



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

MARIA HELENA MOUTINHO MARTA
MARINA PAULA NOBRE NORMANDO

**AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO ASTROCITÁRIA DE CA1, CA3 E GIRO
DENTEADO DO HIPOCAMPO ASSOCIADA À ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE
MASTIGATÓRIA EM MODELO MURINO**

BELÉM - PARÁ
2020

MARIA HELENA MOUTINHO MARTA
MARINA PAULA NOBRE NORMANDO

**AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO ASTROCITÁRIA DE CA1, CA3 E GIRO
DENTEADO DO HIPOCAMPO ASSOCIADA À ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE
MASTIGATÓRIA EM MODELO MURINO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marcia Consentino Kronka Sosthenes

AGRADECIMENTOS

Desde menina eu escutava meu pai (*in memorian*), em toda a sua simplicidade, dizer que a maior obra que ele poderia nos deixar seria o estudo. Pai, aqui te agradeço por me deixar o mais precioso ensinamento, prometo transmiti-lo aos meus. Obrigada por abençoar os meus caminhos, te amarei eternamente.

Agradeço a Deus por iluminar as minhas escolhas e permitir que tudo se realize. Se cheguei em algum lugar foi pelas bençãos e intercessões de N. Sra de Nazaré e N. Sra. De Fátima.

Às minhas avós, Estefânia e Thereza, por serem incansáveis e estarem ao meu lado em todos os momentos, desde o café da manhã preparado todos os dias até o momento que me esperavam retornar do laboratório de madrugada. Obrigada pelo incentivo, pelas orientações e por tudo que vocês me proporcionam. Esse trabalho também é de vocês.

À minha mãe, Julianne, minha tia Jannine e à Voinha, as mulheres que me inspiram. Em vocês me espelho todos os dias para construir minha caminhada pessoal e profissional. Agradeço, também, por me incentivarem na carreira acadêmica, um dia espero ser como vocês.

Aos meus irmãos, Julia, Anna, Filipe e Adriano, pelas caronas, conversas e momentos colecionados juntos. Vocês fizeram da caminhada mais leve.

Aos meus avós, Adriano e Lurdinha, e à minha madrinha Adriana, por permitir que o sonho da Medicina fosse possível, obrigada pelo incentivo e por depositarem confiança em mim.

À minha dupla de TCC e de vida, Marina, amiga que compartilha comigo tantas vitórias, desde a aprovação no vestibular até a finalização desse trabalho. Obrigada pela amizade e pelo apoio nos momentos mais difíceis. Que seu caminho seja sempre iluminado.

Ao Pedro, meu companheiro, agradeço a tua presença nos momentos de insegurança, pelas noites de companhia no laboratório e por, pacientemente, me ajudar a finalizar esse trabalho. Obrigada por me apoiar e por sonhar comigo, que possamos caminhar sempre juntos.

Às minhas orientadoras, Dra. Fabíola Siqueira Mendes e Dra. Márcia Kronka, por permitirem que esse trabalho fosse possível. Agradeço a brilhante orientação e por permitirem que novos caminhos se abrissem. Em vocês me inspiro para seguir a

carreira acadêmica.

Aos meus companheiros do Cesupa, em especial ao meu grupo do internato, a rotina se torna mais leve e agradável ao lado de vocês. Obrigada pelos momentos de força e incentivo, que possamos sempre contar uns com os outros na vida profissional.

Aos meus colegas de laboratório, Fernanda, Alana, Matheus e Fernanda Albuquerque, obrigada por toda a parceria nesse trabalho, principalmente por dividirem as angústias e os momentos de felicidade.

Agradeço aos funcionários do LNI, por proporcionarem, ao longo desses 5 anos em que estive no laboratório, um ambiente de trabalho agradável.

Por fim, agradeço aos que lutam por uma ciência brasileira cada vez mais universal e acessível.

Maria Helena Moutinho Marta

AGRADECIMENTOS

A caminhada até aqui foi dura. Para chegar até aqui precisei mudar de cidade, me distanciar de amigos de infância, abrir mão de muitas coisas, simplesmente por não me imaginar fazendo outra coisa. Mas nada disso seria possível sem o apoio de várias pessoas, que nunca me deixaram desistir, que sempre estavam do meu lado quando as forças para estudar se esgotavam, quando um resultado ruim no vestibular tentava tirar as esperanças. Pensei em desistir inúmeras vezes, mas eles nunca deixaram. E, finalmente, chegou a hora que agradecer.

Primeiramente à Deus pelo seu amor incondicional e junto a Nossa Senhora de Nazaré me proporcionaram perseverança desde antes de passar pela minha cabeça que profissão eu seguiria. Também à Sta Terezinha por ter sido meu suporte em diversos momentos desde a minha infância

Aos meus pais Paulo Wanderley Correa Normando e Liana Paula Lopes Nobre pelo esforço que tenho certeza que foi muito maior do que eu posso calcular, que abriram mão de inúmeras coisas pelos meus estudos, foram apoio, incentivo e alicerce para que eu chegasse até aqui, simplesmente por acreditarem em mim. Essa monografia também é de vocês e serei grata eternamente. Amo vocês.

Aos meus irmãos Paulo Normando e João Paulo Normando pois eles também abdicaram de muitas coisas por causa de mim e várias vezes foram minhas inspirações e me motivaram a ir mais longe. À Moana que foi meu apoio emocional diversas vezes. Nunca imaginei o quanto ela seria importante para mim durante esses anos.

Sou grato à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida. Em especial meus tios Roger Normando, Valéria Normando, David Normando, Thiene Normando e filhos que me ajudaram de forma a possibilitar que eu cursasse a medicina e que chegasse até aqui. Serei grata eternamente e acredito nunca poder retribuir o tanto que vocês já me proporcionaram até hoje.

Aos meus avôs Elizabeth Lopes Nobre, Fernando Nobre, Marina Correa Normando e pelo incentivo aos estudos e pelo apoio incondicional e em memória do meu avô Geraldo Normando que acompanhou a minha caminhada lá do céu. Lembrar de vocês apaga qualquer dúvida que eu possa ter sobre o caminho que estou seguindo.

A minha dupla de vida, Maria Helena. De vida porque lutamos juntas antes mesmo da faculdade começar. Que sorte a minha de poder compartilhar tantos comentários com ela e, principalmente, ter ela agora para encerrar mais um ciclo. Obrigada pela paciência, pela perseverança e pela amizade.

A todos os meus amigos do curso de graduação que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos. Ao meu grupo do internato, aos meus grupos de estudo, às minhas amigadas mesmo fora da faculdade que muitas vezes foram minhas válvulas de escape. Sem vocês não teria chegado até aqui.

Às minhas orientadoras, Dra. Fabíola Siqueira Mendes e Dra. Márcia Kronka, que foram brilhantes desde o início desse trabalho. Que abriram inúmeras portas na pesquisa e são exemplos de docentes que se preocupam verdadeiramente com o ensino.

Aos demais estudantes do Laboratório de Neurodegeneração e Infecção, em especial Alana Oliveira, Fernanda Trindade, Fernanda Albuquerque e Matheus Feijó que dividiram angústias e conquistas durante esse tempo de trabalho. Assim como os funcionários do laboratório, aos outros orientadores e outros amigos de trabalho que tive no LNI, foram quase 5 anos de muito trabalho e muita gratificação nesse laboratório.

A todas as pesquisadoras brasileiras que lutam todos os dias pelo seu lugar e pelo reconhecimento nas condições escarças que o país oferece.

Também quero agradecer ao CESUPA por toda experiência que me proporcionou, dentro e fora das tutorias ou dos ambulatórios, com o seu corpo docente que demonstrou estar comprometido com a qualidade e excelência do ensino, sempre lutando pelo nosso aprendizado e pelo nosso futuro.

Marina Paula Nobre Normando

RESUMO

A atividade mastigatória tem sido tema de estudos científicos não só pela sua clássica participação como facilitadora do processo de ingestão/absorção de alimentos, mas também pela possível influência sobre a função cerebral. A remoção dos dentes molares de camundongos, por exemplo, foi capaz de provocar prejuízo na localização espacial de animais de meia idade submetidos a teste comportamentais, e agravados em idade avançada, reforçando a ideia de que a restrição dessa atividade acentua o declínio cognitivo. Diante de uma temática tão relevante, esse trabalho tem como objetivo investigar se a alteração da atividade mastigatória, induzida em modelo murino jovem, influencia na distribuição laminar de astrócitos no hipocampo. Assim, 15 camundongos foram, ao longo de 6 meses, distribuídos em diferentes grupos de acordo com a apresentação da ração. Um grupo recebeu ração sob a forma de *pellet*. Outro grupo, de maneira intercalada, recebeu ração peletizada seguida de ração farelada e, o último grupo, também de forma intercalada, recebeu a ração peletizada, seguida de farelada e novamente peletizada. O material encefálico foi extraído, sendo submetido a processamento imuno-histoquímico e posterior estimativa numérica por emprego do fracionador óptico da população astrocitária laminarmente organizada em CA1, CA3 e Giro Denteado do hipocampo. Como resultado, identificou-se uma redução da população astrocitária naqueles animais que tiveram menos incentivo da atividade mastigatória na região de CA1, enquanto não houve diferença nas regiões de CA3 e giro denteado. Concluiu-se que tal resultado pode ser explicado pela heterogeneidade de cada região do hipocampo, bem como, pelas conexões do circuito trissináptico e alternativo de formação da memória.

Palavras-chave: mastigação; astrócitos; hipocampo; giro denteado; estereologia.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – Complexo Avidina-biotina-peroxidase

ANOVA – Análise de Variância

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês: *Brain Derived Neurotrophic factor*)

CA1 – Corno de Amon 1

CA2 – Corno de Amon 2

CA3 – Corno de Amon 3

CE – Coeficiente de Scheaffer

CEPAE – Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CV – Coeficiente de variação

DAB – Diaminobenzidina

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

HD – *Hard Diet*

Hip – Hipocampo

GD – Giro Denteado

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial (do inglês: *glial fibrillary acidic protein*)

LNI – Laboratório de Neurodegeneração e Infecção

UFPA – Universidade federal do Pará

PB - Tampão Fosfato (do inglês: *phosphate buffer*)

PBS – Tampão Fosfato Salina (do inglês: *phosphate buffered saline*)

PBST – Tampão Fosfato Salina Triton (do inglês: *phosphate buffered saline triton*)

SD – *Soft Diet*

SNC – Sistema Nervoso Central

Sub – Subiculum

6M – 6 meses

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	4
1.1.	A Atividade Mastigatória e a Memória	4
1.2.	A Organização Neuroanatômica do Hipocampo	6
1.3.	Astrócitos: Suas Contribuições ao Sistema Nervoso Central	9
2.	OBJETIVOS	13
2.1	Geral	13
2.2	Específicos	13
3.	METODOLOGIA	14
3.1.	Aspectos Éticos	14
3.2.	Formação dos Grupos Experimentais	14
3.3.	Alimentação e Tempo de Vida	15
3.4.	Alojamento	16
3.5.	Perfusão e Cortes	16
3.6.	Ensaio Imuno-Histoquímico	17
3.7.	Contagem de Astrócitos	19
3.8.	Análise Estatística.....	24
4.	RESULTADOS	24
5.	DISCUSSÃO	27
	APÊNDICES	35
	ANEXO	46

1. INTRODUÇÃO

Este Trabalho de Conclusão de Curso compõe um amplo Projeto de Pesquisa que estuda a atividade mastigatória associada ao envelhecimento e ao desenvolvimento de alterações neurais. Tal pesquisa é desenvolvida junto ao Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção – LNI/UFPA, situado no Hospital Universitário João de Barros Barreto.

1.1. A Atividade Mastigatória e a Memória

A mastigação é o processo fisiológico responsável por triturar o alimento para que seja facilitado o processo de ingestão e digestão alimentar¹. Para que esse mecanismo ocorra, é necessária uma ativação muscular e neuronal envolvendo diversas sinapses controladas pelo córtex cerebral². Devido a sua contribuição ao processo fisiológico da digestão, a mastigação, nos dias atuais, é considerada um dos principais indicadores de Saúde Pública³.

A partir disso, vários estudos surgiram e hoje é sabido que o processo de mastigação não está restrito à sua clássica função relacionada a alimentação, quando estudo envolvendo idosos institucionalizados e que detinham perdas de elementos dentais, apresentaram maior deterioração física e mental e, conseqüentemente, maior mortalidade. Esse estudo sugeriu então, que a dentição mais precária está relacionada a uma deterioração sistêmica da saúde desses idosos⁴.

Além disso, outros estudos apontaram nessa direção, sugerindo vários efeitos a partir da perda dental. Com a extração dos dentes molares de camundongos, ficou evidente um déficit no aprendizado espacial manifestado na fase adulta desses animais, e intensificada na senilidade, corroborando a ideia de que a diminuição da atividade mastigatória exacerba o declínio cognitivo senil⁵. Ademais, evidenciou na literatura o fato de que a mastigação desenvolve importante papel na manutenção de aspectos da função cognitiva^{6, 7}.

Nesse contexto, um estudo apontou impactos negativos no hipocampo de camundongos idosos com desarmonia oclusal. Tais animais exibiram redução da densidade neuronal na região de CA3 do hipocampo, zona imprescindível à consolidação da memória e do aprendizado espacial em roedores e em humanos⁸.

Coerentemente, a mastigação reduzida não reduziu quantitativamente os neurônios na região do giro denteado, entretanto, impactou negativamente na

neurogênese ali presente. Nas regiões de CA1 e CA3 do hipocampo, diminuíram o número e a atividade neuronal, além da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF- do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)⁹.

De maneira específica, na região de CA1 também foi observada diminuição da densidade de neurônios piramidais¹⁰ e de espinhas dendríticas¹¹ sendo simultaneamente descrita a presença de uma astrocitose e hipertrofia hipocampais^{6, 12}.

O giro denteado, porém, ainda é uma região passível de muitas discussões. Alguns autores sugerem que a mastigação é vital às células nervosas recém-geradas nessa zona e, possivelmente, contribuem à função do hipocampo¹³. Apesar disso, há autores que defendem a não apresentação de modificações morfológicas em camundongos senis e/ou com disfunção mastigatória¹⁴. Portanto, nota-se que são necessários estudos a fim de compreender melhor os mecanismos envolvidos nessa região, haja vista ser um local importante para a formação e para a consolidação da memória.

Na tentativa de se explicar os mecanismos que desencadeiem a diminuição da população celular nessas regiões, imagens de ressonância magnética demonstraram que a mastigação promove um aumento no fluxo sanguíneo do cérebro humano e eleva a atividade neuronal em várias regiões do córtex cerebral¹⁵. Além disso, identificou-se que testes de memória, precedidos de atividade mastigatória, estão vinculados a um aumento do fluxo sanguíneo cerebral no hipocampo, córtex frontal, córtex pré-frontal dorso-lateral, cortex pré-motor, pré-cúneo, tálamo e lobo parietal inferior, assim ocorrendo um melhor desempenho nos testes de memória de trabalho¹³. Além disso, a velocidade de processamento medida pelo tempo de reação revelou melhor desempenho quando a atividade mastigatória precedeu o início dos testes⁹.

Diante do exposto e partindo-se da premissa de que a redução da atividade mastigatória induz efeitos negativos sobre o funcionamento cerebral, uma das hipóteses deste trabalho é de que a sua manutenção ou reabilitação da mesma possa ser um fator que recupere ou retarde os efeitos sobre a distribuição de células, em especial astrócitos, em regiões da formação hipocampal. Desse modo, é conveniente rever a organização anatômica dessas regiões cerebrais.

1.2. A Organização Neuroantômica do Hipocampo

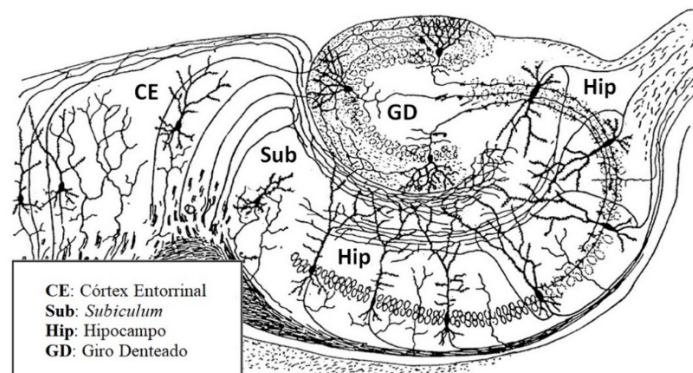
É importante entender o funcionamento do hipocampo e o motivo da sua escolha como objeto de estudo para compreender as possíveis influências da mastigação no processo de formação e manutenção da memória.

O hipocampo está localizado no lobo temporal de mamíferos e é a região cerebral responsável pelo papel de formação da memória episódica e de navegação espacial¹⁶, além de ser uma região de intensa neurogênese, capaz de recuperar experiências específicas e agregar conhecimento geral adquirido a elas¹⁷, por isso também está associado à memória declarativa^{16, 18}.

Ademais, o grande destaque do hipocampo no processo de navegação espacial se deu após testes experimentais realizados com camundongos, em que havia um maior número de disparos nas chamadas *place cells* (“células de lugar”), todas as vezes nas quais os camundongos se deslocavam para locais específicos no espaço¹⁹ corroborando a ideia de que o hipocampo seria capaz de calcular rotas em um espaço físico.

Esse hipocampo, o propriamente dito (Hip) integra a formação hipocampal, composta, ainda, pelo giro denteado (GD), o *subiculum* (Sub) e o córtex entorrinal (**Figura 1**).

Figura 1: Representação anatômica das regiões constituintes da formação hipocampal.



Secção transversal da formação hipocampal com suas conexões neuronais e conhecimento de suas partes constituintes.

Fonte: adaptado de Mendes (2019), originalmente descrito por Ramón y Cajal (1911).

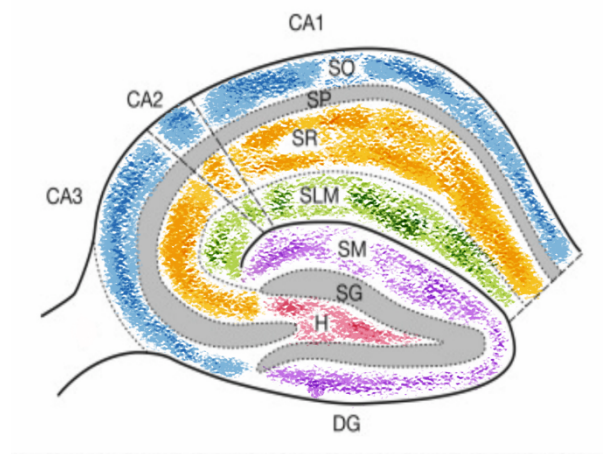
Quando se analisa a função de cada parte da formação hipocampal, notam-se peculiaridades. Estudo, por exemplo, aponta a porção dorsal do hipocampo como

estando envolvida no processo cognitivo de aprendizado e de memória associado à navegação, à exploração e à locomoção, enquanto a porção ventral estaria associada ao comportamento motivacional e emocional²⁰. O giro denteado, por sua vez, participa como uma importante via de conexões para o hipocampo, mediando grande parte das aferências do córtex entorrinal até CA3, fundamentais para a aquisição e codificação de informações espaciais e contextuais pelo hipocampo^{21, 22, 23, 24, 25}.

Do ponto de vista anatômico, o GD é composto pelas camadas polimórfica, granular (*stratum granulosum*) e molecular (*stratum moleculare*). A camada granular, por sua vez, recebe as projeções das vias responsáveis pela função de reconhecimento, de localização espacial e da forma dos objetos¹⁹. Somado a isso, as células musgosas – frequentemente encontradas na camada polimórfica, também chamada de *hilus*, a mais interna do giro denteado – realizam papel modulador da reposta hipocampal normal, isso porque estudos mostraram que danos em neurônios hilares desencadeiam déficits de memória e de aprendizado²⁶.

Assim como o GD, o hipocampo se organiza em camadas, distribuídas em 4 regiões principais: Corno de Amon 1, 2, 3 e 4 (CA1, CA2, CA3 e CA4). As camadas conhecidas são: camada polimórfica (*stratum oriens*), camada piramidal (*stratum pyramidale*) e camada molecular (*stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*)²⁷ (**Figura 2**).

Figura 2: estratificação das camadas constituintes do hipocampo e giro denteado



Em esquema de cores as laminações do giro denteado e hipocampo, assim como a subdivisão anatômica. Localizado na parte inferior temos o giro denteado (GD), de lateral para medial temos: em roxo o *stratum moleculare* (SM) logo abaixo, em cinza, temos o *stratum granulosum* (SG) e medialmente, em vermelho, o Hilus (H). Nota-se também, em sequência CA3, CA2 e CA1 (Corno de Amon 3, 2 e 1, respectivamente), formando o hipocampo propriamente dito, nas suas respectivas laminações: em azul o *stratum oriens* (SO), seguido pelo *stratum pyramidale* (SP) em cinza, abaixo

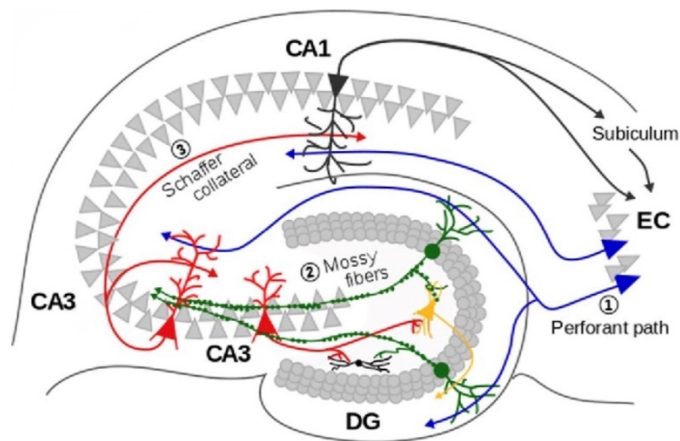
deste, em tons alaranjados, o *stratum radiatum*, e por fim, em verde, o *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) às margens do giro denteado.

Fonte: Samuel Pleasure (2013) disponível em "Cellular Migration and Formation of Neural Connections", capítulo 18. Adaptado pelas autoras

Como dito anteriormente, CA3 recebe fibras nervosas oriundas do córtex entorrinal, cuja função é a de receber informações de outras regiões corticais. As projeções do córtex entorrinal ocorrem através da via perfurante por um trajeto medial e lateral até as células granulares do giro denteado, atravessa o *subiculum* e chega ao GD para fazer a primeira sinapse com as células granulares dessa região²⁸.

Essa sinapse que ocorre na camada granular do GD é a primeira de um circuito trissináptico hipocampal. Dessa camada partem as fibras musgosas para realizar a segunda sinapse com os neurônios piramidais de CA3. Após as sinapses em CA3, partem as projeções axonais glutamatérgicas (colaterais de Schaffer) até os neurônios piramidais de CA1, terminando a terceira sinapse no *stratum radiatum* e fechando, assim, aquele que é conhecido como circuito trissináptico hipocampal^{29, 30} (**Figura 3**).

Figura 3: rede de conexões do hipocampo



O hipocampo forma uma rede de conexões com as aferências do córtex entorrinal (EC), através da via perfurante (Perforant path), excitando neurônios granulares do giro denteado (DG) e formando a 1ª sinapse do circuito trissináptico hipocampal. Daí, as fibras musgosas (Mossy fibers) dos neurônios granulares partem até os neurônios piramidais de CA3 formando a 2ª sinapse. Esses, por sua vez, enviam seus axônios colaterais de Schaffer (Shaffer collateral) até CA1, onde fazem a 3ª sinapse excitatória com os dendritos apicais dos neurônios piramidais, completando o clássico circuito trissináptico do hipocampo. Os neurônios piramidais de CA1 também podem receber sinapses excitatórias diretamente do EC, através da via temporoamônica. Assim, os neurônios piramidais de CA1 são a principal via eferente para o Subicuculum e de volta para o EC, formando conexões recíprocas entre eles.

Fonte: Randa Kassab (2018). Adaptado pelas autoras.

Além do circuito descrito acima, paralelamente existe outro circuito, conhecido como via temporoâmonica, no qual fibras eferentes do córtex entorrinal realizam sua primeira e única sinapse em CA1. No circuito trissináptico e na via temporoâmonica, as vias são excitatórias e atingem os dendritos apicais das células piramidais de CA1. Por essa razão, CA1 é a principal rota de saída do hipocampo, na qual o alvo primário de suas eferências é o *subiculum*, com sinapses por toda a camada de células³¹.

Conhecida então, a organização anatômica da área de interesse do presente estudo, vemos a partir de agora o que nos motivou a estudar os astrócitos dessa região.

1.3. Astrócitos: Suas Contribuições ao Sistema Nervoso Central

O Sistema Nervoso Central (SNC) é composto por uma diversidade de células, sendo categorizadas principalmente em dois grandes grupos: os neurônios, responsáveis por gerar um impulso nervoso e realizar sinapse, e as células da glia ou neuroglia, composta por outras células que em conjunto possuem função de proteção, controle e homeostase do tecido nervoso^{32, 33}.

Os astrócitos, ou astroglia, são um tipo de neuroglia sendo as células em maior abundância do SNC. Essas células são heterogêneas e suas funções e morfologia são dependentes da localização, dos subtipos e dos estágios de desenvolvimento³⁴.

No que diz respeito à morfologia dos astrócitos, são identificados dois grupos principais: os astrócitos protoplasmáticos, mais prevalentes e que se encontram na substância cinzenta do cérebro: prolongamentos maiores e mais finos que contribuem para a formação da barreira hematoencefálica pelas suas projeções em direção aos capilares sanguíneos, formando assim, uma espécie de rede^{34, 35}.

Além dos astrócitos protoplasmáticos, existem os astrócitos fibrosos que, por sua vez, estão mais presentes no “núcleo interno” do cérebro, a substância branca. Essa população possui os prolongamentos mais retilíneos, curtos e espessados³⁶. Ainda é válido ressaltar que tanto os astrócitos protoplasmáticos quanto os fibrosos podem ter diferentes tipos na morfologia entre si dependendo da região cerebral onde estão localizados³⁵.

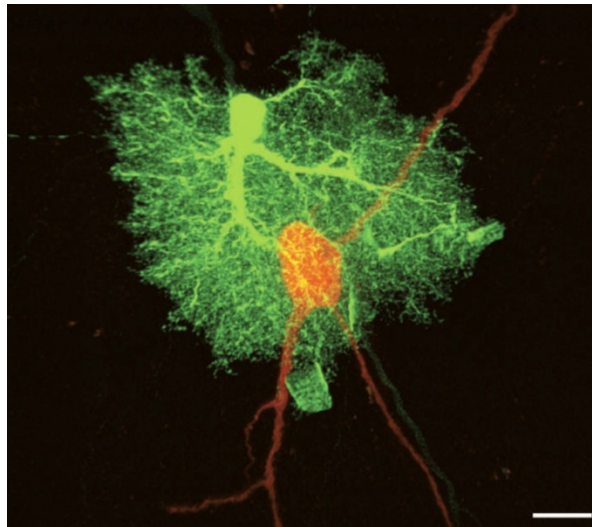
Em relação à função dos astrócitos, por alguns anos foi considerado que o principal papel dessas células seria o de nutrir os neurônios, fazendo com que houvesse uma aproximação, por intermédio de seus prolongamentos, de vasos sanguíneos e neurônios^{35,36}. No entanto, hoje, sabe-se que os astrócitos também são capazes de atuar aprimorando o processo de sinapses neuronais^{37, 38, 39, 40, 41, 42}.

Essa importante função de modulação ocorre por meio da formação de uma barreira física entre neurônios vizinhos (**Figura 4**). Os astrócitos atuam removendo o excesso de neurotransmissores do espaço extracelular, fazendo com que as sinapses ocorram de forma mais coordenada e organizada. Além disso, a astroglia possui a capacidade de secretar mediadores imunes e citocinas que regulam processos inflamatórios no SNC⁴³.

Assim, a modulação da atividade neuronal citada acima pode ser entendida como uma capacidade dos astrócitos de realizar uma homeostase do espaço extracelular. Para isso, essas células também possuem uma concentração abundante de canais de sódio e potássio, realizando dessa maneira um equilíbrio eletrolítico e proporcionando um ambiente estável para que as conexões cerebrais ocorram de maneira adequada.³⁶

Além das funções já citadas, essas células mostraram-se capazes de auxiliar no controle do fluxo sanguíneo cerebral^{44, 45, 46}. Seus finos prolongamentos promovem uma íntima associação entre neurônios e vasos sanguíneos na presença de uma atividade cerebral aumentada. Os astrócitos são capazes de sinalizar para esses vasos sobre a necessidade de aumento do fluxo sanguíneo para regiões cerebrais ativas. Além disso, estudos mostraram que a astroglia é capaz de transportar glicose e oxigênio para os neurônios e regular efeitos pós-sinápticos de alguns neurotransmissores da fenda sináptica⁴³.

Figura 4: astrócito protoplasmático em micrografia



Micrografia mostrando um astrócitos protoplasmático (em verde) envolvendo um corpo celular de neurônio (em vermelho). As ramificações do astrócitos permite com que se forme uma espécie de teia sobre os neurônios.

Fonte: Niola Allen e Bem Barres (2009)

Ademais, por meio da secreção de fatores, os astrócitos conseguem controlar a formação, manutenção, função e reparo da barreira hematoencefálica^{47, 48}. Portanto, os astrócitos afetados por um processo traumático e patológico poderiam igualmente comprometer o processo de sinapse, ou ainda, seriam capazes de restringir eventos relacionados à plasticidade sináptica principalmente no hipocampo^{49, 50, 51}.

De acordo com o exposto acima, observa-se que danos a essa população podem ser capaz de causar um desequilíbrio na homeostase do SNC, contribuindo para mau funcionamento das sinapses, redução da plasticidade neuronal e até mesmo a morte de neurônios por diminuição do fluxo sanguíneo e consequente aporte de nutrientes.

Como ambos os tipos de astrócitos contém feixes proeminentes filamentos intermediários compostos por proteína ácida fibrilar glial (GFAP- do inglês *glial fibrillary acidic protein*)³⁶, sob injúria, os mesmos se tornam reativos e essa resposta é caracterizada pela alta produção de proteína ácida fibrilar glial⁵². Dessa forma, os anticorpos anti-GFAP passam a ser utilizados para marcar astrócitos em transformação, principalmente na presença de neuroinflamação, dano isquêmico e neurodegeneração^{53, 54, 55, 56}.

No presente trabalho, executamos uma análise quantitativa dos astrócitos por meio da microscopia tridimensional de material imunomarcado para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a razão para estudar essas células é notória, pois, diante do

exposto, fica clara a importância dessa população celular para a homeostase e como a alteração em seu número poderia prejudicar o funcionamento do SNC. Até o momento, grande parte dos estudos relacionados a atividade mastigatória se voltam à análise de neurônios. Aqui, pretende-se incluir outras células do SNC, desvendando as possíveis implicações que a atividade mastigatória pode gerar na plasticidade astrogliar do hipocampo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar se a alteração da atividade mastigatória influencia na estimativa numérica de astrócitos em CA1, CA3 e no giro denteado da formação hipocampal de modelo murino.

2.2 Específico

- Com o auxílio de ensaios imuno-histoquímicos e do método do fracionador óptico, avaliar comparativamente as consequências da dieta farelada sobre a quantidade de astrócitos nas camadas polimórficas (*stratum oriens*) e radiatum (*stratum radiatum*) de CA1, CA3 e nas camadas polimórfica e molecular do giro denteado do hipocampo.
- Verificar o efeito da reabilitação da atividade mastigatória sobre a distribuição laminar dos astrócitos, comparando as camadas polimórficas (*stratum oriens*) e radiatum (*stratum radiatum*) de CA1 e CA3 e as camadas polimórfica e molecular do giro denteado do hipocampo.

3. METODOLOGIA

3.1. Aspectos Éticos

Essa 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-UFGPA 223-14 (**Anexo**). Este trabalho, foi orientado pela Prof^a. Dr^a. Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes e co-orientado pela Prof^a. Dr^a. Marcia Consentino Kronka Sosthenes.

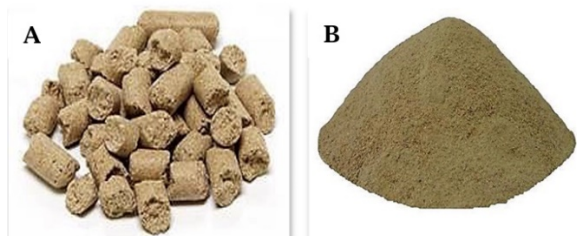
3.2. Formação dos Grupos Experimentais

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 (LNI, ICB/HUJBB) da Universidade Federal do Pará, sob a coordenação da Prof^a. Dr^a. Marcia Consentino Kronka Sosthenes. Portanto, a criação e formação dos grupos experimentais precederam o atual trabalho, tendo este como objetivo, através de processamento imuno-histoquímico e análise estereológica, analisar a influência da atividade mastigatória sobre a distribuição laminar dos astrócitos nas regiões de CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo. Para tanto, foram utilizados no total 15 camundongos suíços albinos fêmeas selecionados ao nascimento e mantidos em amamentação por 21 dias na proporção de seis filhotes por nutriz, a partir do 5º dia pós-natal. Os camundongos foram provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas.

3.3. Alimentação e Tempo de Vida

Completados 21 dias pós-natal, respeitando o período de desmame, os animais foram distribuídos para a formação dos grupos experimentais conforme o tipo de ração que receberam. O grupo controle recebeu alimentação sob a forma de ração peletizada (HD – *Hard Diet*) e nos outros dois grupos foram induzidas alterações da atividade mastigatória, sendo oferecidas rações de diferentes consistências de forma intercalada: um dos grupos recebeu ração em *pellet* seguida de ração farelada, em pó (*Soft Diet* - SD) - HD/SD, e o outro grupo recebeu ração peletizada, seguida de farelada e, novamente, pellet – HD/SD/HD (**Figuras 5 e 6**).

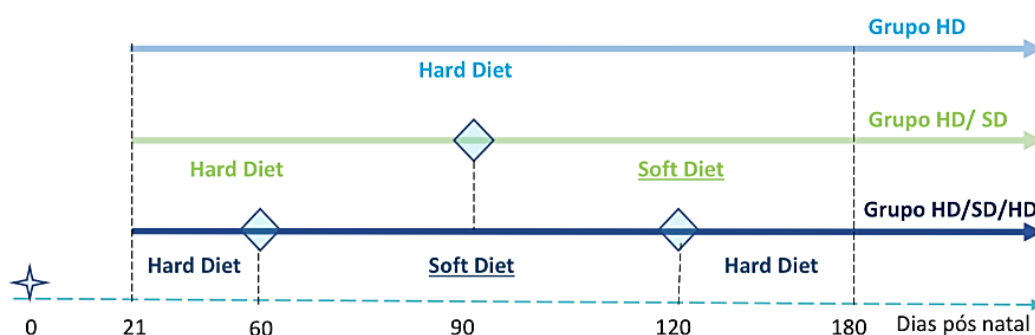
Figura 5: Tipos de ração ofertada



A: Ração em pellet, utilizada na fase *Hard Diet*; **B:** Ração farelada, utilizada na fase *Soft Diet*.

Fonte: Mendes (2019).

Figura 6: Linha temporal mostrando a sequência de eventos do modelo experimental



No 21º dia pós-natal até o 180º dias (6 meses de idade – 6M), os camundongos foram alojados em um regime com as seguintes dietas: HD (*hard diet*) que seria uma dieta contínua com ração do tipo *pellet*; grupo HD/SD (*hard diet/soft diet*) correspondendo a uma alternância de dieta, nos primeiros 90 dias receberam a dieta em pellet e nos outros 90 dias receberam a dieta farelada; grupo HD/SD/HD (*hard diet/soft diet/hard diet*) na sequência receberam a dieta em pellet, farelada e novamente em pellet, com o objetivo de estimular uma reabilitação da atividade mastigatória. Passados os 180 dias, os animais foram submetidos ao protocolo de perfusão e processamento histológico.

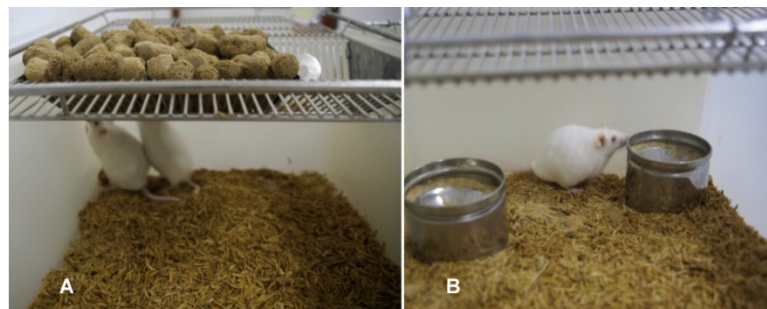
Fonte: elaborado pelas autoras

Cada um desses grupos experimentais serviu de modelo de redução da atividade mastigatória (HD/SD) e da reabilitação desta (HD/SD/HD). Todos os indivíduos tiveram acesso livre à água e à comida, valendo ressaltar que as rações possuíam igual valor nutritivo, sendo diferenciadas apenas a suas formas de apresentação (consistência). Os animais estiveram submetidos a essas condições até completarem a idade de 6 meses (6M).

3.4. Alojamento

Os camundongos foram alojados em gaiolas plásticas de dimensões 32x39x16,5cm e cobertas por uma grade de metal. Cada gaiola abrigou no máximo seis camundongos, permanecendo em uma sala com temperatura ambiente ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) e respeitando-se o ciclo claro-escuro de 12 horas (**Figura 7**).

Figura 7: alojamento dos animais durante o período experimental



Ambiente de alojamento dos animais durante 180 dias. **A:** Animais recebendo a ração em pellet; **B:** animais recebendo a ração farelada.

Fonte: Mendes (2019)

3.5. Perfusão e Cortes

Ao completarem a idade de 6 meses, os camundongos foram submetidos a testes comportamentais, os quais não são objeto de estudo do presente trabalho, e, logo em seguida, pesados e perfundidos. Para perfusão e processamentos histológicos, os animais foram anestesiados profundamente com Xilazina e Ketamina, seguida de toracotomia para acesso ao ventrículo esquerdo do coração, através do qual se perfundiu solução salina a 0,9% heparinizada (Liquemine®) durante 10

minutos. Então, seguiu a passagem de paraformaldeído a 4% (em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4) por 30 minutos. Ao final, foi realizada a craniotomia para retirada do encéfalo. Séries anatômicas de secções paralelas ao plano axial e com espessura de 60µm foram obtidas usando-se microtomia por vibração (Microm® HM 650), sendo todos os cortes coletados. No sentido de fazer com que os dados provenientes dos diferentes indivíduos dos vários grupos fossem comparáveis, secções anatômicas equivalentes foram selecionadas para a estimativa do número de astrócitos. As secções escolhidas (1 a cada 6 cortes) proveram valores representativos das diversas regiões anatômicas.

3.6. Ensaio Imuno-Histoquímico

Após a realização dos protocolos de perfusão e microtomia, as secções analisadas foram coletadas na forma de 1 a cada 6 cortes (intervalos de 1:6) para a imunomarcação para proteína ácida fibrilar glial (GFAP), a qual foi empregada para o reconhecimento dos astrócitos. É importante ressaltar que foi adotado um ensaio cego no qual os animais foram identificados por códigos, o que impediu os pesquisadores de reconhecerem o grupo a que pertencia cada animal. O protocolo escolhido no ensaio imuno-histoquímico segue as recomendações do fabricante: as suas etapas encontram-se descritas abaixo.

Inicialmente, as secções foram lavadas com tampão fosfato (PB) 0,1M (pH 7,2-7,4) e preparadas para recuperação antigênica em duas etapas: na primeira etapa foram incubadas durante uma hora em tampão citrato a 0,01M (pH 6,0) na temperatura de 80-85° e em seguida, as secções foram incubadas em solução de Tris-EDTA por 12h. Após esse período, seguiram-se três lavagens de 5 minutos com tampão fosfato salina Triton (PBST) a uma concentração de 5%, e então, 3 lavagens de 2 minutos cada uma, com tampão fosfato salina 0,9% (PBS).

Por conta da utilização de anticorpo monoclonal produzido em camundongo, utilizou-se também protocolo para bloqueio dos sítios antigênicos não-específicos, adotando-se o kit de imunodeteccção “Mouse-on-Mouse”, de acordo com as recomendações do fabricante (M.O.M kit, Vector Laboratories, USA). As secções foram submetidas ao bloqueio com imunoglobulina por uma hora, seguindo-se 3 lavagens em PBS, durante 2 minutos cada.

Na seguinte fase do protocolo, foram incubadas em concentrado de proteína (M.O.M kit) por 5 min 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 3 dias, com agitação contínua e suave.

Após o período de incubação no anticorpo primário em geladeira, as secções foram lavadas 3 vezes, 2 minutos em cada lavagem em solução tampão (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.

Na última fase do protocolo, 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 3 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.

Dando continuidade, seguiu-se uma lavagem de 5 minutos em tampão acetato 0,2M (pH 6,0) e, por fim, as secções foram processadas para a imuno-histoquímica com peroxidase utilizando como cromógeno a diaminobenzidina (DAB). Essa reação é utilizada para liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O protocolo encontra-se esquematizado na **Tabela 1**.

Tabela 1: esquematização do protocolo de imuno-histoquímica para a detecção da proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

Soluções	Nº de lavagens	de (min)	Tempo (hora)	Tempo
PB 0,1M	1		2	-
Citrato 0,01M	1		-	1
Tampão Citrato 0,01M	-		20	-
Tampão Tris EDTA	1		-	12
Tampão Fosfato	3		5	-
Salina Triton (PBST) a 5%				

Tampão Fosfato	3	2	-
Salina (PBS)			
MOM IgG Block	1	-	1
PBS	3	2	-
Solução de Trabalho	1	5	-
Anticorpo Primário	1	-	72
PBS	3	2	-
MOM IgG	1	-	12
Biotinylated Anti-Mouse IgG			
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) 9%	1	15	-
PBS	3	2	1
ABC (Complexo)	1	-	1
Biotina Avidina)			
PB 0,1M	3	2	-
Tampão Acetato	1	5	-
0,2M (pH 6)			
DAB	1	Até 30	-
PB 0,1M	3	2	-

Com a finalização do ensaio imuno-histoquímico para GFAP, as secções marcadas foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas com álcool etílico absoluto diluído em crescentes concentrações e, posteriormente, as lâminas foram seladas com lamínulas e meio de inclusão (Entelan Merck®).

3.7. Contagem de astrócitos

Após a finalização do protocolo de imunomarcagem, foram iniciadas as análises estereológicas para a estimativa do número de astrócitos nas regiões de CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo de camundongos suíços albinos fêmeas através do programa especializado Stereoinvestigator® (MicroBrightField Inc., Williston, VT, USA).

Esse programa foi integrado a um microscópio óptico (Optiphot2®, NIKON) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC6000®, Ludl Electronic

Products, 34 Hawthorne, NY, USA) que transmitia as informações das coordenadas espaciais tri-dimensionais (X, Y, Z) de cada ponto digitalizado a um microprocessador controlador dos movimentos da platina e ao programa especializado StereoInvestigator[®]. Os dados das coordenadas e do número de objetos de interesse, uma vez digitalizados, eram utilizados pelo programa para implementação dos métodos estereológicos.

A princípio foi realizada identificação dos limites das regiões de interesse. Nesse caso, a distribuição laminar dos astrócitos foi evidenciada através da técnica de Nissl sobreposta a imunohistoquímica para GFAP, e assim, os limites das camadas de CA3, CA1 e do giro denteado puderam ser mais facilmente identificados e delineados com uso de objetiva adequada.

Empregando-se a objetiva de 10x, foram feitos os contornos das camadas de interesse. Para a distribuição laminar de CA3 e CA1 utilizou-se como referência a camada piramidal, a qual não é o nosso objeto de pesquisa, mas foi necessária para a delimitação das demais camadas. Em CA1, suas células contracordadas pela técnica de Nissl são melhor definidas pelo cresil violeta, pois este se imprime no tecido como uma faixa de células com coloração mais fortemente azulada. Já em CA3, a camada piramidal assume outra característica, com células menos agrupadas, em menor quantidade evidenciando uma faixa mais clara que se destaca das demais camadas, menos estreita e com menor empacotamento quando comparada a CA1.

O *stratum oriens* se assemelha ao *stratum radiatum* pela maior intensidade do *background* imunomarcado para GFAP, assim como, pela morfologia de seus astrócitos que se mostram menores, com ramos mais curtos e mais densamente imunomarcados. Tanto em CA1 como em CA3, foi possível a identificação pois as camadas são separadas entre si pela camada piramidal. A distinção dos campos hipocâmpais CA1, CA2 de CA3 é relativamente simples pela distribuição mais compacta das células piramidais em CA1 e CA2. Essa facilidade de distinção é justificada pela distribuição mais desorganizada e com menor densidade das células piramidais de CA3, onde o condensamento das células piramidais foi prontamente visível em CA1 desaparecendo em CA3^{57, 58}.

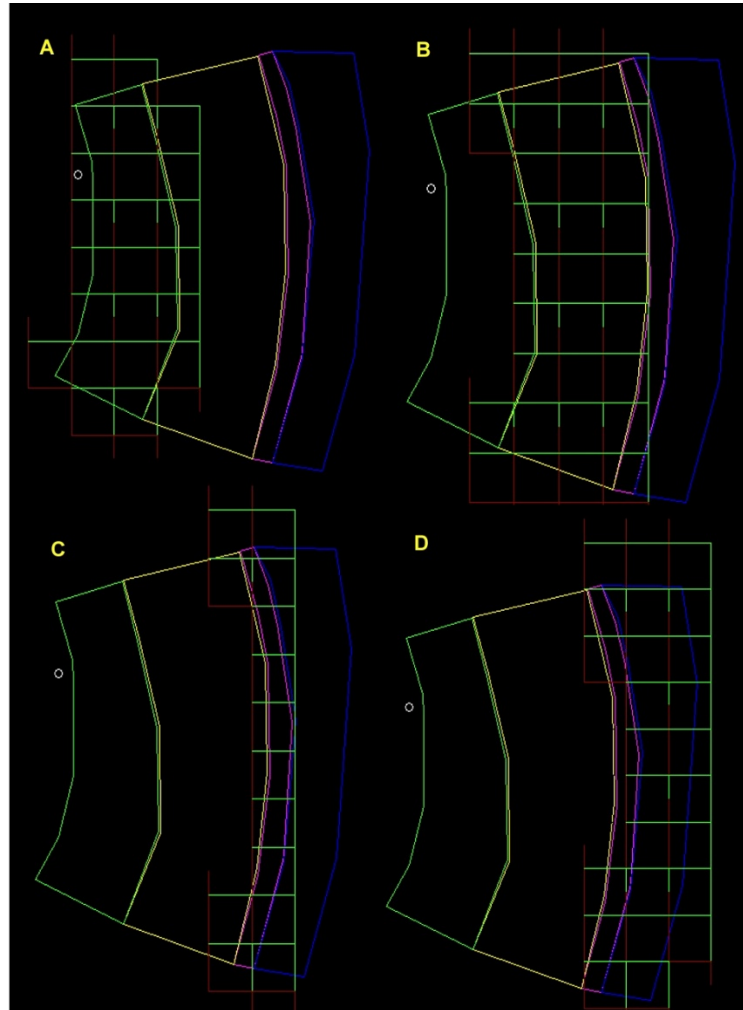
Como CA2 é pequeno e indistinto em algumas espécies, essa região foi incluída em CA1 assim como o é frequentemente feito nas análises dedicadas aos mamíferos⁵⁹.

Após a definição dos parâmetros de contorno, e no sentido de se evitar

ambiguidades na identificação dos objetos de interesse e garantir que estes se encontravam dentro dos planos permitidos de contagem, as objetivas de menor aumento foram substituídas por outra de 100x, a óleo de imersão, com valor de abertura numérica 1,4 (NIKON, NA=1,4) utilizada para todas as contagens empreendidas. A determinação do número de astrócitos foi feita através da distribuição sistemática e randômica de blocos de contagem.

Indicávamos para o programa as três dimensões da caixa de contagem (largura, comprimento e altura), o espaçamento entre elas e as zonas de guarda (regiões do corte onde os procedimentos de microtomia produzem variações indesejáveis), preenchendo o protocolo do programa. Após o preenchimento, o programa exibia a disposição espacial das caixas em relação ao contorno, baseando-se nos parâmetros fornecidos. Finalizada a contagem em um bloco, o programa mudava automaticamente a posição da lâmina para iniciar uma nova contagem em uma nova caixa (**Figura 8**).

Figura 8: contornos ilustrando as dimensões relativas das caixas de contagem (verde) e contorno das laminações de CA1



As arestas em verde das caixas de contagem ilustram os limites permitidos e em vermelho os limites proibidos. **A:** *Stratum lacunosum-moleculare* de CA1; **B:** *stratum radiatum* de CA1; **C:** *stratum pyramidale* de CA1; **D:** *stratum oriens* de CA1.

Ao final da contagem de todas as caixas de cada secção, o programa estimava o número total de astrócitos naquela secção e gerava uma série de dados estatísticos que incluíam o número total de células marcadas e a estimativa total esperada, com o respectivo coeficiente de erro. Esse último foi usado para avaliar se as dimensões e o número de caixas eram adequados para obtermos valores médios representativos do total do número de astrócitos. Coeficientes de erro maiores que 0,05 indicavam, na maioria dos casos, a necessidade de mudanças nos parâmetros escolhidos.

A estimativa do número total de astrócitos foi obtida através do método do fracionador óptico, multiplicando-se o número de células contadas dentro de cada

bloco pelos valores de probabilidade da amostra. Esses valores dependeram: 1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções contadas (“section sampling fraction”); 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem (“area sampling fraction”) e 3) da altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos (“thickness sampling fraction”).

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

Onde: N – número total de astrócitos

ΣQ – número de astrócitos contados

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

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

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

Adotamos então, os seguintes parâmetros estereológicos:

- Método: Fracionador Óptico
- Intervalo de contagem entre as secções: 1:6
- Matriz de contagem: 80 x 80 μm
- Zona de guarda: 2 μm
- Altura do bloco de contagem: 7 μm

O cálculo do coeficiente de erro para cada sujeito previamente mencionado adotou o procedimento sistemático amostral de um estágio (Coeficiente de Scheaffer, CE) já pré-validado em ensaios computacionais. O coeficiente de Scheaffer expressa a precisão da metodologia aplicada na coleta de dados para as estimativas e um valor de $CE \leq 0,05$ é julgado apropriado na maioria dos casos porque a variância introduzida pelo procedimento contribui pouco para a variância observada. A razão entre o coeficiente de erro intrínseco à metodologia (CE) e o coeficiente de variação para as estimativas (CV) não deve ultrapassar 0,5⁶¹.

3.8. Análise Estatística

Foi realizada análise estatística paramétrica por meio do teste *Two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni, admitindo-se um alfa de 5%.

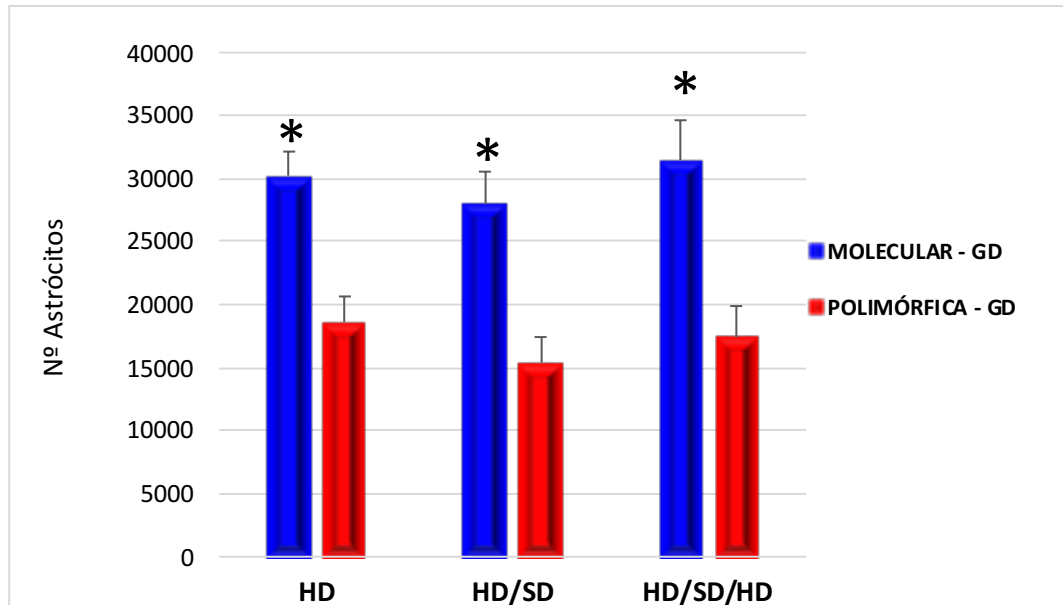
4. RESULTADOS

Após o processamento imuno-histoquímico para GFAP, foi realizada a análise quantitativa estereológica dos astrócitos das regiões giro denteado, CA1 e CA3. Neste primeiro, investigou-se as camadas polimórfica e molecular, enquanto em CA1 e CA3, foram investigados o *stratum radiatum* e *stratum oriens*.

A seguir, demonstram-se os resultados obtidos com a quantificação astrocitária de cada grupo (HD, HD/SD e HD/SD/HD) associada a cada camada avaliada. Os valores exatos encontrados nas análises estatísticas estão disponíveis nos **Apêndices**.

A análise do **Gráfico 1** evidencia os três grupos experimentais no eixo horizontal e o número de astrócitos contados nas camadas polimórfica e molecular do Giro Denteado, no eixo vertical. Nele é possível verificar uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre a quantidade de astrócitos da camada molecular [HD (30236.1±1912.6), HD/SD (27956.8±2600.3) e HD/SD/HD (31462.1±3172.6)] e polimórfica [HD (18627.15±2026.619), HD/SD (15399.05±2031.05) e HD/SD/HD (17385.99±2505.919)] do Giro Denteado, entre grupos de mesma dieta. É importante registrar que os resultados estatísticos não apontam diferença entre as dietas nas mesmas camadas ($p > 0,5$).

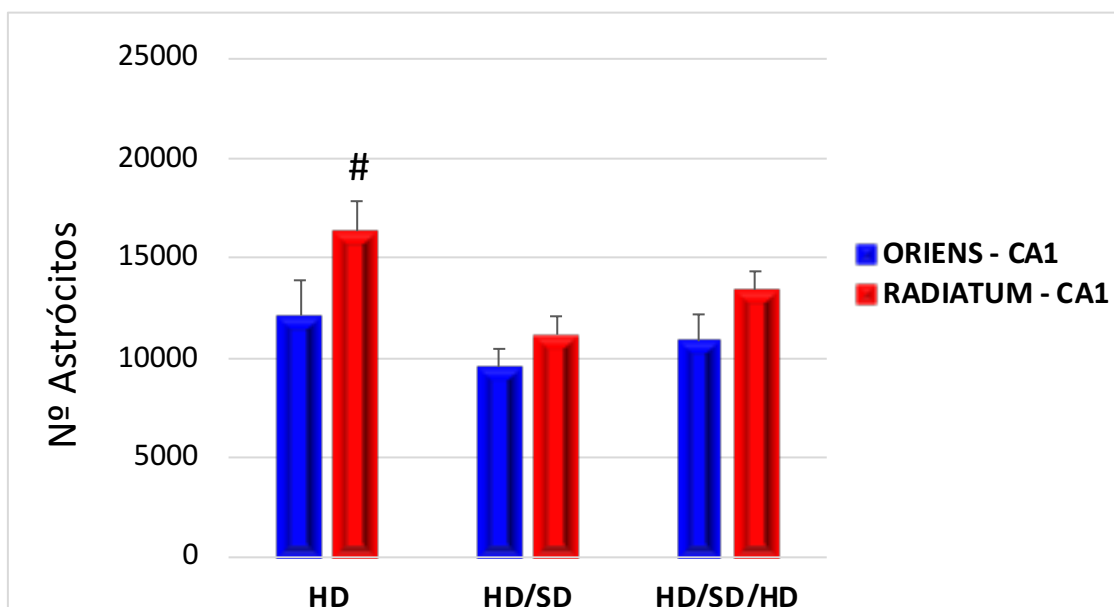
Gráfico 1: Análise do número total de astrócitos nos *stratum granulosum* e *stratum moleculare* de GD do hipocampo, nos grupos HD, HD/SD e HD/SD/HD



*= $p < 0,05$, indicando diferença entre Molecular e Polimórfica nas mesmas dietas.

Em seguida, o **Gráfico 2** também é dividido de forma semelhante ao Gráfico 1, porém demonstra o número de astrócitos encontrado nos *stratum radiatum* e *stratum oriens* de CA1. Nesse caso, após a análise estatística, percebeu-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre o número de astrócitos da camada radiato nos grupos de dieta HD ($16357,03 \pm 1503,6$) e HD/SD ($11164,75 \pm 923,6$).

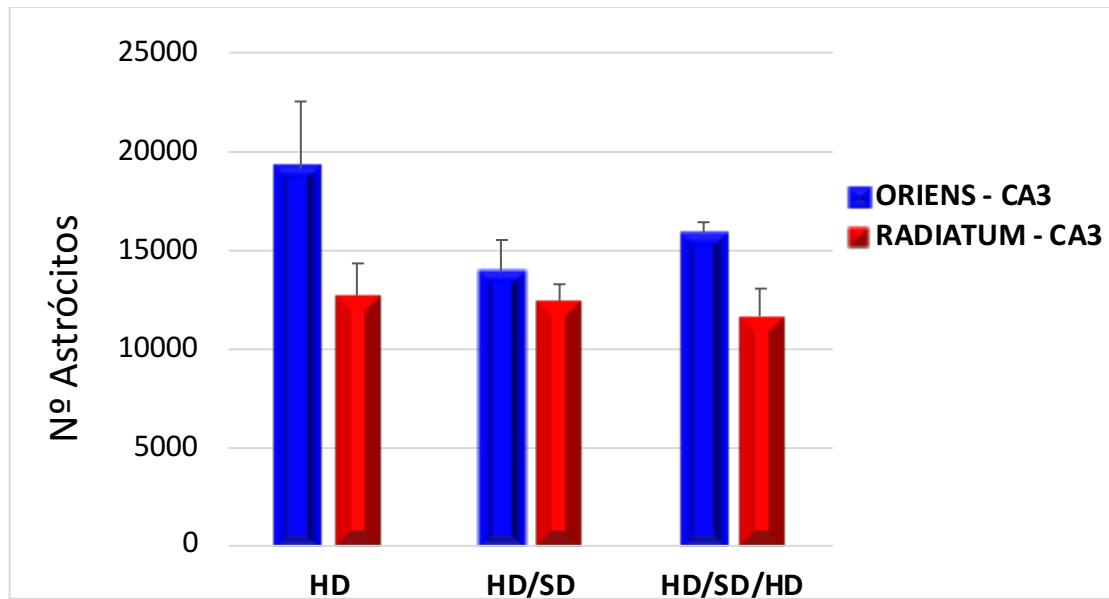
Gráfico 2: Análise da quantidade de astrócitos nos *stratum radiatum* e *stratum oriens* de CA1, nos grupos HD, HD/SD e HD/SD/HD



#= $p < 0,05$ indicando diferença entre a camada radiato nas dietas HD e HDSD.

Todavia, analisando o **Gráfico 3**, diferenças estatísticas significativas não foram identificadas entre as camadas estudadas nem entre os grupos experimentais HD, HD/SD e HD/SD/HD ($p>0.05$).

Gráfico 3: Análise da quantidade de astrócitos nos stratum radiatum e stratum oriens de CA3, nos grupos HD, HD/SD e HD/SD/HD



5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, selecionamos as regiões de C1, CA3 e giro denteado do hipocampo, a fim de investigar mudanças na distribuição laminar dos astrócitos induzidas pela alteração da atividade mastigatória. Para quantificar a população astrocitária, aplicamos o fracionador óptico por ser um método estereológico tridimensional de grande precisão, que combina as propriedades do dissector óptico e do fracionador e que tem sido usado em uma variedade de estudos para fins de estimativa do número de células em diversas regiões cerebrais.

Como resultado, vimos que a região de CA3 não é influenciada pela dieta, pois não apresentou diferença quantitativa significativa de astrócitos na distribuição laminar. Já em CA1, a diferença observada entre os grupos HD e HD/SD na camada radiata, revela que a população de astrócitos parece ser sensível a redução da atividade mastigatória.

Coerentemente, alguns estudos descrevem alterações hipocampais em decorrência da intervenção na atividade mastigatória^{8, 62, 63}, envolvendo desde a densidade neuronal em CA1 do hipocampo¹², até a formação sináptica no hipocampo e no córtex parietal⁶³ de forma a reduzi-las. Aliado a isso, outros autores avaliaram o impacto da alteração mastigatória na habilidade de ratos e de camundongos jovens em aprender e em recordar a posição de objetos. Em seus achados, os grupos que sofreram privação mastigatória em comparação aos que não sofreram, não conseguiram aprender a localizar os objetos, demonstrando que a disfunção mastigatória causou diminuição da habilidade de aprendizado e de memória espacial^{6, 8, 10, 11, 12, 63, 64}.

Essa alteração na população de astrócitos em CA1 também foi encontrada em outros estudos que mostraram que uma atividade mastigatória mais branda que estimula menos a mastigação induziu mudanças celulares e moleculares que levam a hipertrofia astrocitária^{6,12}.

Em contrapartida, outros achados nossos em destaque, foi o fato de que nas regiões de CA3 e giro denteado não houve diferença significativa entre as dietas. Nesse caso, é válido recordar que são duas as vias principais que atuam para que processos mnemônicos ocorram. Uma delas é a via clássica que recebe eferências do córtex cerebral e inicia a sua primeira sinapse no giro denteado, seguindo para a camada piramidal de CA3 e finalizando o circuito trissináptico no *stratum radiatum* de

CA1^{24, 25}, e a outra é a via temporoâmônica, na qual as fibras eferentes do córtex entorrinal conectam-se diretamente em CA1 no *stratum lacunosum-moleculare*. Nesse sentido, CA1 se torna uma região de saída do hipocampo, independente da via, enquanto CA3 participa de apenas uma dessas vias. Hipotetizamos então, que isso possa vir a ser a explicação da sensibilidade maior de CA1 à alteração da mastigação, em comparação à CA3.

Outrossim, destacam-se os resultados encontrados no giro denteado: não houve alteração entre os regimes mastigatórios, entretanto, vimos uma diferença significativa entre as camadas polimórfica e molecular; tendo a última a quantidade astrocitária reduzida em comparação à primeira. Nesse caso, entendemos que essa diferença seja explicada pelas diferentes funções desempenhadas por essas regiões.

Com base nos resultados expostos, especulamos, ainda, que a atividade astrocitária aos 6 meses reuniria um maior número de células com propriedades neuroprotetoras. Assim, a privação da atividade mastigatória nesses animais impediria que essas células exercessem o suporte estrutural necessário para manter a homeostase dos neurônios⁴³.

Esse fato fortalece a ideia de haver a redução da população astrocitária em CA1, em especial no grupo HD/SD. Porém, este trabalho não avaliou outros fatores que podem ser preponderantes aos 6 meses.

Por fim, é importante ressaltar que existem regiões dentro do hipocampo que concentram sinapses, enquanto outras áreas se responsabilizam pela condução dos estímulos até que quando reunidas o tornam reconhecidamente uma complexa área receptora e integradora de informações de todas as modalidades sensoriais²⁵. Por essa razão, é razoável considerar que as diferenças encontradas entre as regiões de CA1, CA3 e giro denteado podem ser justificadas pela heterogeneidade anátomo-histológica do hipocampo em função da necessidade de adaptar mecanismos celulares e moleculares para a operacionalidade do seu circuito trissináptico.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A redução da atividade mastigatória influencia, diminuindo a quantidade de astrócitos na região de CA1 (*stratum radiatum*) do hipocampo de camundongos jovens, enquanto a reabilitação é capaz de eliminar essas diferenças.
- ✓ Em CA3 e no giro denteado, por sua vez, não se observa a mesma alteração induzida pela redução da mastigação.
- ✓ O giro denteado não se mostrou influenciado pela mastigação, entretanto, apresentou diferença na quantidade de astrócitos distribuídos entre as camadas polimórfica e molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira LJ, Duarte Gavião MB, Van Der Bilt A. Influence of oral characteristics and food products on masticatory function. *Acta Odontol Scand.* 2006;64(4):193-201
2. WHITAKER, Melina Evangelista; TRINDADE JÚNIOR, Alceu Sérgio; GENARO, Katia Flores. Proposta de protocolo de avaliação clínica da função mastigatória. **Revista CEFAC**, v. 11, p. 311-323, 2009.
3. NARVAI, P. C.; FRAZÃO, P. Saúde bucal coletiva. **Luiz RR, Costa AJL, Nadanovsky P. Epidemiologia e bioestatística em Odontologia. São Paulo: Atheneu**, p. p21-48, 2008.
4. SHIMAZAKI, Yoshihiro et al. Influence of dentition status on physical disability, mental impairment, and mortality in institutionalized elderly people. **Journal of dental research**, v. 80, n. 1, p. 340-345, 2001.
5. YAMAZAKI, K. *et al.* Effect of tooth loss on spatial memory and trkB-mRNA levels in rats. **Hippocampus**, v. 18, n. 6, p. 542-547, 2008.
6. WATANABE, K. *et al.* Evidence for involvement of dysfunctional teeth in the senile process in the hippocampus of SAMP8 mice. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 2, p. 283-295, 2001.
7. TEIXEIRA, F. B. *et al.* Masticatory Deficiency as a Risk Factor for Cognitive Dysfunction. **International Journal of Medical Sciences**, 11(2), 209–214, 2014.
8. KUBO, Kin-ya et al. Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice. **Neuroscience letters**, v. 414, n. 2, p. 188-191, 2007.
9. FUKUSHIMA-NAKAYAMA, Y. et al. Reduced mastication impairs memory function. **Journal of dental research**, v. 96, n. 9, p. 1058-1066, 2017.
10. ONOZUKA, Minoru et al. Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. **Brain research**, v. 826, n. 1, p. 148-153, 1999.
11. 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.
12. ONOZUKA, Minoru et al. Impairment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice. **Behavioural brain research**, v. 108, n. 2, p. 145-155, 2000.
13. MITOME, M.; HASEGAWA, T.; SHIRAKAWA, T. Mastications influences the survival of newly generated cells in mouse dentate gyrus. *Neuroreport.*, v.16, n.3, p.249-252, 2005

14. TSUTSUI, Keisuke et al. Influences of reduced masticatory sensory input from soft-diet feeding upon spatial memory/learning ability in mice. **Biomedical Research**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2007.
15. HIRANO, Y. *et al.* Effects of chewing on cognitive processing speed. **Brain Cogn**, v. 81, n. 3, p. 376-81, 2013.
16. EICHENBAUM, Howard. Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 732-744, 2014.
17. COHEN, Neal J.; SQUIRE, Larry R. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: Dissociation of knowing how and knowing that. **Science**, v. 210, n. 4466, p. 207-210, 1980.
18. SCOVILLE, William Beecher; MILNER, Brenda. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11, 1957.
19. LIPTON, P. A.; EICHENBAUM, H. Complementary roles of hippocampus and medial entorhinal cortex in episodic memory. **Neural plasticity**, v. 2008, 2008.
20. LOTHMAN, Eric W.; BERTRAM III, Edward H.; STRINGER, Janet L. Functional anatomy of hippocampal seizures. **Progress in neurobiology**, v. 37, n. 1, p. 1-82, 1991.
21. FANSELOW, Michael S.; DONG, Hong-Wei. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.
22. KESNER, Raymond P. A behavioral analysis of dentate gyrus function. **Progress in brain research**, v. 163, p. 567-576, 2007.
23. KESNER, Raymond P. An analysis of the dentate gyrus function. **Behavioural brain research**, v. 254, p. 1-7, 2013.
24. XAVIER, Gilberto Fernando; COSTA, Valéria Catelli Infantozzi. Dentate gyrus and spatial behaviour. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 762-773, 2009. MULLIGAN, S. J.; MACVICAR, B. A. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. **Nature** 431: 195–199, 2004.
25. ROLLS, Edmund T.; KESNER, Raymond P. A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. **Progress in neurobiology**, v. 79, n. 1, p. 1-48, 2006. VERKHRATSKY, A.; BUTT, A. Neuroglia in neurological diseases. In: *Glial Physiology and Pathophysiology*. Hoboken, NJ: Wiley, p. 453–504, 2013.
26. MAGLOCZKY, Z. S.; FREUND, T. F. Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. **Neuroscience**, v. 56, n. 2, p. 317-335, 1993.

27. O'KEEFE, John; DOSTROVSKY, Jonathan. The hippocampus as a spatial map: Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain research**, 1971.
28. BROWN; ZADOR. Hippocampus. Shepherd GM, editor. New York: Oxford University Press, 1990.
29. VAN GROEN, Thomas; MIETTINEN, Pasi; KADISH, Inga. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**, v. 13, n. 1, p. 133-149, 2003.
30. AGGLETON, John P.; BROWN, Malcolm W.; ALBASSER, Mathieu M. Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: insights from immediate-early gene functional imaging. **Neuropsychologia**, v. 50, n. 13, p. 3141-3155, 2012.
31. TURNER, Dennis A. et al. Morphological features of the entorhinal–hippocampal connection. **Progress in neurobiology**, v. 55, n. 6, p. 537-562, 1998.
32. SATVAT, Elham et al. Changes in task demands alter the pattern of zif268 expression in the dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 19, p. 7163-7167, 2011.
33. ALLEN, Nicola J.; EROGLU, Cagla. Cell biology of astrocyte-synapse interactions. **Neuron**, v. 96, n. 3, p. 697-708, 2017.
34. RONZANO, R. Astrocytes and microglia: active players in synaptic plasticity. *Med Sci (Paris)*. v. 33, n. 12, p. 1071-1078, 2017.
35. VERKHRATSKY, Alexei; RODRÍGUEZ, José J.; PARPURA, Vladimir. Neuroglia in ageing and disease. **Cell and tissue research**, v. 357, n. 2, p. 493-503, 2014.
36. ROSS, Michael H.; PAWLINA, Wojciech. **Histology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
37. KETTENMANN, H.; VERKHRATSKY, A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 31:653–659, 2008.
38. PANNASCH, Ulrike et al. Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 549-558, 2014.
39. EROGLU, Cagla; BARRES, Ben A. Regulation of synaptic connectivity by glia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 223-231, 2010.
40. CHRISTOPHERSON, Karen S. et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. **Cell**, v. 120, n. 3, p. 421-433, 2005.
41. ULLIAN, Erik M.; CHRISTOPHERSON, Karen S.; BARRES, Ben A. Role for glia in synaptogenesis. **Glia**, v. 47, n. 3, p. 209-216, 2004.
42. ULLIAN, Erik M. et al. Control of synapse number by glia. **Science**, v. 291, n. 5504, p. 657-661, 2001.

43. HAINES, Duane E. (Ed.). **Neurociência Fundamental para aplicações básicas e clínicas**. Elsevier, 2006.
44. IADECOLA, Costantino; NEDERGAARD, Maiken. Glial regulation of the cerebral microvasculature. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1369-1376, 2007.
45. MULLIGAN, Sean J.; MACVICAR, Brian A. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 195-199, 2004.
46. ZONTA, Micaela et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 43-50, 2003.
47. LIEBNER, Stefan; CZUPALLA, Cathrin J.; WOLBURG, Hartwig. Current concepts of blood-brain barrier development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 55, n. 4-5, p. 467-476, 2011.
48. ABBOTT, N. J. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 25: 5–23, 2005.
49. LEE, C. Justin et al. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. **The Journal of physiology**, v. 581, n. 3, p. 1057-1081, 2007.
50. PEREA, Gertrudis; ARAQUE, Alfonso. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1083-1086, 2007.
51. POLLAK, Daniela D. et al. Behavioral testing upregulates pCaMKII, BDNF, PSD-95 and egr-1 in hippocampus of FVB/N mice. **Behavioural brain research**, v. 163, n. 1, p. 128-135, 2005.
52. ENG, Lawrence F.; GHIRNIKAR, Roopa S.; LEE, Yuen L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). **Neurochemical research**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-1451, 2000.
53. WILHELMSSON, Ulrika et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 46, p. 17513-17518, 2006.
54. VERKHRATSKY, Alexei; BUTT, Arthur (Ed.). **Glial physiology and pathophysiology**. John Wiley & Sons, 2013.
55. SOFRONIEW, Michael V.; VINTERS, Harry V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.
56. PEKKNY, Milos; NILSSON, Michael. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 427-434, 2005.
57. BRÜCKNER, Gert et al. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 26, n. 1, p. 37-50, 2003.
58. LONG, Jeffrey M. et al. Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. **Neurobiology of aging**, v. 19, n. 5, p. 497-503, 1998.

59. AMARAL, David; LAVENEX, Pierre. Hippocampal neuroanatomy. 2007.
60. GLASER, E. M.; WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **Journal of Microscopy**, v. 192, n. 2, p. 163-171, 1998.
61. SLOMIANKA, L.; WEST, Mark J. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience**, v. 136, n. 3, p. 757-767, 2005.
62. KATO, Takeshi et al. The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. **Behavioural Brain Research**, v. 83, n. 1-2, p. 239-242, 1997.
63. YAMAMOTO, Tetsu; HIRAYAMA, Akihiko. Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. **Brain research**, v. 902, n. 2, p. 255-263, 2001.
64. ALMEIDA, M.N.F. **Memória espacial, atividade mastigatória e morfometria astrocítica do giro denteado e de CA1 do hipocampo do camundongo suíço albino em envelhecimento**. Belém, 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.
65. MENDES, F.C.C.S. **Influência da atividade mastigatória e do ambiente sobre o aprendizado espacial e a morfometria dos astrócitos do giro denteado em modelo murino senil**. Belém, 2019. Tese (doutorado em Neurociências e Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019. (Mendes, 2019)

APÊNDICES

APÊNDICES A – OS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS PARA CADA CAMADA ESTUDADA, UNIFORMEMENTE APLICADOS A TODOS OS ANIMAIS ESTUDADOS.

MOLECULAR – GD							
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm^2	A (x,y grade) μm^2	asf	tsf	ssf	No. de secções	ΣQ^*
<i>Hard Diet</i>							
HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.267 ± 0.0032	1/6	5	1455
HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.264 ± 0.0013	1/6	5	1522
HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.277 ± 0.0047	1/6	6	1495
HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.2703 ± 0.0052	1/6	5	1189
HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.277 ± 0.0047	1/6	5	1495
<i>Hard Diet / Soft Diet</i>							
HD 6M Animal 6	80 x 80	80 x 80	1	0.2742 ± 0.00197	1/6	5	1096
HD 6M Animal 7	80 x 80	80 x 80	1	0.3118 ± 0.0378	1/6	5	1458
HD 6M Animal 8	80 x 80	80 x 80	1	0.2772 ± 0.0072	1/6	5	1670
HD 6M Animal 9	80 x 80	80 x 80	1	0.3005 ± 0.0091	1/6	5	1419
HD 6M Animal 10	80 x 80	80 x 80	1	0.2909 ± 0.001	1/6	5	1411
<i>Hard Diet / Soft Diet / Hard Diet</i>							
HD 6M Animal 11	80 x 80	80 x 80	1	0.2904 ± 0.005	1/6	5	1233
HD 6M Animal 12	80 x 80	80 x 80	1	0.2813 ± 0.0045	1/6	5	1466
HD 6M Animal 13	80 x 80	80 x 80	1	0.2936 ± 0.0027	1/6	5	1335
HD 6M Animal 14	80 x 80	80 x 80	1	0.3092 ± 0.0089	1/6	5	1321
HD 6M Animal 15	80 x 80	80 x 80	1	0.294 ± 0.003	1/6	5	1345
POLIMÓRFICA – GD							
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm^2	A (x,y grade) μm^2	asf	Tsf	ssf	No. de secções	ΣQ^*

Hard Diet									
HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2699 ± 0.0041	1/6	5	833	
HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2634 ± 0.0004	1/6	5	1055	
HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2729 ± 0.0076	1/6	5	939	
HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2781 ± 0.0052	1/6	5	554	
HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2754 ± 0.0034	1/6	5	760	
Hard Diet / Soft Diet									
HD 6M Animal 6	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2752 ± 0.0262	1/6	4	628	
HD 6M Animal 7	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2935 ± 0.0244	1/6	5	695	
HD 6M Animal 8	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2773 ± 0.0091	1/6	5	1055	
HD 6M Animal 9	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.3006 ± 0.0117	1/6	5	744	
HD 6M Animal 10	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2867 ± 0.0085	1/6	5	780	
Hard Diet / Soft Diet / Hard Diet									
HD 6M Animal 11	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.295 ± 0.0075	1/6	5	816	
HD 6M Animal 12	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2768 ± 0.0033	1/6	5	804	
HD 6M Animal 13	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2989 ± 0.0041	1/6	5	741	
HD 6M Animal 14	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.3095 ± 0.0102	1/6	5	621	
HD 6M Animal 15	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.3144 ± 0.0152	1/6	5	721	
ORIENS – CA1									
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm^2	A (x,y) grade) μm^2	asf	Tsf	ssf	No. de secções	ΣQ		
Hard Diet									
HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.3188 ± 0.0812	1/6	5	381	
HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2877 ± 0.0114	1/6	5	606	
HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.3183 ± 0.0171	1/6	5	943	
HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.2879 ± 0.0013	1/6	5	565	
HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.3146 ± 0.0173	1/6	5	523	
Hard Diet / Soft Diet									
HD 6M Animal 6	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.3156 ± 0.0426	1/6	5	412	
HD 6M Animal 7	80 x 80	80 x 80	80 x 80	1	0.298 ± 0.0324	1/6	5	543	

HD 6M Animal 8	80 x 80	80 x 80	1	0.3257 ± 0.0223	1/6	5	364
HD 6M Animal 9	80 x 80	80 x 80	1	0.3139 ± 0.0085	1/6	5	481
HD 6M Animal 10	80 x 80	80 x 80	1	0.2825 ± 0.0066	1/6	5	545
Hard Diet / Soft Diet / Hard Diet							
HD 6M Animal 11	80 x 80	80 x 80	1	0.2893 ± 0.0284	1/6	5	736
HD 6M Animal 12	80 x 80	80 x 80	1	0.3243 ± 0.0128	1/6	5	415
HD 6M Animal 13	80 x 80	80 x 80	1	0.3298 ± 0.025	1/6	5	606
HD 6M Animal 14	80 x 80	80 x 80	1	0.3009 ± 0.0144	1/6	5	525
HD 6M Animal 15	80 x 80	80 x 80	1	0.3522 ± 0.0388	1/6	5	509
RADIATUM – CA1							
Sujeitos ^(a)	a (caixa) µm ²	A (x,y grade) µm ²	ssf	Tsf	ssf	No. de secções	ΣQ ⁻
Hard Diet							
HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.3042 ± 0.0483	1/6	5	660
HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.2869 ± 0.0136	1/6	5	673
HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.3219 ± 0.03	1/6	5	1139
HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.2828 ± 0.0117	1/6	5	802
HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.3083 ± 0.0189	1/6	5	757
Hard Diet / Soft Diet							
HD 6M Animal 6	80 x 80	80 x 80	1	0.3174 ± 0.0347	1/6	5	440
HD 6M Animal 7	80 x 80	80 x 80	1	0.3024 ± 0.0306	1/6	5	599
HD 6M Animal 8	80 x 80	80 x 80	1	0.3272 ± 0.0233	1/6	5	521
HD 6M Animal 9	80 x 80	80 x 80	1	0.3359 ± 0.0197	1/6	5	664
HD 6M Animal 10	80 x 80	80 x 80	1	0.2918 ± 0.0095	1/6	5	652
Hard Diet / Soft Diet / Hard Diet							
HD 6M Animal 11	80 x 80	80 x 80	1	0.3054 ± 0.0321	1/6	5	766
HD 6M Animal 12	80 x 80	80 x 80	1	0.3284 ± 0.0123	1/6	5	584
HD 6M Animal 13	80 x 80	80 x 80	1	0.3401 ± 0.0242	1/6	6	815
HD 6M Animal 14	80 x 80	80 x 80	1	0.311 ± 0.0143	1/6	5	748
HD 6M Animal 15	80 x 80	80 x 80	1	0.3607 ± 0.033	1/6	5	691

ORIENS – CA3							
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm^2	A (x,y grade) μm^2	asf	Tsf	ssf	No. de secções	ΣQ^*
<i>Hard Diet</i>							
HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.2494 ± 0.0164	1/6	5	643
HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.2862 ± 0.019	1/6	5	598
HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.2197 ± 0.0118	1/6	5	1128
HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.2106 ± 0.0198	1/6	5	780
HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.2693 ± 0.013	1/6	5	596
<i>Hard Diet / Soft Diet</i>							
HD 6M Animal 6	80 x 80	80 x 80	1	0.2822 ± 0.1026	1/6	5	381
HD 6M Animal 7	80 x 80	80 x 80	1	0.2703 ± 0.0294	1/6	5	708
HD 6M Animal 8	80 x 80	80 x 80	1	0.2721 ± 0.014	1/6	5	681
HD 6M Animal 9	80 x 80	80 x 80	1	0.2618 ± 0.0079	1/6	5	671
<i>Hard Diet / Soft Diet / Hard Diet</i>							
HD 6M Animal 10	80 x 80	80 x 80	1	0.2736 ± 0.0283	1/6	5	811
HD 6M Animal 11	80 x 80	80 x 80	1	0.2688 ± 0.0109	1/6	5	639
HD 6M Animal 12	80 x 80	80 x 80	1	0.2863 ± 0.0978	1/6	5	787
HD 6M Animal 13	80 x 80	80 x 80	1	0.2637 ± 0.0061	1/6	5	696
HD 6M Animal 14	80 x 80	80 x 80	1	0.3293 ± 0.0546	1/6	5	798
RADIATUM – CA3							
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm^2	A (x,y grade) μm^2	asf	Tsf	ssf	No. de secções	ΣQ^*
<i>Hard Diet</i>							
HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.2358 ± 0.0195	1/6	5	558
HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.2945 ± 0.0151	1/6	5	393
HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.2325 ± 0.0186	1/6	5	621
HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.2105 ± 0.0187	1/6	5	522
HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.2743 ± 0.017	1/6	5	441
<i>Hard Diet / Soft Diet</i>							
HD 6M Animal 6	80 x 80	80 x 80	1	0.3017 ± 0.0644	1/6	5	473

HD 6M Animal 7	80 x 80	80 x 80	1	0.2806 ± 0.0109	1/6	5	637
HD 6M Animal 8	80 x 80	80 x 80	1	0.2791 ± 0.0185	1/6	5	551
HD 6M Animal 9	80 x 80	80 x 80	1	0.2707 ± 0.0073	1/6	5	620
Hard Diet / Soft Diet / Hard Diet							
HD 6M Animal 10	80 x 80	80 x 80	1	0.2871 ± 0.0412	1/6	5	639
HD 6M Animal 11	80 x 80	80 x 80	1	0.2706 ± 0.0084	1/6	5	271
HD 6M Animal 12	80 x 80	80 x 80	1	0.3424 ± 0.0162	1/6	5	736
HD 6M Animal 13	80 x 80	80 x 80	1	0.2666 ± 0.0062	1/6	5	548
HD 6M Animal 14	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.0462	1/6	5	741

LEGENDA:

- a** - caixa de contagem
- A** - grade de contagem
- asf** - "area sampling fraction" = área bloco/área matriz (x,y)
- tsf** - "tissue sampling fraction" = altura do bloco/espessura da secção
- ssf** - "section sampling fraction" = secções contadas/total de secções
- ΣQ** - número de astócitos contados

Estimativa Individual Unilateral do Número (N) de Astrócitos com respectivos Coeficientes de Erro (CE) nas suas respectivas regiões do hipocampo.

MOLECULAR – GD

HD - 6M				HD/SD - 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	32762.49	26.1967 ± 0.1358	0.030046	AP SD 6M Animal 6	24271.85	25.7557 ± 0.8116	0.03873
AP HD 6M Animal 2	34637.74	26.5232 ± 0.0539	0.027368	AP SD 6M Animal 7	29155	23.1164 ± 0.9826	0.030623
AP HD 6M Animal 3	24791.74	24.8 ± 0.2	0.040636	AP SD 6M Animal 8	36534.17	25.3689 ± 0.2822	0.028865
AP HD 6M Animal 4	26607.43	26.0037 ± 0.1808	0.030189	AP SD 6M Animal 9	28660.03	23.5237 ± 0.2926	0.027395
AP HD 6M Animal 5	32381.14	25.3166 ± 0.1616	0.030922	AP SD 6M Animal 10	21163	22.464 ± 0.5098	0.034142
Mean	30236.11	25.77 ± 0.312	0.03	Mean	27956.81	24.05 ± 0.1605	0.03
SD	4276.873			SD	5814.553		
CV ²	0.020008			CV ²	0.043257		
Média (CE)	0.031832			Média (CE)	0.031951		
CE ²	0.001013			CE ²	0.001021		
CE ² /CV ²	0.050645			CE ² /CV ²	0.0236		
CVB ²	0.018995			CVB ²	0.042236		
CVB ² (%CV ²)	94.93555			CVB ² (%CV ²)	97.64		
HD/SD/HD / 6M							
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP SD 6M Animal 11	25457.49	24.201 ± 0.1859	0.030364	SD	7094.323		
AP SD 6M Animal 12	31548.09	25.0108 ± 0.1457	0.029327	CV ²	0.050845		
AP SD 6M Animal 13	43042.29	24.0721 ± 0.3872	0.025009	Média (CE)	0.03		
AP SD 6M Animal 14	25881.09	22.4 ± 0.4	0.032002	CE ²	0.000836		
AP SD 6M Animal 15	31381.71	22.8967 ± 0.4878	0.02785	CE ² /CV ²	0.016439		
Mean	31462.13	23.72 ± 0.0661	0.03	CVB ²	0.050009		
				CVB ² (%CV ²)	98.35615		

POLIMÓRFICA – GD							
HD - 6M				HD/SD - 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	19735.97	25.9871 ± 0.1659	0.040849	AP SD 6M Animal 6	13997.31	25.6766 ± 1.0803	0.057652
AP HD 6M Animal 2	24046.63	26.5813 ± 0.0202	0.036779	AP SD 6M Animal 7	14231.49	24.445 ± 0.7415	0.045794
AP HD 6M Animal 3	20681.74	25.7377 ± 0.3159	0.036701	AP SD 6M Animal 8	22969.97	25.409 ± 0.5148	0.041509
AP HD 6M Animal 4	12045.6	25.3209 ± 0.1676	0.04899	AP SD 6M Animal 9	15060.26	23.5056 ± 0.3295	0.045726
AP HD 6M Animal 5	16625.83	25.4584 ± 0.1276	0.042246	AP SD 6M Animal 10	10736.2	22.394 ± 0.4946	0.047497
Mean	18627.15	25.82 ± 0.16	0.04	Mean	15399.05	24.29 ± 0.63	0.05
SD	4531.657			SD	4541.582		
CV ²	0.059186			CV ²	0.086981		
Média (CE)	0.041113			Média (CE)	0.047636		
CE ²	0.00169			CE ²	0.002269		
CE ² /CV ²	0.028559			CE ² /CV ²	0.026088		
CVB ²	0.057496			CVB ²	0.084712		
CVB ² (%CV ²)	97.14414			CVB ² (%CV ²)	97.39122		
HD/SD/HD / 6M							
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP SD 6M Animal 11	16826.91	22.4 ± 1.1225	0.042375	SD	5603.405		
AP SD 6M Animal 12	17438.66	25.3177 ± 0.134	0.04708	CV ²	0.103874		
AP SD 6M Animal 13	26649.09	25.6733 ± 0.1	0.033033	Média (CE)	0.044056		
AP SD 6M Animal 14	12255.09	22.2 ± 0.3742	0.049382	CE ²	0.001941		
AP SD 6M Animal 15	13760.23	22.5363 ± 0.477	0.048412	CE ² /CV ²	0.018686		
Mean	17385.99	23.63 ± 0.44	0.04	CVB ²	0.101933		
				CVB ² (%CV ²)	98.13141		

ORIENS – CA1							
HD - 6M				HD/SD - 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espeçura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	7139.486	23.0125 ± 1.95	0.056356	AP SD 6M Animal 6	8268.429	22.5333 ± 1.17	0.052449
AP HD 6M Animal 2	12993.6	24.6236 ± 0.4	0.046728	AP SD 6M Animal 7	11327.14	23.8267 ± 1.03	0.048477
AP HD 6M Animal 3	17970.6	22.2088 ± 0.5	0.038591	AP SD 6M Animal 8	6915.429	21.7879 ± 0.7	0.053106
AP HD 6M Animal 4	12052.54	24.4343 ± 0.46	0.046358	AP SD 6M Animal 9	9443.314	22.6012 ± 0.28	0.043653
AP HD 6M Animal 5	10467.6	22.69 ± 0.54	0.046274	AP SD 6M Animal 10	11758.46	24.9605 ± 0.2623	0.041733
Mean	12124.77	23.39 ± 0.78	0.05	Mean	9542.55	23.14 ± 0.7	0.05
SD	3953.893			SD	2038.996		
CV ²	0.106342			CV ²	0.045657		
Média (CE)	0.0469			Média (CE)	0.047884		
CE ²	0.0022			CE ²	0.002293		
CE ² /CV ²	0.020684			CE ² /CV ²	0.050219		
CVB ²	0.104142			CVB ²	0.043364		
CVB ² (%CV ²)	97.93156			CVB ² (%CV ²)	94.97808		
HD/SD/HD / 6M							
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espeçura (µm)	CE (Scheaffer)
AP SD 6M Animal 11	15625.71	24.5485 ± 1.07	0.041352	SD	3019.251		
AP SD 6M Animal 12	7799.057	21.7792 ± 0.43	0.050983	CV ²	0.077672		
AP SD 6M Animal 13	11307.34	21.5399 ± 0.72	0.045081	Média (CE)	0.047154		
AP SD 6M Animal 14	10604.91	23.4124 ± 0.49	0.049678	CE ²	0.002223		
AP SD 6M Animal 15	8830.114	20.257 ± 0.93	0.048676	CE ² /CV ²	0.028627		
Mean	10833.43	22.31 ± 0.73	0.05	CVB ²	0.075449		
				CVB ² (%CV ²)	97.13733		

RADIATUM – CA1							
HD - 6M				HD/SD - 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espeçsura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	13379.57143	23.5175 ± 1.33	0.038337	AP SD 6M Animal 6	8411.314	22.3135 ± 0.98	0.052027
AP HD 6M Animal 2	14269.37143	24.6586 ± 0.51	0.039213	AP SD 6M Animal 7	12215.57	23.426 ± 0.94	0.041528
AP HD 6M Animal 3	21801.6	22.0416 ± 0.99	0.035373	AP SD 6M Animal 8	9707.057	21.635 ± 0.7	0.04172
AP HD 6M Animal 4	17233.97143	24.889 ± 0.45	0.038098	AP SD 6M Animal 9	11952	21.0335 ± 0.57	0.034419
AP HD 6M Animal 5	15100.62857	22.9929 ± 0.56	0.037112	AP SD 6M Animal 10	13537.8	24.1735 ± 0.33	0.038837
Mean	16357.03	23.62 ± 0.78	0.04	Mean	11164.75	22.52 ± 0.71	0.04
SD	3362.086			SD	2065.286		
CV ²	0.042248			CV ²	0.034219		
Média (CE)	0.0376			Média (CE)	0.041706		
CE ²	0.001414			CE ²	0.001739		
CE ² /CV ²	0.033463			CE ² /CV ²	0.050832		
CVB ²	0.040835			CVB ²	0.032479		
CVB ² /(%CV ²)	96.65368			CVB ² /(%CV ²)	94.91678		
HD/SD/HD / 6M							
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espeçsura (µm)	CE (Scheaffer)
AP SD 6M Animal 11	15494.57	23.2691 ± 1.07	0.037087	SD	2081.142		
AP SD 6M Animal 12	10713.94	21.4899 ± 0.39	0.039178	CV ²	0.024079		
AP SD 6M Animal 13	14380.03	20.7708 ± 0.61	0.03293	Média (CE)	0.0373		
AP SD 6M Animal 14	14769.43	22.7032 ± 0.45	0.040573	CE ²	0.001391		
AP SD 6M Animal 15	11700.77	19.6656 ± 0.75	0.036772	CE ² /CV ²	0.057781		
Mean	13411.75	21.58 ± 0.66	0.04	CVB ²	0.022687		
				CVB ² /(%CV ²)	94.2219		

ORIENS – CA3						
HD - 6M				HD/SD - 6M		
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	16145.74	28.7344 ± 0.8475	0.039466	AP SD 6M Animal 6	8900.057	0.054818
AP HD 6M Animal 2	12813.51	24.9438 ± 0.7073	0.043286	AP SD 6M Animal 7	15922.2	0.036663
AP HD 6M Animal 3	31023.94	32.1604 ± 0.7571	0.026612	AP SD 6M Animal 8	15078.26	0.038716
AP HD 6M Animal 4	22152.94	33.8131 ± 1.3221	0.032916	AP SD 6M Animal 9	15481.71	0.036356
AP HD 6M Animal 5	13489.89	26.2648 ± 0.5476	0.04389	Mean	13845.56	0.04
Mean	19125.21	29.18 ± 0.84	0.04			
SD	7602.937			SD	3314.965	
CV ²	0.158034			CV ²	0.057324	
Média (CE)	0.0372			Média (CE)	0.0416	
CE ²	0.001384			CE ²	0.001731	
CE ² /CV ²	0.008757			CE ² /CV ²	0.030189	
CVB ²	0.15665			CVB ²	0.055594	
CVB ² /(%CV ²)	99.12434			CVB ² /(%CV ²)	96.98109	
RADIATUM – CA3						
HD - 6M				HD/SD/HD / 6M		
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	CE (Scheaffer)
AP SD 6M Animal 10	18115.71	26.1508 ± 1.19	0.034832	SD	1419.485	
AP SD 6M Animal 11	14394.94	26.1902 ± 0.48	0.03766	CV ²	0.008103	
AP SD 6M Animal 12	15123.86	22.3053 ± 0.622	0.035628	Média (CE)	0.0359	
AP SD 6M Animal 13	15917.83	26.5954 ± 0.2471	0.037824	CE ²	0.001289	
AP SD 6M Animal 14	15293.31	22.1139 ± 1.4	0.03339	CE ² /CV ²	0.159053	
Mean	15769.13	24.67 ± 0.79	0.04	CVB ²	0.006814	
				CVB ² /(%CV ²)	84.09466	

Sujeitos	N	Espessura (μm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (μm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	14593.03	30.1835 \pm 1.085	0.038173	AP SD 6M Animal 6	9963	25.1781 \pm 2.0	0.051876
AP HD 6M Animal 2	8010.943	24.1103 \pm 0.4822	0.046612	AP SD 6M Animal 7	13718	25.4534 \pm 1.0	0.035653
AP HD 6M Animal 3	16166.66	30.4105 \pm 1.0726	0.035678	AP SD 6M Animal 8	11874.68571	25.2198 \pm 0.73	0.042601
AP HD 6M Animal 4	15122.66	33.6513 \pm 1.2412	0.037213	AP SD 6M Animal 9	13831.28571	26.2432 \pm 0.39	0.036882
AP HD 6M Animal 5	9498.771	25.749 \pm 0.6949	0.04762	Mean	12346.74	25.52 \pm 1.04	0.04
Mean	12678.41	28.82 \pm 0.92	0.04				
SD	3664.128			SD	1824.763		
CV ²	0.083524			CV ²	0.021843		
Média (CE)	0.0411			Média (CE)	0.0418		
CE ²	0.001689			CE ²	0.001747		
CE ² /CV ²	0.020224			CE ² /CV ²	0.079992		
CVB ²	0.081835			CVB ²	0.020096		
CVB ² (%CV ²)	97.97758			CVB ² (%CV ²)	92.00084		
HD/SD/HD / 6M							
Sujeitos	N	Espessura (μm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (μm)	CE (Scheaffer)
AP SD 6M Animal 10	13521.86	25.0322 \pm 1.63	0.039559	SD	3155.533		
AP SD 6M Animal 11	6048.514	25.9567 \pm 0.36	0.046759	CV ²	0.073647		
AP SD 6M Animal 12	13428.26	21.0256 \pm 0.42	0.03686	Média (CE)	0.0383		
AP SD 6M Animal 13	12350.74	26.2954 \pm 0.244	0.03634	CE ²	0.001467		
AP SD 6M Animal 14	12789.43	20.5811 \pm 1.08	0.032181	CE ² /CV ²	0.019918		
Mean	11627.76	23.78 \pm 0.75	0.04	CVB ²	0.07218		
				CVB ² (%CV ²)	98.00821		

LEGENDA:

N = Média número de astrócitos por grupo

SD = Desvio padrão

CV = N/SD X SD/N (CV, coeficiente de variação)

CVB² = CV² - CE² (CVB, coeficiente de variação biológica)

ANEXO**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

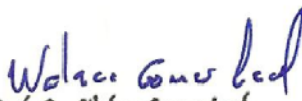
Vigência: 04/2014 a 05/2018

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 e 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