobre a morfometria de astrócitos do giro denteado em modelo murino / Lucas Martins do Couto, Rafael Ramos Braga; orientadora Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes, coorientadora Marcia Consentino Kronka Sosthenes. – 2020.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Centro Universitário do Estado do Pará, Medicina, Belém, 2020.

1. Astrócitos. 2. Morfometria. 3. Mastigação. I. Braga, Rafael Ramos. II. Mendes, Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira, orient. III. Sosthenes, Marcia Consentino Kronka. IV. Título.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Elizabete Batista Ramos e Paulo Leslie Tourinho Braga, e à minha irmã, Paula Thainá Ramos Braga, por toda a força e dedicação dispensadas para a conclusão deste ciclo da minha vida. Vocês são o meu porto seguro e a minha inspiração para continuar seguindo em frente, sempre alcançando novos objetivos. Sem este apoio, eu jamais teria conseguido esta conquista.

Agradeço, também, aos meus avós e tios por todo o apoio durante a minha trajetória de vida. Particularmente, deixo aqui o meu agradecimento ao meu falecido tio Dr. Marcus Antônio Batista Ramos. O senhor foi uma fonte de inspiração e um exemplo de ser humano para mim. Infelizmente, estamos separados pelo plano físico, mas creio que um dia ainda vamos nos encontrar para comemorar a conclusão desta etapa da minha vida. Sempre me lembrarei do senhor com eternas saudades. Muito obrigado por tudo.

Ao meu falecido avô, Gondim Santana Braga, deixo meus agradecimentos por me ensinar que *“quem corre, cansa antes de chegar; mas quem anda sempre chega”*, o maior ensinamento que já adquiri ao longo da minha vida. Obrigado por todos os seus ensinamentos.

Agradeço, também, à minha namorada, Monique Cristina Costa de Farias, que me acompanhou e apoiou não somente durante este curso, mas desde antes dele, estando presente em todas as etapas da minha formação. Sempre estivemos juntos em todos os momentos das nossas vidas. Para mim, você foi a luz na escuridão nos piores momentos e minha companheira nos melhores. Muito obrigado por toda a sua ajuda e companhia.

Agradeço a todos os professores que estiveram comigo ao longo destes anos e que sempre me incentivaram a ser cada vez melhor. Em especial, deixo o meu agradecimento à prof. Dra. Fabíola C.C.S. Mendes e à Dra. Márcia C.K. Sosthenes por todos os ensinamentos e orientações dadas ao longo do curso. Levarei seus ensinamentos para a toda minha vida.

A todos os funcionários do Centro Universitário do Estado do Pará, meus eternos agradecimentos por toda a ajuda dispensada para que eu concluísse este ciclo.

*Rafael Ramos Braga*

## RESUMO

A diminuição da atividade mastigatória é um processo que comprovadamente influencia diversos aspectos da cognição, principalmente aqueles relacionados às funções hipocampais. Baseado nisso, o presente trabalho avaliou a influência da atividade mastigatória sobre a morfologia de astrócitos do terço externo da camada molecular do giro denteado por meio de reconstrução tridimensional. Com esse objetivo, 15 animais foram agrupados de maneiras distintas de acordo com a oferta isolada ou combinada de rações em diferentes consistências, chamadas *pellet* (ração sólida) e ração farelada. Dessa forma, formaram-se os grupos controle HD (*Hard diet*), o grupo com redução da atividade mastigatória HD/SD (*Hard diet/Soft diet*) e o grupo com reabilitação mastigatória HD/SD/HD (*Hard Diet/Soft diet/Hard diet*). Aos seis meses de vida, foram obtidos cortes encefálicos submetidos ao processamento imunohistoquímico para marcação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP – *Glial Fibrillary Acidic Protein*), presente principalmente em astrócitos. A variável escolhida para comparação entre os grupos experimentais foi a complexidade astrocitária, pois esta se mostrou uma variável multimodal comum em todos os grupos experimentais. Como resultado, detectamos, em todos os grupos, a composição de duas subfamílias de astrócitos: uma de maior e outra de menor complexidade, assim chamados de Tipo I e Tipo II, respectivamente. Quando comparados cada subtipo entre as dietas, o grupo HD apresentou maior complexidade em comparação aos grupos de alteração da atividade mastigatória (ANOVA *one way*, teste T post hoc,  $p < 0,05$ ), tanto para o tipo I quanto para o II. Concluímos, assim, que a atividade mastigatória é um dos fatores que mantém a complexidade média e o número de ramificações astrocitárias, enquanto sua redução impacta negativamente na complexidade e no número de ramificações, o que poderia afetar a função dessas células.

**Palavras-chaves:** atividade mastigatória; astrócitos; morfometria; giro denteado.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> - Mecanismo patológico da disfunção mastigatória. ....	122
<b>FIGURA 2</b> - Localização anatômica da formação hipocampal .....	133
<b>FIGURA 3</b> - Regiões anatômicas do hipocampo.....	133
<b>FIGURA 4</b> - Ligações do Córtex Entorrinal (CE), mostrando as principais conexões do córtex entorrinal lateral (LEC) e córtex entorrinal medial (MEC) para os dendritos apicais dos neurônios do hipocampo em CA1 e CA3. Giro denteado (GD). ....	155
<b>FIGURA 5</b> – Estado reativo no giro denteado, ocasionado por lesão no córtex entorrinal. ....	177
<b>FIGURA 6</b> - Formas de apresentação das rações utilizadas. (A) ração pellet e (B) ração farelada. ....	20
<b>FIGURA 7</b> - Malha virtual com quadrados de dimensões de 50 x 50 micrômetros, utilizada para selecionar qual astrócito escolhido para ser reconstruído. ....	25
<b>FIGURA 8</b> - Micrografia óptica dos tipos astrocitários I (A) e II (B). Note que os astrócitos do tipo I tem um grande número de ramificações, ao passo que os astrócitos di tipo II têm uma quantidade menor de proongamentos. ....	31
<b>FIGURA 9</b> - Reconstrução tridimensional dos astrócitos do tipo I conforme o grupo experimental.....	32
<b>FIGURA 10</b> - Reconstrução tridimensional dos astrócitos do tipo II conforme o grupo experimental.....	32
<b>FIGURA 11</b> - Quantidade relativa de astrócitos do tipo I e II de acordo como grupo experimental.....	333
<b>FIGURA 12</b> - Representação gráfica da complexidade astrocitária entre os astrócitos do tipo I e II no grupo HD (A), HD/SD (B) e HD/SD/HD. Em todos os grupos, os astrócitos do tipo I apresentaram maior complexidade média (* = $p < 0,05$ ).....	34
<b>FIGURA 13</b> - Diferença de complexidade média entre os astrócitos do tipo I por grupo experimental. O grupo HD obteve a maior complexidade em relação aos astrócitos do tipo I, seguido pelo grupo HD/SD/HD e pelo grupo HD/SD. (* = $p < 0,05$ ). ....	35
<b>FIGURA 14</b> - Diferença de complexidade média entre os astrócitos do tipo II por grupo experimental. O grupo HD obteve a maior complexidade em relação aos astrócitos do tipo II, seguido pelo grupo HD/SD/HD e pelo grupo HD/SD. (* = $P < 0,05$ ) ....	35

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>QUADRO 1</b> – Medidas morfológicas microscópicas obtidas a partir de reconstruções tridimensionais dos astrócitos .....	30
<b>TABELA 1</b> – Dados obtidos a partir da análise discriminante feita nas variáveis morfológicas com MMI > 0,55 para todos os grupos experimentais .....	30
<b>TABELA 2</b> - Quantidade de astrócitos tipo I e II por grupo experimental. ....	32
<b>TABELA 3</b> - Valores de complexidade média, erro-padrão e significância para teste T entre os astrócitos do tipo I e II, para grupos experimentais de mesma dieta.....	33
<b>TABELA 4</b> - Valores de complexidade média, erro-padrão e significância na comparação de grupos experimentais com dietas diferentes, porém para o mesmo subtipo celular (ANOVA- <i>one way</i> , tes t post hoc).....	33

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1 A ATIVIDADE MASTIGATÓRIA E OS EFEITOS DE SUA ALTERAÇÃO .....	10
1.2 A ANATOMIA E CONEXÕES DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL .....	12
1.3 ASTRÓCITOS: FUNÇÕES E ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 GERAL: .....	18
2.2 ESPECÍFICOS: .....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA .....	19
3.2 TIPO DE ESTUDO .....	19
3.3 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO .....	19
3.4 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DE ACORDO COM AS DIETAS	20
3.5 OBTENÇÃO E CORTE DE MATERIAL ENCEFÁLICO E ENSAIO IMUNO-HISTOQUÍMICO .....	21
3.6 RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS ASTRÓCITOS .....	23
3.7 ANÁLISE DA RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS ASTRÓCITOS .....	26
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>40</b>
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A mastigação é um processo fisiológico que tem como objetivo principal a redução progressiva dos alimentos até que eles se tornem partículas menores, facilitando a digestão e absorção de nutrientes ao longo do trato gastrointestinal<sup>1-2</sup>.

Nos últimos anos, além das funções relacionadas ao sistema digestório, tem-se ressaltado que a mastigação também exerce influência sobre Sistema Nervoso Central (SNC), afetando aspectos cognitivos por ele desempenhados<sup>3-4</sup>.

Na investigação desta relação, por exemplo, estudos já constataram que a alteração da mastigação está relacionada, por exemplo, com a diminuição da liberação de neurotransmissores no córtex parietal do encéfalo<sup>5</sup>, com o prejuízo da memória espacial e com a diminuição da densidade de neurônios piramidais<sup>6</sup> e de suas espinhas dendríticas<sup>7</sup>.

Diante disso, ao longo dos últimos anos, a relação entre a atividade mastigatória, seus efeitos sobre o SNC e processos cognitivos tem sido estudada largamente por pesquisadores, principalmente a associação entre a mastigação e o processo de memorização e aprendizado, os mais afetados pela redução da atividade mastigatória em estudos<sup>3-4,8-9</sup>.

Ademais, estudar esta relação ganha importância quando falamos em patologias demenciais e seus fatores de risco, pois estudos recentes demonstram que a alteração da atividade mastigatória também está relacionada com o desenvolvimento destas patologias<sup>10-11</sup>.

Portanto, diante das evidências científicas sobre o assunto, torna-se importante pesquisar a fundo este tema em busca de mecanismos que possam esclarecer como essas patologias se instalam e quais são os fatores envolvidos no desenvolvimento delas na população humana, e com isso, melhorar a qualidade de vida e a saúde da comunidade mundial.

Ainda nessa temática, o hipocampo, estrutura chave nos processos cognitivos, também ganha destaque. Essa estrutura, localizada medialmente no córtex do lobo temporal, tem projeções para diversas regiões do SNC e desempenha papéis fundamentais na fisiologia humana, estando relacionado, por exemplo, com a motivação, as emoções, e com os processos de aprendizado e de consolidação de memórias.

Em casos avançados de Doença de Alzheimer, por exemplo, patologia na qual há grande degeneração hipocampal, o que se nota são indivíduos com perda parcial ou total da localização espacial<sup>12</sup>. Por isso, podemos afirmar que o hipocampo está relacionado ao aprendizado associado à navegação, exploração e locomoção ambiental<sup>12</sup>.

No que tange à relação entre hipocampo, memória e atividade mastigatória, a diminuição da mastigação impacta negativamente nas funções hipocampais, afetando a memória espacial, tendo como consequência a dificuldade de localização pelo indivíduo<sup>5-6,13</sup>. Por isso, o hipocampo, tanto macro quanto microscopicamente, tem sido alvo de diversas pesquisas científicas dentro do campo da atividade mastigatória.

Aliado à alteração estrutural e funcional do hipocampo devido à diminuição da mastigação, as alterações celulares também têm sido investigadas ao longo dos anos, sendo os astrócitos uma das células estudadas<sup>7, 13</sup>.

Os astrócitos são as células neurogliais mais numerosas no encéfalo e ocupam os espaços entre os neurônios. Eles têm diversos prolongamentos em seu soma e suas funções estão relacionadas principalmente à homeostase do SNC<sup>14</sup>. Como funções desempenhadas por estas células, podemos citar: a remoção de neurotransmissores da fenda sináptica; controle da concentração de K<sup>+</sup> e outras substâncias químicas no espaço extracelular; reparação de áreas lesionadas no SNC; e secreção de fatores essenciais para a sobrevivência de neurônios<sup>14-15-16-17</sup>.

No que concerne à relação entre a atividade mastigatória e alterações celulares astrocitárias, estudos demonstraram que a redução da atividade mastigatória pode alterar aspectos morfológicos destas células<sup>5-6</sup>. Como exemplo destas alterações, estudos constataram que a retirada de molares em roedores resultou em prejuízo no aprendizado e aumento da produção de proteína ácida fibrilar glial (GFAP – *Glial Fibrillary Acidic Protein*), um filamento intermediário que se modifica quando há alterações morfológicas de astrócitos, mostrando que essas células também são afetadas pela mastigação<sup>13</sup>.

Dessa forma, diante das evidências existentes na literatura científica, o presente estudo buscou investigar a influência da alteração da atividade mastigatória sobre a morfometria dos astrócitos do hipocampo.

No entanto, antes de discorrermos sobre aspectos técnicos deste trabalho, faremos uma revisão sobre a mastigação e seus efeitos no corpo humano, além de revisar as funções do hipocampo e das células astrocíticas, destacando os estudos já realizados com esses elementos no campo da alteração mastigatória.

### 1.1 A ATIVIDADE MASTIGATÓRIA E OS EFEITOS DE SUA ALTERAÇÃO

A mastigação é o processo inicial da digestão. Vários são os elementos que a tornam possível, como os dentes, a língua, a saliva e os músculos masseter, temporal e pterigoide medial e lateral. Todos estes elementos trabalham em conjunto para efetivar a atividade mastigatória e contribuir para a melhor absorção dos alimentos ao longo do trato gastrointestinal<sup>1-2</sup>.

Nos últimos anos, além da função de auxiliar na absorção de alimentos, pesquisadores também tem defendido que a mastigação exerce outros efeitos no organismo, particularmente sobre o SNC.

Como exemplo desses efeitos, podemos citar o aumento do fluxo sanguíneo cerebral, observado em estudos<sup>18-19</sup>. Dentre esses, quando realizado em idosos edêntulos que foram submetidos à reabilitação mastigatória com próteses dentais, revelou-se um incremento do fluxo sanguíneo cerebral, principalmente no córtex temporal, após a reabilitação mastigatória<sup>20</sup>.

Esses estudos são particularmente importantes, pois sugerem que a manutenção da atividade mastigatória esteja relacionada com a melhor vascularização cerebral, o que é importante para homeostase de estruturas e células dentro do SNC, permitindo com que elas executem suas funções normalmente.

Outros estudos buscaram avaliar a atividade cerebral durante o ato da mastigação utilizando ressonância magnética. Os resultados obtidos demonstraram que diversas áreas e estruturas cerebrais tiveram aumento de sua atividade, destacando-se o córtex sensoriomotor, córtex motor secundário, cerebelo, tálamo, lobo da ínsula e córtex pré-frontal direito<sup>21</sup>, mostrando que a mastigação é um estímulo contínuo significativo para ativação de áreas cerebrais.

Além das alterações relacionadas à vascularização e à atividade cerebral, as alterações cognitivas também já foram documentadas e sugerem que o ato de mastigar é um fator que mantém as funções cognitivas relacionadas à memória e ao aprendizado<sup>8-9</sup>. De fato, vários estudos buscaram elucidar esta relação, como

demonstrado em trabalhos nos quais a alteração da atividade mastigatória de roedores jovens, adultos e senis resultou em prejuízo no aprendizado espacial em testes de labirinto aquático, prejuízo observado principalmente em animais senis<sup>6, 22, 23,24</sup>.

Além disso, as alterações cognitivas não se restringem somente ao prejuízo em testes comportamentais, mas abrangem também alteração na densidade de neurônios e astrócitos em regiões importantes do hipocampo, como CA1 e CA3, bem como, já foi constatada a redução da atividade neuronal e da expressão de fator neutrófico derivado do cérebro (BNDF – *Brain-Derived Neurotrophic Factor*)<sup>22,25-26</sup>, responsável pelo crescimento e diferenciação de neurônios e na gênese de sinapses<sup>27</sup>.

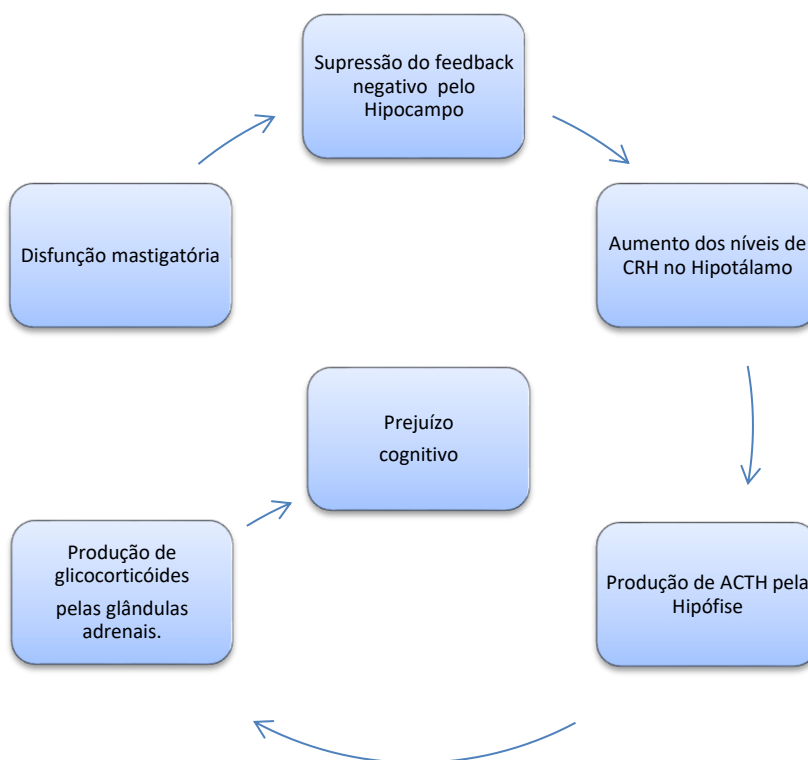
Complementarmente, viu-se que o tipo de consistência de dieta consumida também pode influenciar em aspectos cognitivos. Em testes com animais que se alimentaram com dieta farelada por longos períodos, foi constatado que a redução mastigatória foi responsável pelo prejuízo em testes comportamentais e pela redução na densidade celular nas regiões de CA1 e CA3 do hipocampo<sup>28</sup>. Em adição a estes achados, outros trabalhos também constataram alterações na quantidade de sinapses do hipocampo e do córtex parietal em roedores, induzidas pela dieta baseada em rações fareladas<sup>29</sup>.

Investigações sobre mecanismos que possam explicar a relação entre redução da atividade mastigatória e disfunções cognitivas também já foram feitas. O mecanismo mais aceito se baseia na participação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) nesse processo.

Já foi notado que a mastigação é um fator supressor do eixo HHA, o que diminui a liberação de glicocorticoides pelas glândulas adrenais<sup>30</sup>, hormônios que atuam de forma neurotóxica em regiões cerebrais, principalmente no hipocampo. A presença de receptores sensíveis a glicocorticoides no hipocampo é a base deste processo, pois, quando ativados, estes receptores realizam um *feedback* negativo ao hipotálamo, reduzindo a liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), levando à diminuição de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), reduzindo assim, a liberação de glicocorticoides<sup>31</sup>. Quando há disfunção mastigatória, o mecanismo de *feedback* negativo fica deficitário, o que aumenta a atuação de glicocorticoides no

hipocampo, levando ao prejuízo cognitivo. Este mecanismo é representado pela **FIGURA 1**, a seguir.

**FIGURA 1** - Mecanismo patológico da disfunção mastigatória.



**Fonte:** Criado pelos autores.

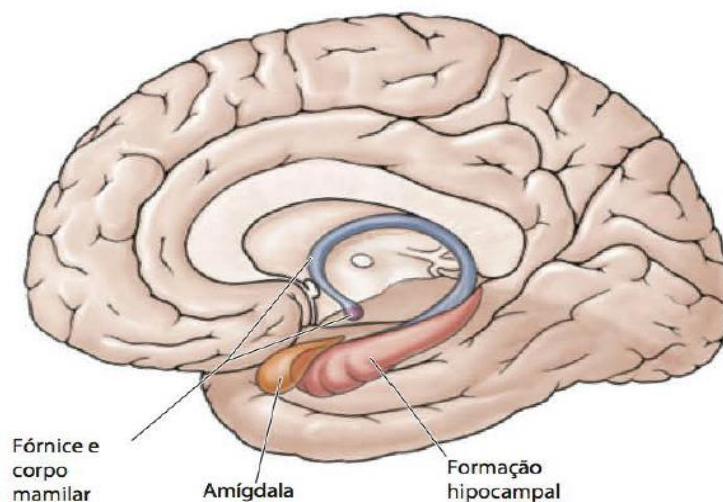
Diante disso, torna-se evidente que a mastigação exerce influência macro e microscopicamente sobre o SNC. Por isso, investigar esta relação pode esclarecer dúvidas ainda existentes sobre como a disfunção mastigatória pode afetar aspectos cognitivos e, com isso, elucidar a patogênese de processos demenciais.

## 1.2 A ANATOMIA E CONEXÕES DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

A formação hipocampal é uma estrutura que está localizada na porção medial do lobo temporal, posteriormente à amígdala, e é contínua com o fórnice e com o corpo mamilar, conforme representado na **FIGURA 2**.

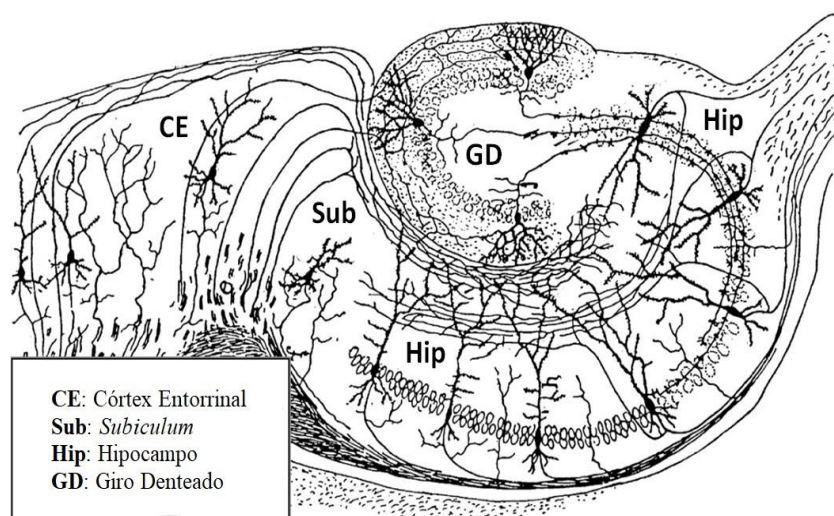
É constituída de subregiões, das quais se destacam: o hipocampo (HIP), o giro denteado (GD), o *subiculum* (SUB), e o córtex entorrinal (CE)<sup>32</sup>, mostradas na **FIGURA 3**.

**FIGURA 2** - Localização anatômica da formação hipocampal.



Fonte: adaptado de Neuroanatomia, Martin (4ª ed)<sup>33</sup>.

**FIGURA 3** - Regiões anatômicas do hipocampo.



Fonte: adaptado de Shepherd (2003)<sup>34</sup>, originalmente descrito por Ramón y Cajal (1911)<sup>35</sup>.

O hipocampo, antigamente chamado de Corno de Amon (CA), é subdividido nas regiões CA1, CA2 e CA3, que são compostas pelas camadas histológicas: polimórfica (*stratum oriens*), piramidal (*stratum pyramidae*) e molecular (*stratum radiatum* e *stratum lacunosum-molculare*).

Dentre outras funções, a região de CA1 do hipocampo parece funcionar principalmente como mediadora do processamento de informações temporais e espaciais<sup>36</sup>. Em estudos onde houve inativação genética de CA2 em camundongos, estes animais apresentaram conservação da memória espacial e contextual, porém

tiveram prejuízo da memória social, aquela responsável por fazer animais reconhecerem outro da mesma espécie, sugerindo que CA2 é responsável pela memória social<sup>37</sup>. Por último, CA3 parece estar envolvida na separação de padrões, ou seja, no agrupamento de eventos similares, evitando que memórias sofram interferências de outras, mesmo que sejam parecidas<sup>38</sup>.

O GD, por sua vez, está localizado entre o CE e o HIP. Histologicamente, é uma estrutura trilaminar, dividida nas camadas molecular (*stratum moleculare*), granular (*stratum granulosum*) e camada polimórfica. Dentre suas funções, podemos destacar que ele também está relacionado à memória, sendo responsável pelo processamento da memória espacial e temporal<sup>39</sup>, além de contribuir para a separação de padrões, junto com CA3<sup>40</sup>.

Já o *subiculum* é composto principalmente de substância cinzenta, onde nesta região anatômica está o soma de neurônios que estão ligados a estruturas neurais, como a amígdala e o hipotálamo, sendo esta sua função básica<sup>41</sup>.

Por último, o córtex entorrinal (CE) ocupa a parte anterior do giro parahipocampal, medialmente ao sulco rinal. Ele funciona como porta de entrada para o hipocampo, recebendo informações vindas de diversas regiões do córtex cerebral. Esta função é destacada em pesquisas onde a lesão do CE, mesmo na presença de integralidade estrutural e funcional do hipocampo, resulta em déficit de memória<sup>42-43-44-45</sup>.

Além disso, o CE faz conexões com o GD e o hipocampo, direta ou indiretamente. Sua conexão com o GD se faz por meio das vias perfurantes, as quais atravessam o *subiculum* e chegam às camadas histológicas do GD.

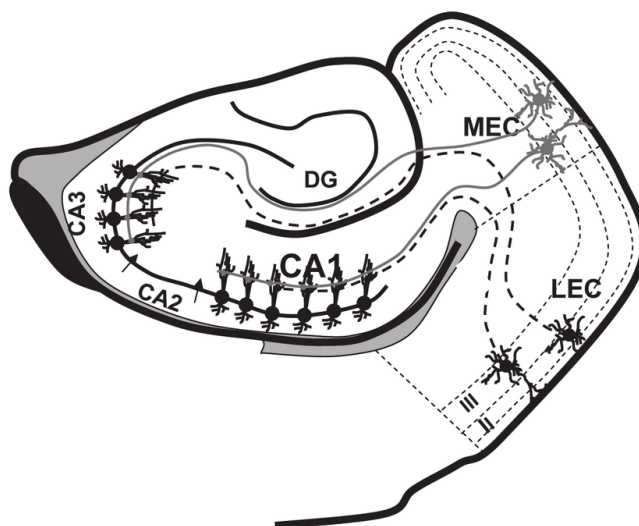
É importante ressaltar que o CE é dividido principalmente em duas porções: o córtex entorrinal lateral (LEC) e o córtex entorrinal medial (MEC), os quais fazem conexão, respectivamente, com o terço externo e o como terço médio da camada molecular do GD. A partir do GD, neurônios da camada molecular fazem aferências para a região CA3 do hipocampo, de onde há aferências para a região de CA1, local de onde partem fibras axonais para o *subiculum*<sup>42</sup>. Essas vias e conexões formam um circuito trissináptico, onde a primeira sinapse acontece entre os neurônios do CE e GD, a segunda entre o GD e o CA3 do hipocampo, e a terceira entre CA3 e CA1, constituindo, assim, o principal circuito de chegada de estímulos ao hipocampo.

De forma alternativa a esse circuito, o CE pode fazer conexão direta com a região CA1 do hipocampo. Nesta via, a região lateral de CE tem projeções que se direcionam para a parte dorsal do hipocampo, enquanto que as da região medial se conectam com a parte ventral.

Essas vias e conexões diretas são particularmente importantes, pois estudos mostram que a via lateral está relacionada com o aprendizado e memória espacial; ao passo que a via medial está ligada com a motivação e as emoções<sup>46</sup>.

As conexões do córtex entorrinal citadas estão representadas na **FIGURA 4**.

**FIGURA 4** - Ligações do Córtex Entorrinal (CE), mostrando as principais conexões do córtex entorrinal lateral (LEC) e córtex entorrinal medial (MEC) para os dendritos apicais dos neurônios do hipocampo em CA1 e CA3. Giro denteado (GD).



**Fonte:** Adaptado de TORREALBA et al 2008<sup>47</sup>.

Independentemente da via utilizada para chegar ao hipocampo, é importante ressaltar que o giro denteado funciona com uma porta de entrada para o hipocampo, pois ele processa e envia todos os estímulos vindos do CE. De fato, essa função pode ser constatada em estudos experimentais, onde a reprodução de lesões ou a inativação do giro denteado resultou em déficits de memória, principalmente de memória espacial<sup>48-49</sup>.

Desta forma, como objetivo do presente trabalho, buscamos avaliar a relação existente entre a redução da atividade mastigatória e alterações qualitativas de células do GD.

### 1.3 ASTRÓCITOS: FUNÇÕES E ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS

Os astrócitos são as células neuroglias mais abundantes no SNC. Constituem um grupo heterogêneo de células que têm subtipos, morfologias, metabolismo e fisiologia diferentes<sup>32</sup>.

Dos subtipos mais importantes, podemos destacar os astrócitos protoplasmáticos e os fibrosos. Os protoplasmáticos são encontrados na substância cinzenta e possuem prolongamentos que envolvem sinapses e vasos sanguíneos. Já os fibrosos estão presentes na substância branca e entram em contato com os nódulos de Ranvier e com os vasos sanguíneos<sup>12</sup>.

Uma característica marcante dos astrócitos, independente do tipo morfológico, é a presença de filamentos intermediários em seus prolongamentos, cujo componente principal é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP – *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Esta proteína tem sido importante nos estudos com astrócitos, sendo alvo de marcações imuno-histoquímicas<sup>14-15</sup>. No presente estudo, também utilizamos este método para identificar astrócitos em cortes de massa encefálica.

Os astrócitos desempenham papéis fundamentais na homeostase do Sistema Nervoso Central. Dentre suas funções, podemos destacar<sup>14</sup>:

- O controle da concentração de diversos íons e neurotransmissores nas fendas sinápticas do SNC, tendo um papel relevante no metabolismo do glutamato e do GABA;
- Capacidade de liberar substâncias próprias, os gliotransmissores;
- Participação como “células-filtro” na barreira hematoencefálica;
- Secreção de fatores tróficos essenciais para a sobrevivência e diferenciação de neurônio, bem como, para o direcionamento de axônios e formação de sinapses<sup>50-51-52-53</sup>;
- Regulação do fluxo sanguíneo no SNC;
- Produção de citocinas inflamatórias;
- Controle metabólitos, como H<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>.

Um número cada vez maior de funções tem sido descobertas e atribuídas aos astrócitos<sup>14</sup>. Sendo assim, é evidente que são células tão importantes quanto os neurônios dentro do SNC. Devido a essa importância, é previsível que alterações

patológicas que afetem essas células possam interferir em processos fisiológicos e, inclusive, sobre aspectos morfológicos e cognitivos.

Esta relação é provada em estudos com animais que se alimentaram por grandes períodos somente com ração farelada<sup>54</sup>. Após o sacrifício dos animais e análise da distribuição laminar de células da região CA1 do hipocampo, foi constatada a distribuição irregular de astrócitos nesses animais quando comparado com os grupos que se alimentaram com rações sólidas durante o estudo.

Em outros trabalhos, foi demonstrado, também, que os astrócitos passaram por mudanças morfológicas, como hipertrofia e hiperplasia, além de alterações funcionais, como maior produção de citocinas inflamatórias, particularmente de IL-1<sup>8,13,31</sup>. Além disso, foi constatado o aumento da produção de GFAP, um marcador conhecido do processo chamado de astrogliose reativa, sinal de resposta astrogliosa patológica<sup>55</sup>. Durante um processo inflamatório no SNC, os astrócitos entram em um “estado reativo”, no qual mudam seu espectro de expressão proteica, produzindo fatores diferentes daqueles produzidos em situações fisiológicas, dentre eles, o GFAP<sup>56</sup>.

O estado reativo é mostrado na **FIGURA 5**, que representa a resposta astrogliosa após lesão no córtex entorrinal. Nesta figura, a aplicação de anticorpos anti-GFAP mostra a produção aumentada desta proteína em astrócitos.

**FIGURA 5** - Estado reativo no giro denteado, ocasionado por lesão no córtex entorrinal.



**Fonte:** adaptado de Diniz *et al* 2016<sup>55</sup> e Wilhelmsson *et al* 2006<sup>57</sup>.

Finalmente, tendo em vista as inúmeras funções astrocitárias relacionadas com a homeostase do SNC, nós examinamos a morfologia dos astrócitos empregando microscopia tridimensional com imunomarcagem para a

proteína ácida fibrilar glial. Com isso, esperamos que alteração da atividade mastigatória modifique a morfologia astrocitária.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL:**

Avaliar a influência que a alteração da atividade mastigatória pode exercer sobre a morfometria de astrócitos da camada molecular do giro denteado em modelo murino jovem.

### **2.2 ESPECÍFICOS:**

a) Investigar se a redução da atividade mastigatória influencia na morfometria dos astrócitos do terço externo da camada molecular do giro denteado.

b) Investigar se a reabilitação da atividade mastigatória altera a morfometria dos astrócitos do terço externo da camada molecular do giro denteado.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi regida segundo os preceitos da lei 11.794/08, que normatiza a utilização e criação de animais para experimentação e os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e está vinculada ao projeto de pesquisa intitulado “Alteração e reabilitação da atividade mastigatória, memória espacial e avaliação da população astrocitária em modelo murino em desenvolvimento e senil”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, sob o parecer nº CEPAE-UFPA 223-14 (**Anexo A**). Este trabalho segue sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Consentino Kronka Sosthenes.

#### 3.2 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo caracteriza-se por ser uma pesquisa experimental com animais. É um trabalho intervencionista, quali-quantitativo e predominantemente analítico, com dados analisados de forma longitudinal prospectiva.

#### 3.3 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Este trabalho integra um amplo Projeto de Pesquisa intitulado “Alteração e reabilitação da atividade mastigatória, memória espacial e avaliação da população astrocitária em modelo murino em desenvolvimento e senil”, desenvolvido nas instalações do Laboratório de Investigações e Neurodegeneração e Infecção da Universidade Federal do Pará, sob a coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Consentino Kronka Sosthenes. Portanto, a criação e formação dos grupos experimentais precederam o atual trabalho.

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos albino-suíços da espécie *Mus musculus*, sendo todos originados de fêmeas grávidas cedidas pelo Instituto Evandro Chagas (IEC). No 5º dia pós-natal, foram selecionados, de forma aleatória, seis filhotes fêmeas de cada ninhada e mantidos com suas nutrizes até o

21º dia pós-natal para amamentação. Em seu devido tempo para desmame, separamos estes animais de sua nutriz para formação dos grupos experimentais. Assim, foi alcançado o total de 15 animais, sendo estes distribuídos de forma igualitária para cada grupo do experimento. Dessa forma, formaram-se três grupos experimentais com 5 animais.

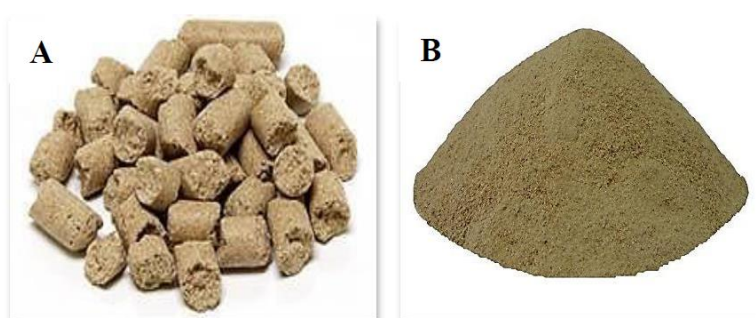
Durante o agrupamento, priorizamos fazer combinações que impedissem a reunião de indivíduos originados da mesma nutriz no mesmo grupo para ter maior variabilidade genética entre os indivíduos de cada agrupamento.

Todos os animais utilizados foram criados, manipulados e testados seguindo-se as normas éticas nacionais e internacionais, nas instalações do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção do Hospital Universitário João de Barros Barreto, da Universidade Federal do Pará.

#### 3.4 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DE ACORDO COM AS DIETAS

No decorrer do tempo, os animais foram agrupados em três grupos diferentes de acordo com o tipo de dieta ofertada ao longo do presente estudo. As dietas foram organizadas a partir da oferta isolada ou combinada, sequencialmente ou não, de dois tipos de rações: a ração *pellet* e a farelada (em pó), representadas na **FIGURA 6**.

**FIGURA 6** - Formas de apresentação das rações utilizadas. (A) ração *pellet* e (B) ração farelada.



Fonte: MENDES, F.C.C.S (2019)<sup>24</sup>.

Destacamos que a diferença entre essas duas rações foi baseada apenas na consistência e na forma de apresentação, não havendo distinção quanto à composição e valor nutricional. Dessa forma, a ração do tipo *pellet* consistiu em uma ração com grânulos endurecidos, ou seja, que estimulam a mastigação por parte do

animal. De forma contrária, a ração farelada exige menor esforço mastigatório dos animais que a consumiram.

Um dos regimes de dieta foi obtido impondo-se a ração peletizada de forma contínua, por seis meses, até o momento de sacrifício dos animais. A este grupo demos o nome de *Hard diet* (HD).

O segundo regime dietético envolveu os dois tipos de ração, porém aplicados de forma sequencial: inicialmente, os animais consumiram somente a ração *pellet* e, posteriormente, somente a ração farelada, sendo este grupo chamado de *Hard diet/Soft diet* (HD/SD). Nesse grupo, a oferta das rações peletizada e farelada foi feita por um período igualmente distribuído de três meses para cada uma, até o sacrifício dos animais.

O terceiro e último grupo de pesquisa foi montado com base na oferta sequencial das reações *pellet*, pó e *pellet* novamente. Nomeamos, então, este grupo como *Hard diet/Soft diet/Hard diet* (HD/SD/HD). Os animais consumiram cada tipo de ração por um período de dois meses para cada uma delas.

Dessa maneira, é possível afirmar que os animais em regime de dieta HD constituíram o grupo controle, sem alteração dietética, até o fim da pesquisa. Aqueles que estavam em HD/SD constituíram o grupo com redução da atividade mastigatória, ao passo que os de HD/SD/HD representaram aqueles submetidos à reabilitação da atividade mastigatória, uma vez que a esses foi novamente requisitada, ao final, a recomposição do esforço mastigatório por conta da oferta de ração peletizada.

Todos os animais tiveram livre acesso à comida e à água, sendo mantidos em espaço com temperatura ambiente controlada ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e 12 horas de ciclo claro-escuro (período claro: 6h -18h; período escuro: 18h - 6h).

### 3.5 OBTENÇÃO E CORTE DE MATERIAL ENCEFÁLICO E ENSAIO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Após a conclusão da aplicação das dietas, os animais seguiram ao sacrifício. Foram anestesiados com cetamina (90-120mg/kg) e xilazina (5-10mg/kg) por via intraperitoneal. Seguiu-se, então, à toracotomia para obter acesso ao coração dos animais, por onde se perfundiu solução de cloreto de sódio a 0,9% junto à heparina sódica 5.000 UI/ml (1 ml de heparina/ 11 de solução fisiológica) por 10 minutos.

Após perda do sangue circulante, seguimos com a solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4) por 30 minutos.

Ao final desta primeira etapa, prosseguimos à craniotomia para retirada do encéfalo e posterior corte do mesmo em séries anatômicas de secções paralelas ao plano transversal. Cada corte foi obtido com a espessura de 60 micrômetros, o que foi feito por microtomia por vibração. Todos os cortes foram coletados e organizados em poços com intervalo de 1:6. Todos os materiais obtidos foram nomeados através de códigos para um ensaio cego, de modo a impedir a identificação do animal e a que grupo ele pertenceu.

Para o procedimento histológico, uma em cada seis secções foi utilizada para imunomarcção para GFAP, para que fossem evidenciados os astrócitos em cada secção. Este procedimento seguiu o protocolo descrito abaixo.

As secções selecionadas foram lavadas em tampão fosfato (PB) 0,1M (pH 7,2-7,4) e posteriormente tratadas para recuperação antigênica em duas etapas. Na primeira, elas foram incubadas durante uma hora em solução de tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) em temperatura entre 85-90°C, obtida através de banho-maria. Após 20 minutos em temperatura ambiente, os cortes foram incubados em solução de Tris-EDTA (pH 9,0) por 12 horas à temperatura de 4°C, em flutuação livre e agitação constante. A partir daí, foram feitas três lavagens, de 5 minutos cada, com tampão fosfato salina Triton (PBST) a uma concentração de 5%, seguida de três lavagens, de 2 minutos cada, com tampão fosfato salina 0,9% (PBS).

Por conta da utilização de anticorpo monoclonal produzido em camundongo, utilizou-se também um protocolo específico para bloqueio de sítios antigênicos não-específicos, o que foi feito utilizando-se o kit de imunodeteção *Mouse on Mouse*, de acordo com as recomendações do fabricante (M.O.M kit, Vector Laboratories, USA). Desta forma, as secções foram bloqueadas com imunoglobulina por uma hora e posteriormente lavadas três vezes em PBS, durante 2 minutos em cada lavagem. A seguir, as secções foram incubadas em concentrado de proteína (M.O.M kit) por 5 minutos e imersas na solução contendo o anticorpo primário (*mouse anti-GFAP monoclonal antibody* MAB360, Millipore Int, USA) e solução de proteína concentrada, (M.O.M kit) diluído em PBS a 1:800 e 1:50, respectivamente, ficando incubadas a 4°C, durante três dias, com agitação contínua e suave.

Após o período de incubação no anticorpo primário em geladeira, as secções foram lavadas três vezes, 2 minutos em cada lavagem em PBS, e incubadas durante 12h na solução contendo o anticorpo secundário de cavalo anti-camundongo biotilado (*secondary antibody* M.O.M kit) e concentrado de proteína (M.O.M kit), diluídos em 1:250 e 1:50, respectivamente em PBS. Sempre em agitação contínua e suave. Em seguida, as secções foram incubadas em solução a 0,9% de peróxido de hidrogênio durante 15 minutos para remoção da peroxidase endógena e redução da reação de fundo (*background*) e então, lavadas em PBS três vezes, por 2 minutos cada.

Posteriormente, as secções foram transferidas para solução com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC, Vector Laboratories, USA, 1:200) por uma hora até serem lavadas novamente 3 vezes em PB 0,1M, 2 minutos cada.

Seguiu-se, então, uma lavagem de 5 minutos em tampão acetato 0,2M (pH 6,0) e, finalmente, as secções foram processadas para a imunohistoquímica com peroxidase utilizando como cromógeno a diaminobenzidina (DAB) intensificada pelo níquel (SHU et al., 1988). Essa reação utiliza a liberação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a partir da conversão enzimática da D-glicose em ácido glucônico para precipitar o cromógeno nos sítios ligados à peroxidase.

Concluída a imunomarcção para GFAP, as secções processadas foram montadas em lâminas gelatinizadas e desidratadas através da imersão em solução de álcool etílico absoluto diluído em crescentes concentrações.

Finalizado o processo de desidratação, as lâminas foram seladas com lamínula e meio de inclusão (Entelan Merck®).

### 3.6 RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS ASTRÓCITOS

Com o auxílio do software *NeuroLucida* (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, EUA), instalado em um computador conectado a um microscópio NIKON Eclipse 80i (Nikon, Japão) equipado com uma placa motorizada (MAC6000, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, EUA), os astrócitos foram reconstruídos com objetiva de grande aumento Pan Fluoreto de 100x, de alta resolução e pequena profundidade de foco (Nikon, NA 1,3; DF = 0,16 picômetros). Com o intuito de garantir a análise da área selecionada para pesquisa, a camada molecular do giro denteado, utilizou-se

primeiramente uma objetiva de menor aumento (4x de alta resolução, Nikon, NA 0,13; DF = 17,2 picômetros).

Com a objetiva de menor aumento, seguimos a identificação da camada molecular e à contabilização de quantas secções detinham esta camada. As secções que não a detinham não foram utilizadas para análise. Nas secções que a detinha, a camada molecular foi dividida, virtualmente, em três partes iguais para evidenciar os limites anatômicos do seu terço mais externo, região de eleição para a análise morfométrica. Posteriormente, fizemos o contorno desta região em cada secção e foi calculada sua área total para reconstrução em cada animal.

Considerando que deveriam ser reconstruídas 30 células por animal, calculamos quantas células deveriam ser reconstruídas por secção, tomando como critério de eleição a proporcionalidade à área de cada uma delas. Esse cálculo foi feito por meio da fórmula:

$$Q = \frac{Ax * 30}{\Sigma A1 + A2 + A3 + \dots + Ax}$$

Onde:

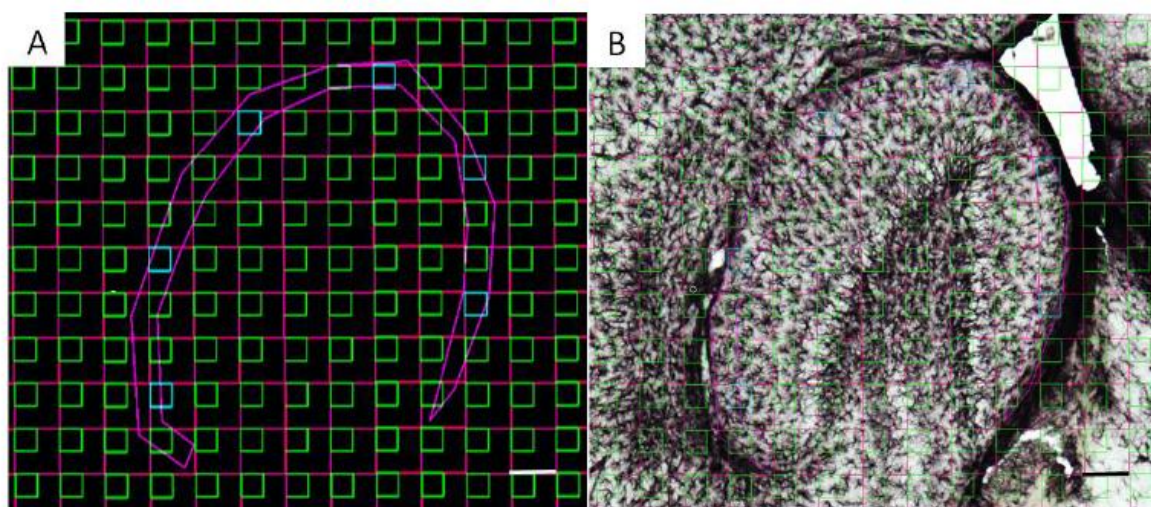
Q = número de células reconstruídas;

A = área de uma dada secção;

x = secção que se deseja estimar o número de células a ser reconstruída.

Em seguida, fez-se necessário escolher quais dessas células deveriam ser reconstruídas tridimensionalmente. Solucionamos este problema distribuindo uma malha virtual com caixas de dimensões 50 x 50 micrômetros e distanciadas entre si por 50 micrômetros. As caixas selecionadas para reconstrução foram aquelas que tiveram distribuição simétrica em relação à área de interesse, conforme a **FIGURA 7** abaixo.

**FIGURA 7** - Malha virtual com quadrados de dimensões de 50 x 50 micrômetros, utilizada para selecionar qual astrócito seria reconstruído.



(A) A demarcação do 1/3 externo da camada molecular do giro denteado é feita na cor rosa. Em azul, estão as caixas de dimensões 50 x 50 micrômetros de onde foram escolhidos os astrócitos para a reconstrução. (B) Secção cerebral da espécie *Mus musculus* imunomarcada com anti-GFAP. Em azul, os quadrados contendo os astrócitos que foram escolhidos conforme critérios descritos.

**Fonte:** MENDES, F.C.C.S (2019)<sup>24</sup>.

Assim, do interior de cada caixa, foi selecionado apenas um astrócito, priorizando aquele que estivesse localizado mais próximo do centro da caixa e, sem dúvidas, no 1/3 externo da camada molecular do giro denteado. Também foi critério de escolha aquela célula que não tivesse clara ligação com vasos, dado que os astrócitos de interesse deveriam ter morfologia protoplasmática e, assim, evitamos aqueles com assimetrias muito grandes que, em geral, caracterizam os astrócitos vasculares. Além disso, foram excluídas as células que tiveram ramificações cortadas durante a etapa de geração das secções anatômicas e aquelas que foram imunomarcadas incompletamente.

Nas situações em que não houvesse células dentro da caixa, escolhemos reconstruir aquela imediatamente mais próxima às bordas da caixa, obedecendo aos mesmos critérios acima descritos.

Finalmente, realizada a escolha das células a serem reconstruídas, passava-se à lente de aumento de 100x, momento em que se fez a reconstrução celular tridimensional digitalmente, respeitando a arquitetura celular, a localização da célula e a morfologia de seus ramos no espaço tridimensional.

Ao final destes procedimentos, obtivemos a reconstituição de 450 astrócitos.

### 3.7 ANÁLISE DA RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL DOS ASTRÓCITOS

Para fins de análise da reconstrução tridimensional, utilizamos o programa computacional *NeuroLucida Explorer* (MBF Bioscience Inc., Frederick, MD, EUA). Este *software* permite a análise de, aproximadamente, 30 variáveis celulares qualitativas e quantitativas, como área do soma, perímetro do soma, segmentos astrocitários, número total de segmentos, comprimento dos ramos, tortuosidade, entre outras.

No entanto, para padronizar a análise celular, foi necessário identificar as variáveis que fossem multimodais e comuns a todos os grupos. Para escolher as variáveis multimodais, utilizamos o índice de multimodalidade (MMI), que foi calculado conforme a fórmula abaixo:

$$MMI = \frac{[S^2 + 1]}{\{C + 3 [(n - 1)^2 / (n - 2) (n - 3)]\}}$$

Onde:

MMI = Índice de multimodalidade;  
 S = Simetria;  
 C = curtose;  
 n = número de células.

A curtose e a simetria são medidas que descrevem a forma de uma curva de distribuição de dados e são essenciais para determinar se uma distribuição é unimodal, bimodal ou multimodal. Assim, caso o MMI seja maior que 0,55, a distribuição é dita como pelo menos bimodal, podendo ser multimodal. Dessa forma, as variáveis morfométricas que tivessem MMI maior que 0,55 foram escolhidas para análise estatística.

Identificadas as variáveis multimodais, seguimos à análise hierárquica de conglomerados (de *cluster*) pelo método de Ward com variáveis padronizadas. O objetivo desta análise foi classificar os astrócitos quanto à sua morfologia e diferenciar quantos fenótipos morfológicos diferentes foram apontados durante a análise, feita com base nas variáveis morfométricas selecionadas.

A seguir, os dados foram submetidos à análise discriminante, uma técnica da estatística multivariada usada para distinguir e classificar objetos. No caso deste

estudo, esta análise foi útil para identificar qual das variáveis morfométricas analisadas mais contribuiu para a formação dos agrupamentos.

Posteriormente, todos os dados obtidos foram analisados através do *software* de estatística Statistica 7.1 (Copyright® StatSoft, Inc.,2005) e BioEstat, na sua versão 5.3.

## 4 RESULTADOS

Foram analisadas, no total, 30 variáveis morfológicas (Quadro 1).

**QUADRO 1:** Medidas morfológicas microscópicas obtidas a partir de reconstruções tridimensionais dos astrócitos.

<b>VARIÁVEL MORFOLÓGICA</b>	<b>INTERPRETAÇÃO</b>
<b>Área do soma</b>	Refere-se à área da secção transversal bi-dimensional, contida dentro da fronteira do corpo celular.
<b>Perímetro do soma</b>	Comprimento do contorno que representa o corpo celular.
<b>Feret máx/mín do soma</b>	Diâmetros Feret máximo e mínimo, respectivamente. São dimensões do corpo da célula, como se um compasso fosse usado para medir transversalmente o maior e o menor diâmetro. As duas medições são independentes uma da outra e não há necessariamente ângulos retos entre elas.
<b>Índice de aspecto do soma</b>	$= \frac{[\text{diâmetro Min}]}{[\text{diâmetro Max}]}$ Indica o grau de achatamento do corpo da célula: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Faixa de valores entre 0-1.</li> <li>• Um círculo tem uma proporção de 1.</li> </ul>
<b>Compactação do soma</b>	$\text{Compactação} = \frac{\sqrt{(4\pi) \times \text{área}}}{\text{diâmetro máx.}}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Faixa de valores entre 0-1.</li> <li>• Um círculo tem uma forma mais compacta (=1).</li> </ul>
<b>Convexidade do soma</b>	$\text{Convexidade} = \frac{[\text{Convex. Perímetro}]}{[\text{Perímetro}]}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Um objeto completamente convexo não tem entalhes, tendo um valor de convexidade = 1 (por exemplo: círculos, elipses e quadrados).</li> <li>• Objetos côncavos tem convexidade com valores inferiores a 1.</li> <li>• Contornos com baixa convexidade tem uma grande superfície entre as áreas internas e externas.</li> </ul>
<b>Fator de forma do soma</b>	$\text{Fator da forma} = \frac{4\pi \times \text{área}}{\text{Perímetro}^2}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tal qual a forma de um contorno que se aproxima de um círculo perfeito, esse valor se aproxima de um máximo de 1,0.</li> <li>• À medida que a forma do contorno se achata, esse valor se aproxima de 0.</li> </ul>
<b>Esfericidade do soma</b>	$\text{Arredondamento} = [\text{Compacidade}]^2$ É usado para diferenciar objetos que possuem valores de compacidade pequenos.

<b>Solidez do soma</b>	$\text{Solidez} = \frac{[\text{Área}]}{[\text{Convex. Área}]}$ <p>A área delimitada por um 'elástico' esticado em torno de um contorno é chamado de área convexa.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Círculos, quadrados e elipses têm uma solidez = 1.</li> </ul>
<b>Segmento</b>	Qualquer porção da estrutura astrocítica ramificada, com terminações que são nós ou terminações sem nós intermediários.
<b>Segmentos/mm</b>	Número de segmentos / comprimento total dos segmentos expressos em milímetros.
<b>Nº de Árvores</b>	Número de árvores nos astrócitos.
<b>Nº Total de Segmentos</b>	Referem-se ao número total de segmentos da árvore.
<b>Comprimento dos Ramos</b>	Comprimento total da linha dos segmentos utilizados para traçar o ramo de interesse.
<b>Comprimento Médio dos Ramos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	Média = $[\text{Comprimento total}] / [\text{Número de ramos}]$
<b>Comprimento Total dos Ramos (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	Comprimento total de todos os ramos da árvore.
<b>Tortuosidade</b>	= $[\text{Comprimento real do segmento}] / [\text{Distância entre os pontos finais do segmento}]$ . O menor valor é 1; isso representa um segmento reto. A tortuosidade permite comparar segmentos de diferentes comprimentos em termos da complexidade dos caminhos que eles tomam.
<b>Área de Superfície Média dos Ramos (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	Calculado pela modelagem de cada ramo como se fosse um tronco, dividido pelo número de ramos.
<b>Área de Superfície Total das Árvores (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	Área de superfície 2D da árvore de um astrócito, calculado com base na área definida pelas extremidades de todas as árvores.
<b>Volume dos Ramos (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	Calculado pela modelagem de cada peça, de cada ramo como um tronco.
<b>Volume Total dos Ramos</b>	O volume total para todos os ramos da árvore.
<b>Diâmetro da Base dos Ramos Primários (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	Diâmetro da base do 1º segmento.
<b>Ângulo Planar</b>	Calculado com base nos pontos de extremidade dos segmentos. Refere-se à mudança de direção de um segmento em relação ao segmento anterior.
<b>Dimensão fractal</b>	o "K-dim" da análise fractal descreve a forma como a estrutura de interesse preenche o espaço. Diferenças estatísticas significativas em K-dim sugerem dissimilaridades morfológicas.

<b>Convex Hull - Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>), Área (<math>\mu\text{m}^2</math>) 2D, Área de Superfície (<math>\mu\text{m}^2</math>) 3D e Volume (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	Mede o tamanho do campo de ramificação interpretando uma estrutura ramificada como um objeto sólido que controla uma determinada quantidade de espaço físico. A quantidade de espaço físico é definida em termos de volume, área de superfície, área e/ou perímetro.
<b>Análise dos Vértices</b>	Descreve a estrutura geral de um objeto ramificado com base em propriedades topográficas e métricas. Ponto de raiz (ou origem): Para neurônios, micróglia ou astrócitos, a origem é o ponto em que a estrutura está ligada ao soma. Principais tipos de vértices: Vd (bifurcação) ou Vt (trifurcação): Pontos nodais (ou ramificados). Vp: vértices terminais (ou pendentes). Va: vértices primários, conectando-se a 2 vértices pendentes; Vb: vértices secundários que ligam um vértice pendente (Vp) a uma bifurcação (Vd) ou uma trifurcação (Vt); Vc: vértices terciários que conectam quer 2 bifurcações (Vd), 2 trifurcações (Vt), ou 1 bifurcação (Vd) e 1 trifurcação (Vt). No presente relatório, medimos o número de vértices Va, Vb e Vc.
<b>Complexidade</b>	Complexidade = [Soma das ordens terminais + Número de terminais] $\times$ [Comprimento total da ramificação / Número de ramos primários]

Para todas as variáveis acima, calculamos o MMI para identificação de quais eram multimodais. A identificação dessas se encontra na **Tabela 1**, bem como, o resultado da análise discriminante (p-level). Notar que a complexidade se mostrou a variável morfológica mais importante para o agrupamento dos astrócitos em subtipos celulares.

**TABELA 1** - Dados obtidos a partir da análise discriminante feita nas variáveis morfológicas com MMI > 0,55 para todos os grupos experimentais.

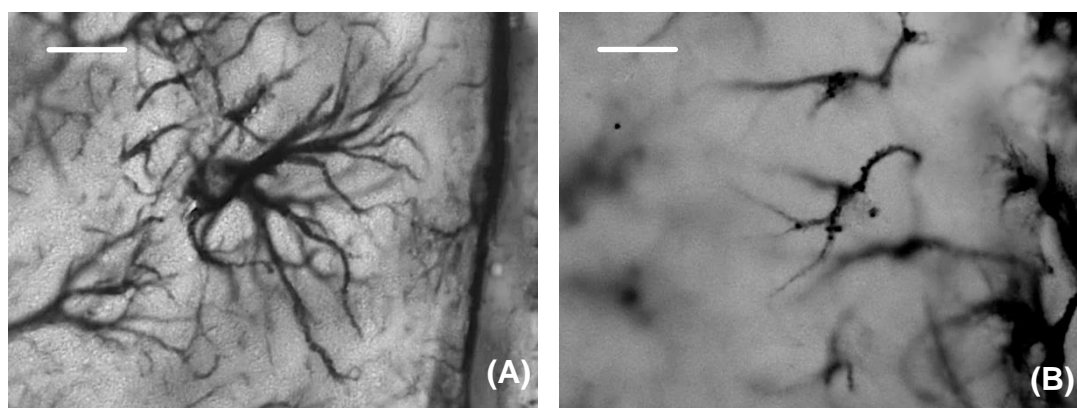
	Wilks Lambda	Partial lambda	F- remove	p-Level	Toler	1-Toler
<b>GRUPO HD</b>						
<b>Volume total dos ramos</b>	0,306286	0,997065	0,4268	0,514602	0,689593	0,310407
<b>Convexidade do soma</b>	0,309650	0,986236	2,0237	0,157013	0,948610	0,051390
<b>Solidez do soma</b>	0,305395	0,999976	0,0035	0,952730	0,959636	0,040364
<b>Complexidade</b>	0,646897	0,472080	162,1511	0,000000	0,683340	0,316660
<b>GRUPO HD/SD</b>						
<b>Solidez do soma</b>	0,401628	0,989939	1,4940	0,223547	0,994214	0,005786
<b>Complexidade</b>	0,995693	0,399307	221,1380	0,000000	0,994214	0,005786

	GRUPO HD/SD/HD					
<b>Tortuosidade</b>	0,390503	0,998292	0,2480	0,619210	0,789471	0,210529
<b>Convexidade do soma</b>	0,394847	0,987309	1,8638	0,174298	0,808723	0,191277
<b>Complexidade</b>	0,775535	0,502667	143,4614	0,000000	0,918395	0,081605
<b>Convex-Hull - Volume</b>	0,488752	0,797615	36,7920	0,000000	0,965940	0,034060

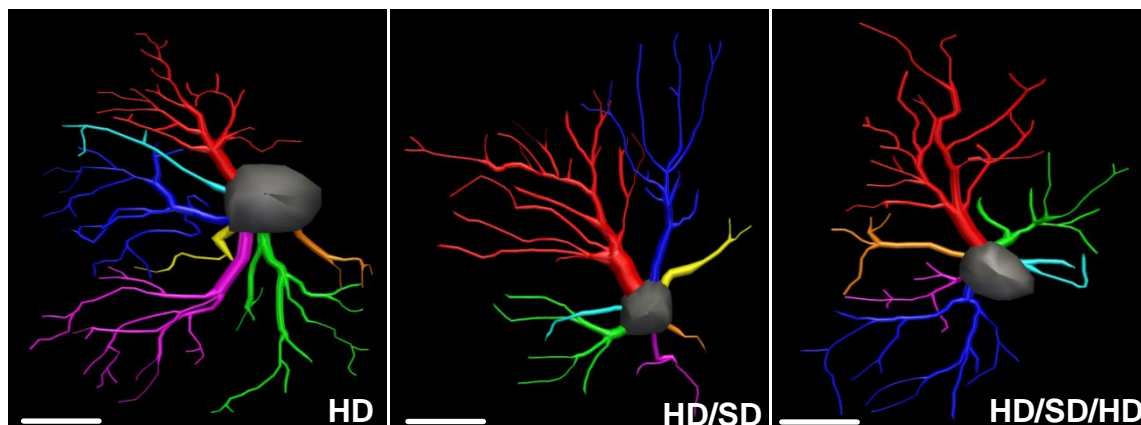
A análise de *cluster*, por sua vez, demonstrou a existência de 2 tipos astrocitários com morfologias diferentes dentro de cada grupo experimental: um tipo mais complexo, chamado de Tipo I, e um menos complexo, chamado de Tipo II. Esta nomenclatura está de acordo com a vinculação de complexidade utilizada em outros estudos científicos<sup>55</sup>.

A representação destes subtipos astrocitários em microscopia óptica e sua reconstrução tridimensional estão, respectivamente, nas **FIGURAS 8, 9 e 10**.

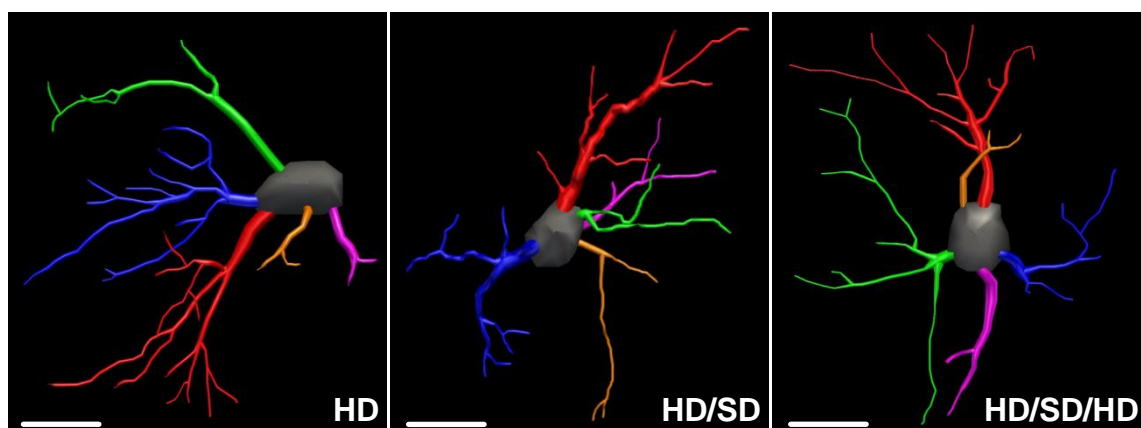
**FIGURA 8** - Micrografia óptica dos tipos astrocitários I (A) e II (B). Note que os astrócitos do tipo I tem um grande número de ramificações, ao passo que os astrócitos do tipo II têm uma quantidade menor de prolongamentos. Barra de escala = 22  $\mu$ m



**FIGURA 9** - Reconstrução tridimensional dos astrócitos do tipo I conforme o grupo experimental. Barra de escala = 2,7 $\mu$ m



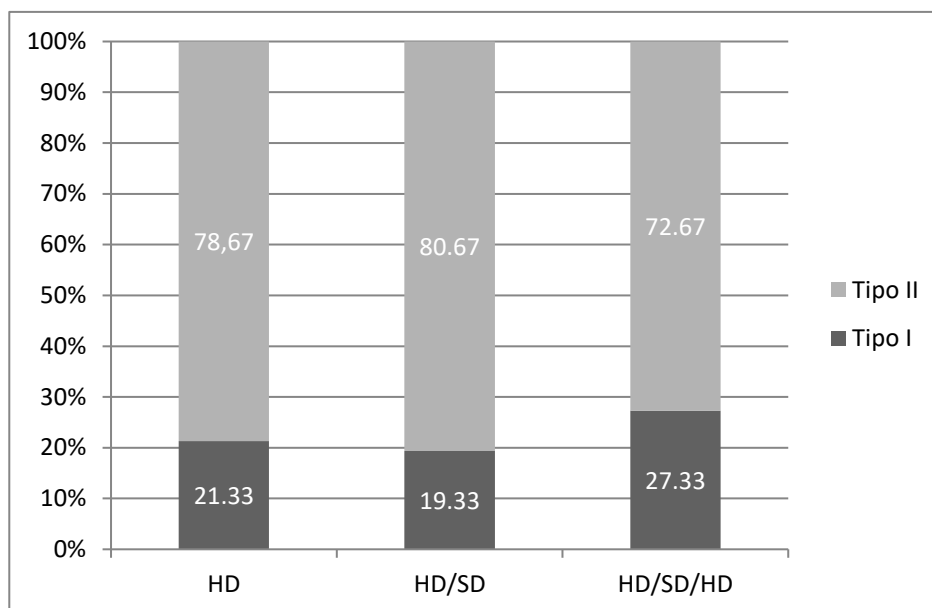
**FIGURA 10** - Reconstrução tridimensional dos astrócitos do tipo II conforme o grupo experimental. Barra de escala = 2,7 $\mu$ m



Aliado a isso, verificamos uma quantidade variada desses subtipos celulares entre os grupos experimentais (**TABELA 2** e a **FIGURA 11**). Os astrócitos do tipo II foram predominantes em relação aos do tipo I em todos os grupos.

**TABELA 2** - Quantidade de astrócitos tipo I e II por grupo experimental.

	HD	HD/SD	HD/SD/HD	Total:
<b>Tipo I</b>	32	29	41	102
<b>Tipo II</b>	118	121	109	348
<b>Total:</b>	150 células por grupo experimental			

**FIGURA 11** - Quantidade relativa de astrócitos do tipo I e II de acordo como grupo experimental.

Posteriormente, verificamos se havia diferença significativa entre a complexidade dos astrócitos tipo I e II para cada grupo experimental. Nesse sentido, ao realizar o teste t para amostras independentes entre eles, vimos que os astrócitos do tipo I foram significativamente mais complexos que os do tipo II.

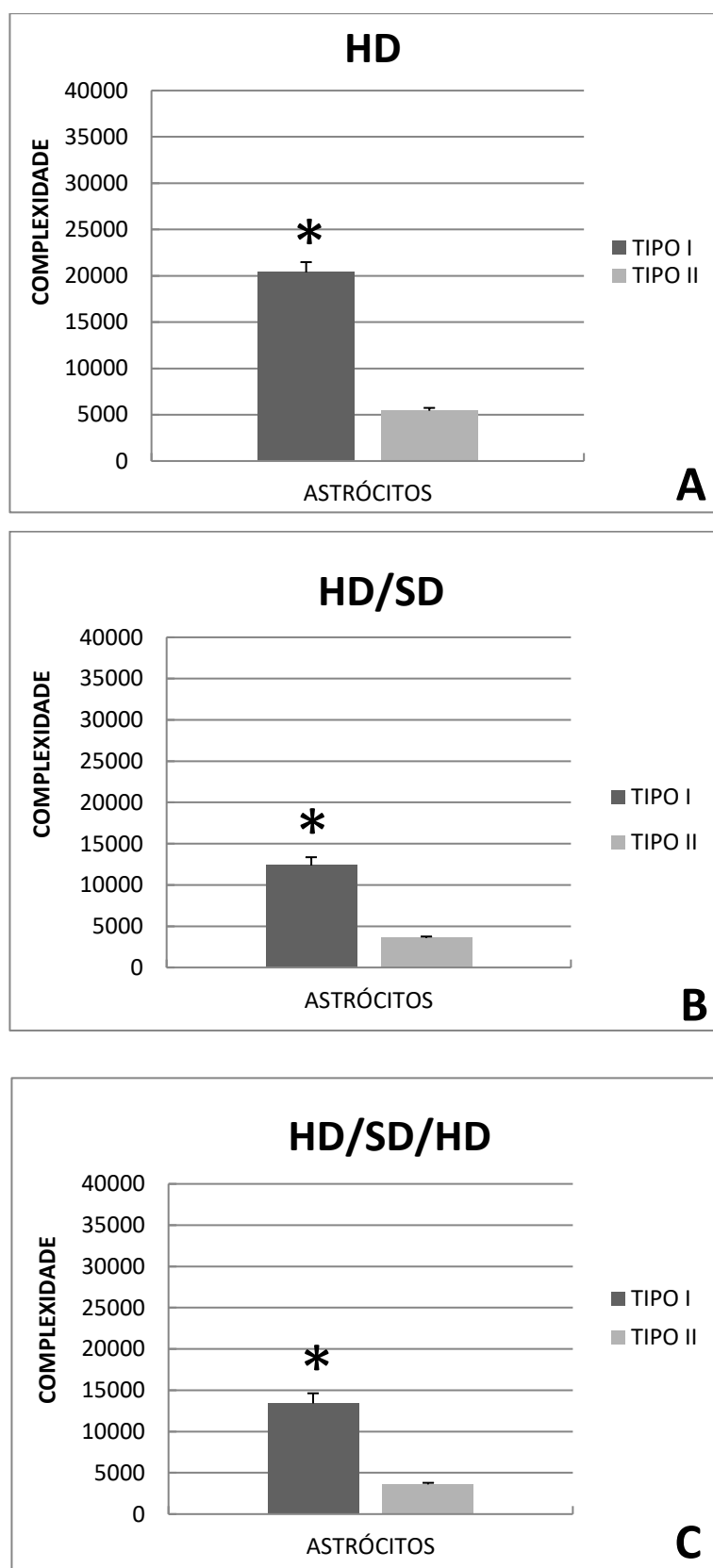
Os resultados de complexidade média, erro-padrão e valores de significância para amostras independentes estão representados conforme a **TABELA 3**.

**TABELA 3** - Valores de complexidade, desvio-padrão e significância para teste t entre os astrócitos do tipo I e II, para grupos experimentais de mesma dieta.

Grupo	Tipo I	Tipo II	Teste-t para amostras independentes
HD	20.368,17 ± 1.107,49	5.426,33 ± 308.83	t(36) = 13 p < 0,0001
HD/SD	12.359,72 ± 999,59	3.588,68 ± 165,27	t(30) = 8,66 p < 0,0001
HD/SD/HD	13.409,92 ± 1.220,67	3.598,57 ± 187,67	t(42) = 7,94 p < 0,0001

A representação gráfica destes achados é mostrada na **FIGURA 12** de acordo com o grupo experimental.

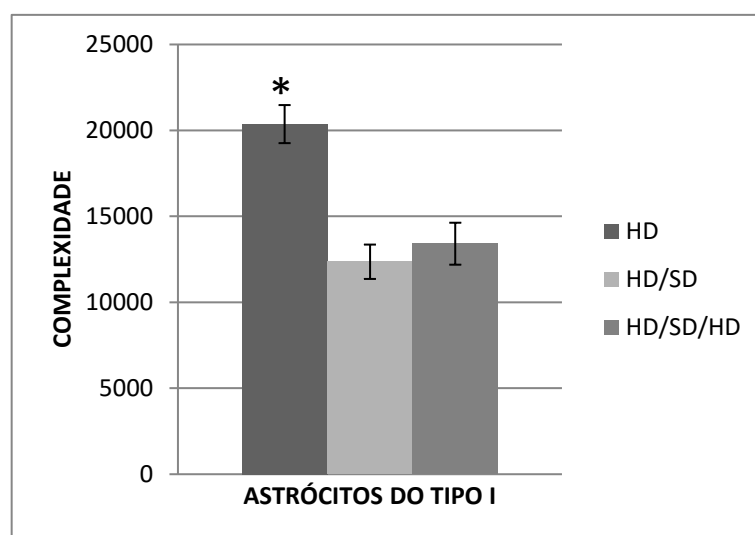
**FIGURA 12** - Representação gráfica da complexidade astrocitária entre os astrócitos do tipo I e II no grupo HD (A), HD/SD (B) e HD/SD/HD (C). Em todos os grupos, os astrócitos do tipo I apresentaram maior complexidade média (\* =  $p < 0,05$ ).



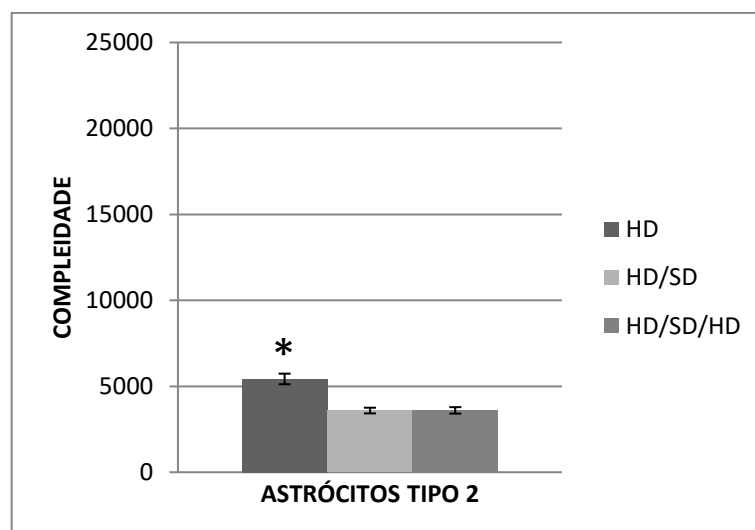
Por fim, os astrócitos do tipo I de cada grupo experimental também foram comparados entre si. Os resultados mostraram que o grupo HD apresentou maior complexidade em comparação os grupos HD/SD e HD/SD/HD. Em relação aos astrócitos do tipo II, as análises também mostraram igualmente diferença de complexidade entre eles, sendo os mais complexos os do grupo HD.

A representação destes achados está apresentada na **FIGURA 13** e **FIGURA 14**, respectivamente.

**FIGURA 13** - Diferença de complexidade média entre os astrócitos do tipo I por grupo experimental. O grupo HD obteve a maior complexidade em relação aos astrócitos do tipo I, seguido pelo grupo HD/SD/HD e pelo grupo HD/SD. (\* =  $p < 0,05$ ).



**FIGURA 14** - Diferença de complexidade média entre os astrócitos do tipo II por grupo experimental. O grupo HD obteve a maior complexidade em relação aos astrócitos do tipo II, seguido pelo grupo HD/SD/HD e pelo grupo HD/SD. (\* =  $p < 0,05$ ).



Os resultados de complexidade média, erro-padrão e valores de significância para amostras pareadas estão representados conforme a **TABELA 4**.

**TABELA 4** - Valores de complexidade, desvio-padrão e significância na comparação de grupos experimentais com dietas diferentes, porém o mesmo subtipo celular (ANOVA-*one way*, teste t post hoc).

Grupo	Tipo I	Tipo II
HD	20.368,17 ± 1.107,49	5.426,33 ± 308.83
HD/SD	12.359,72 ± 999,59	3.588,68 ± 165,27
HD/SD/HD	13.409,92 ± 1.220,67	3.598,57 ± 187,67
	$F_{(2,99)} = 13,50$ $p < 0,001$	$F_{(2,345)} = 21,24$ $p < 0,0001$
<b>Teste</b>	$t_{(59)} = 4,65$ (HD vs HD/SD); $p < 0,001$ $t_{(71)} = 4,39$ (HD vs HD/SD/HD) ; $p < 0,001$ $t_{(68)} = 0,64$ (HD/SD vs HD/SD/HD) ; $p > 0,05$	$t_{(237)} = 5,72$ (HD vs HD/SD); $p < 0,01$ $t_{(225)} = 5,54$ (HD vs HD/SD/HD) ; $p < 0,01$ $t_{(228)} = 0,03$ (HD/SD vs HD/SD/HD) ; $p > 0,05$

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, testamos a hipótese de que a redução da atividade mastigatória modifica a morfometria dos astrócitos da camada molecular do giro denteado do hipocampo.

De fato, investigar esta hipótese encontra sustentação na literatura científica, onde estudos indicam que a mudança do ato de mastigar resulta em alteração cognitiva e celular no hipocampo<sup>3-4-5-6-7-26,29,55</sup>.

Como exemplo desses resultados, podemos citar as alterações astrocitárias na região de CA1 causadas pela alteração da mastigação em modelo murino, constatando-se, também, degeneração hipocampal, decréscimo na quantidade de células progenitoras neuronais em CA1 e CA3 e a diminuição da densidade neuronal em CA1<sup>7-8,11,58</sup>.

Dentre as alterações cognitivas que convergem com estes resultados, um dos trabalhos publicados mais recentes<sup>26</sup> também mostrou que a redução da atividade mastigatória impacta negativamente na memória de longo prazo e na memória espacial de camundongos jovens, reforçando o achado de outra pesquisa, onde se trabalhou com animais com 12 meses de vida, alimentados com dieta farelada ou sólida, os quais concluíram que aqueles que se alimentaram com ração farelada obtiveram piores resultados em testes cognitivos, com baixo rendimento em testes de memória espacial, ao passo que aqueles que se alimentavam com dieta sólida apresentaram os melhores rendimentos<sup>28</sup>.

Portanto, podemos sugerir que, devido a estes resultados, há evidências de que a alteração da atividade mastigatória pode causar alterações significativas no SNC, principalmente nas regiões do hipocampo, afetando células neuronais e astrócitos, os quais desempenham importantes funções nesta região, já citadas anteriormente.

No presente trabalho, a análise da reconstrução tridimensional e a análise hierárquica de *cluster*, mostrou que os astrócitos da camada molecular do giro denteado apresentaram alterações qualitativas. Duas morfologias diferentes foram observadas nos grupos experimentais, sendo nomeados os astrócitos como tipo I (mais complexos) e tipo II (menos complexos).

Aliado a isso, vimos que a mastigação desempenha um papel fundamental também na manutenção da morfologia astrocitária, uma vez que o grupo controle

HD, que não foi submetido a alteração da mastigação, também não sofreu redução da complexidade dos ramos astrocitários. Nesse sentido, especulamos que esse achado possa estar relacionado ao motivo pelo qual animais que mantêm a mastigação detêm os melhores resultados em testes cognitivos<sup>10,20,22,24</sup>

De forma semelhante, um estudo<sup>29</sup> com animais mais jovens (três meses de idade) constatou que a dieta farelada causou impacto negativo na formação de sinapses no córtex cerebral nestes animais, resultando em menos conexões sinápticas nesta região.

Portanto, há evidências suficientes para sustentar que a redução da atividade mastigatória está relacionada ao declínio cognitivo tanto em animais jovens como em animais senis.

Curiosamente, entretanto, o grupo HD/SD/HD também sofreu modificações morfológicas em relação ao grupo HD. No entanto, essas modificações foram ligeiramente menos intensas quando comparadas às sofridas pelo grupo HD/SD.

Os estudos sobre reabilitação mastigatória mostram que é possível recuperar parte da perda cognitiva com a reinserção da dieta peletizada aos animais<sup>24,59</sup>, onde os animais, novos ou senis, que sofreram reabilitação mastigatória, tiveram a *performance* melhorada em testes cognitivos de memória espacial.

Outros estudos mostram, também, que os animais do grupo HD/SD/HD podem obter resultados semelhantes aos do grupo controle HD nos mesmos testes quando há reinserção da dieta pelletizada<sup>60</sup>.

Os mecanismos por trás desses fenômenos também já foram sugeridos, sendo destacado um incremento de volume sanguíneo em áreas cerebrais e que a mastigação pode prevenir a degeneração cerebral<sup>11</sup>. Outro possível mecanismo foi descrito em 2012, em um trabalho que sustentou a hipótese de que a mastigação é um processo que aumenta a sobrevivência de células-tronco no giro denteado do hipocampo, células que participam do processo de neurogênese nesta região, mantendo sua integridade<sup>50</sup>.

Os resultados de nossa pesquisa não chegaram a estas conclusões, pois o grupo HD/SD/HD, em sua análise estatística, obteve resultados semelhantes aos do grupo HD/SD, não chegando à complexidade celular do grupo HD, como demonstrado por trabalhos anteriores<sup>49,50</sup>. Porém, ressaltamos que a explicação

para esse fato pode decorrer da análise feita de apenas uma região da formação hipocampal que participa de processos cognitivos e que, então, o processo de reabilitação mastigatória pode envolver outras áreas do Sistema Nervoso Central ficando a sugestão de novas análises celulares e moleculares para trabalhos futuros.

## 6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto os resultados obtidos, concluímos que:

- No terço externo da camada molecular do giro denteado existem dois subtipos celulares de astrócitos (um de maior e outro de menor complexidade);
- A mastigação é um potencial fator influenciador na manutenção da alta complexidade astrocitária, conforme demonstram os resultados do grupo HD.
- A redução da atividade mastigatória diminui a complexidade e o número de ramos de astrócitos, resultado representado principalmente pelas alterações do grupo HD/SD.
- A reabilitação mastigatória é um fator em potencial que pode restaurar parcialmente a complexidade astrocitária, conclusão obtida a partir dos resultados do grupo HD/SD/HD.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DOUGLAS, Carlos. Tratado de Fisiologia Aplicada às Ciências Médicas. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
2. TORTORA, Gerard. Princípios de Anatomia e Fisiologia. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010
3. MIURA H; YAMASAKI, K; KARIYASU, M; MIURA, K; SUMI, Y. Relationship between cognitive function and mastication in elderly females. *Journal of Oral Rehabilitation* 30 (2003) 808-811.
4. COSTA, Ana Cássia Reis da; RODRIGUES, Márcia Cristina dos Santos Guerra; LIMA, Rafael Rodrigues. Deficiência da capacidade mastigatória e sua influência sobre memória e aprendizagem: revisão de literatura. *Rev. Para. Med.*, Belém , v. 20, n. 3, p. 51-54, set. 2006.
5. KATO T; USAMI T; NODA Y; HASEGAWA M; UEDA M., NABESHIMA, T. The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. *Behavioural Brain Research* 83 (1997) 239-242.
6. ONOZUKA, M; WATANABE, K; MIRBOD, SM; OZONO, S; NISHIYAMA, K; KARASAWA. N; NAGATSU, I. Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. *Brain Research* 826 (1999) 148-153.
7. KUBO, K. Y. et al. Molarless-induced changes of spines in hippocampal region of SAMP8 mice. *Brain Res.*, v. 1057, n. 1-2, p. 191-195, 2005.
8. ONO, Y., YAMAMOTO, T., KUBO, K. -y., & ONOZUKA, M. (2010). Occlusion and brain function: mastication as a prevention of cognitive dysfunction. *Journal of Oral*.
9. TEIXEIRA, F. B. et al. Masticatory Deficiency as a Risk Factor for Cognitive Dysfunction. *International Journal of Medical Sciences*, 11(2), 209–214, 2014.
10. Shiratori, L. N., Marotti, J., Mukai, M. K., Tortamano Neto, P., Gil, C., & Mori, M. (2010). A importância da mastigação na doença de Alzheimer. *RPG. Revista de Pós-Graduação*, 17(3), 163-166.
11. Oliveira, A. C. D. (2014). Correlação entre qualidade de vida e alterações de fala, deglutição e cognição em indivíduos com doença de Parkinson.
12. MACHADO, Angelo. Neuroanatomia Funcional: Texto e Atlas. 3ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.
13. ONOZUKA, M. et al. Impairment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice. *Behav Brain Res.*, v. 108, n. 2, p. 145-155, 2000.

14. GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, Vanessa Pereira; DINIZ, Luan. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estud. av.*, São Paulo, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.
15. LEMOS, Karen Regina; ALESSI, Antonio Carlos. Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em sistema nervoso central de equinos normais e de equinos com leucoencefalomalácia. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3-4, p. 104-108, July 1999.
16. Montgomery, D. L. (1994). *Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. Veterinary Pathology*, 31(2), 145–167.
17. Kimelberg, H. K., & Nedergaard, M. (2010). *Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. Neurotherapeutics*, 7(4), 338–353.
18. HIRANO, Y. *et al.* Effects of chewing on cognitive processing speed. *Brain Cogn*, v. 81, n. 3, p. 376-81, 2013.
19. Viggiano, A., Manara, R., Conforti, R., Paccone, A., Secondulfo, C., Lorusso, L., ... Esposito, F. (2015). *Mastication induces long-term increases in blood perfusion of the trigeminal principal nucleus. Neuroscience*, 311, 75–80.
20. Miyamoto, I., Yoshida, K., Tsuboi, Y., & Iizuka, T. (2005). Rehabilitation with dental prosthesis can increase cerebral regional blood volume. *Clinical Oral Implants Research*, 16(6), 723–727.
21. Onozuka, M., Fujita, M., Watanabe, K., Hirano, Y., Niwa, M., Nishiyama, K., & Saito, S. (2003). Age-related Changes in Brain Regional Activity during Chewing: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *Journal of Dental Research*, 82(8), 657–660.
22. WATANABE, K. *et al.* Evidence for involvement of dysfunctional teeth in the senile process in the hippocampus of SAMP8 mice. *Exp. Gerontol.*, v.36, n.2, p.283-295, 2001.
23. Frota de Almeida, M., de Siqueira Mendes, F., Gurgel Felício, A., Falsoni, M., Ferreira de Andrade, M., Bento-Torres, J., ... Kronka Sosthenes, M. (2012). Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes. *BMC Neuroscience*, 13(1), 23.
24. MENDES, Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira *et al.* Influencia da atividade mastigatória e do ambiente enriquecido sobre o aprendizado espacial e a morfometria dos astrócitos do giro denteado em modelo murino senil.
25. KUBO, K. Y. *et al.* Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice. *Neurosci Lett*, v. 414, n. 2, p 188-191, 2007.

26. Fukushima-Nakayama, Y., Ono, T., Hayashi, M., Inoue, M., Wake, H., Ono, T., & Nakashima, T. (2017). Reduced Mastication Impairs Memory Function. *Journal of Dental Research*, 96(9), 1058–1066.
27. ICKES, B. et al. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental Neurology* 164: 45–52, 2000.
28. Tsutsui K, Kaku M, Motokawa M, Tohma Y, Kawata T, Fujita T et al. Influences of reduced masticatory sensory input from soft-diet feeding upon spatial memory/learning ability in mice. *Biomed Res.* 2007.
29. Yamamoto, T., & Hirayama, A. (2001). Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. *Brain Research*, 902(2), 255–263.
30. KUBO, K.; IINUMA, M.; CHEN, H. Mastication as a Stress-Coping Behavior. *BioMed Research International*, 876409, 2015.
31. CHEN, H.; IINUMA, M.; ONOZUKA, M.; KUBO, K. Y. Chewing Maintains Hippocampus-Dependent Cognitive Function. *International Journal of Medical Sciences*, 12(6), 502–509, 2015.
32. MACHADO, Angelo. *Neuroanatomia Funcional: Texto e Atlas*. 3ªed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.
33. MARTIN, J.H. *Neuroanatomia: Texto e Atlas*. 4ªed. Porto Alegre: Editora AMGH, 2013.
34. SHEPHERD, G.M. *The Synaptic Organization of the Brain*. 5ª Edição. Oxford Univ. Pr. Cap. 11. 2003.
35. RAMÓN Y CAJAL, S. *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertbres*. Paris. Maloine, 1911.
36. Souza, I. B. M. B. D. (2015). Prejuízo de memória do tipo episódica induzido pela Cetamina: diferenças funcionais na expressão de c-Fos em sub-regiões do hipocampo.
37. Hitti, F., Siegelbaum, S. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508, 88–92 (2014).
38. Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2007). Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science*, 315(5814).
39. Kesner, R. P. (2007). A behavioral analysis of dentate gyrus function. *Progress in Brain Research*, 567–576.

40. Kesner, R. P. (2013). An analysis of the dentate gyrus function. *Behavioural Brain Research*, 254, 1–7.
41. NASCIMENTO, Cristine de Paula; gil-mohapel, joana; s. brocardo, patricia. exercício físico e neuroplasticidade hipocampal: revisão de literatura. *vittalle - revista de ciências da saúde*, [s.l.], v. 29, n. 2, p. 57-78, dez. 2017.
42. Van Groen, T., Miettinen, P., & Kadish, I. (2003). The entorhinal cortex of the mouse: Organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*, 13(1), 133–149.
43. Brun, V. H., Leutgeb, S., Wu, H.-Q., Schwarcz, R., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2008). Impaired Spatial Representation in CA1 after Lesion of Direct Input from Entorhinal Cortex. *Neuron*, 57(2), 290–302.
44. Leonard, B., Amaral, D., Squire, L., & Zola-Morgan, S. (1995). Transient memory impairment in monkeys with bilateral lesions of the entorhinal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 15(8), 5637–5659.
45. Buckmaster, C. A. (2004). *Entorhinal Cortex Lesions Disrupt the Relational Organization of Memory in Monkeys*. *Journal of Neuroscience*, 24(44), 9811–9825. doi:10.1523/jneurosci.1532.
46. FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. 65(1):7 2010.
47. TORREALBA, FERNANDO; VALDES, JOSÉ LUIS. The parietal association cortex of the rat. **Biol. Res.**, Santiago , v. 41, n. 4, p. 369-377, dic. 2008.
48. Maglóczy Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halász P, Vajda J, Czirják S, Freund TF. Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*. 2000.
49. MAGLOCZKY, Z.; FREUND, T.F. Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainite injections into the CA3 subfield. *Neuroscience*, v.56, n.2, p.317-315, 1993.
50. STIPURSKY, J. et al. Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the central nervous system. In: ULRICH, A.H. (Org.). *Stem Cells: from tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy*. Springer, v.1, p.145-164, 2010.
51. STIPURSKY, J. et al. Neuron glia signaling: implications for astrocyte differentiation and synapse formation. *Life Sci.*, v.89, p.524-531, 2011.
52. STIPURSKY, J. et al. Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. *Neurochem Res.*, v.37, n.11, p.2402-18, 2012.

53. VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues.
54. Frota de Almeida, M., de Siqueira Mendes, F., Gurgel Felício, A., Falsoni, M., Ferreira de Andrade, M., Bento-Torres, J., ... Kronka Sosthenes, M. (2012). Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes. *BMC Neuroscience*, 13(1), 23.
55. DINIZ, D. G. *et al.* Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAP-immunolabeled astrocytes. **Behav Brain Funct**, v. 12, n. 1, p. 28, Oct 2016. ISSN 1744-9081.
56. Ronzano, R. (2017). Astrocytes, microglie et plasticité synaptique. *Médecine/sciences*, 33(12), 1071–1078.
57. WILHELMSSON, U. *et al.* Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17513–17518, 2006.
58. MENDES, Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira et al . Alteração mastigatória, ambiente enriquecido e envelhecimento: estudos estereológicos de CA1 do hipocampo de camundongos suíços albinos. *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua* , v. 7, n. 4, p. 31-40, dez. 2016 .
59. Mendes, F.d.C.C.d.S., de Almeida, M.N.F., Felício, A.P.G. *et al.* Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. *BMC Neurosci* 14, 63 (2013).
60. AKAZAWA, Y., KITAMURA, T., FUJIHARA, Y., YOSHIMURA, Y., MITOME, M., & HASEGAWA, T. (2012). Forced mastication increases survival of adult neural stem cells in the hippocampal dentate gyrus. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(2), 307–314.

**ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****PARECER 223-14**

**Projeto:** Alteração e reabilitação da atividade mastigatória, memória espacial e avaliação da população astrocitária em modelo murino em desenvolvimento e senil

**Coordenador:** Prof. Dra. Marcia Consentino Kronka Sosthenes

**Área Temática:** Neurociências

**Vigência:** 04/2014 a 05/2018

**Nº no CEPAE-UFPA: 223-14**

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1032/2014 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N= 348 camundongos) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de abril de 2014.

  
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Presidente do CEPAE-UFPA