



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

**ALTERAÇÃO MASTIGATÓRIA, AMBIENTE ENRIQUECIDO E
ENVELHECIMENTO: ESTUDOS ESTEREOLÓGICOS DE CA1 DO
HIPOCAMPO DO CAMUNDONGO SUÍÇO ALBINO**

**ANDRÉ PINHEIRO GURGEL FELÍCIO
FABÍOLA DE CARVALHO CHAVES DE SIQUEIRA MENDES**

**Belém – PA
2011**

**ANDRÉ PINHEIRO GURGEL FELÍCIO
FABÍOLA DE CARVALHO CHAVES DE SIQUEIRA MENDES**

**ALTERAÇÃO MASTIGATÓRIA, AMBIENTE ENRIQUECIDO E
ENVELHECIMENTO: ESTUDOS ESTEREOLÓGICOS DE CA1 DO
HIPOCAMPO DO CAMUNDONGO SUÍÇO ALBINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará. Orientadora:
Prof^ª Dr^a Marcia Consentino Kronka
Sosthenes.

**Belém – PA
2011**

**ANDRÉ PINHEIRO GURGEL FELÍCIO
FABÍOLA DE CARVALHO CHAVES DE SIQUEIRA MENDES**

**ALTERAÇÃO MASTIGATÓRIA, AMBIENTE ENRIQUECIDO E
ENVELHECIMENTO: ESTUDOS ESTEREOLÓGICOS DE CA1 DO HIPOCAMPO
DO CAMUNDONGO SUÍÇO ALBINO**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina
pela Universidade Federal do Pará.**

Banca examinadora:

Orientador

Nome / Instituição

Nome / Instituição

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Conceito: _____

**Belém – PA
2011**

Santa Teresa de Calcutá certa vez disse: “você jamais deve passar pela vida de alguém sem procurar fazer o seu máximo para que a vida dessa pessoa seja melhor”. Por isso, dedico esse trabalho aos que fizeram toda a diferença em minha vida.

Aos meus pais, que me proporcionaram a oportunidade da vida e que, mesmo com nossas diferenças, nunca deixaram de me apoiar e de me propiciar as condições necessárias para que eu pudesse viver esse momento.

À senhorita Alzira Freitas (cujo exemplo de moral e dignidade, fizeram de mim alguém um pouco melhor) e à Profª Drª Marcia Sosthenes (com quem muito aprendi a respeito do fabuloso mundo chamado ciência).

E por fim, não poderia deixar de citar nessa dedicatória as médicas (preceptoras e residentes - 2011) da Enfermaria de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário João de Barros Barreto, com quem muito aprendi e cuja dedicação e carinho para com os pacientes, fizeram-me redescobrir a beleza do “ser médico”.

André Pinheiro Gurgel Felício

Como símbolo do cumprimento de uma etapa tão importante em minha vida, dedico este trabalho aos meus avós (*in memoriam*), cujos sólidos princípios legados permitiram-me chegar até aqui e a prosseguir em minha caminhada.

Aos meus amados pais e irmão, sempre presentes. Meus alicerces e referências de pessoas de bem. À minha mãe, em especial, pela compreensão, cuidado e companhia incondicional em horas de trabalho nas madrugadas.

À querida Nina, amiga-irmã, que muito me ensinou. Juntas trabalhamos em prol dos mesmos sonhos.

À minha inesquecível orientadora, Profª Marcia, pelo carinho, presença e contribuição marcantes em minha vida acadêmica.

Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes

AGRADECIMENTOS

Agradecemos inicialmente a Deus, agente responsável por nossa existência e por todo o infinito e infinitésimo do universo. Nossas forças traduzidas em nossa fé permitiram-nos seguir em nossa caminhada com resiliência.

Em segundo lugar, gostaríamos de dizer obrigado aos nossos pais, Norma e Siqueira Mendes, Socorro e Otavio Felício, instrumentos dos desígnios de Deus para que isso tudo fosse possível.

Lembramos também dos nossos demais familiares, personagens importantes no decorrer dessa história, sem os quais certamente nosso caminho teria sido percorrido de maneira mais árdua ao longo dos últimos seis anos.

Shakespeare certa vez disse que os amigos são a família que nos é permitido escolher. Por isso, àqueles que nos honram com a sua amizade, sintam-se todos abraçados e recebam junto com os acima citados o nosso efusivo agradecimento.

O nosso obrigado a todos os membros do LNI que fizeram, fazem e continuarão a fazer parte de nossa história, em especial aos nossos companheiros e amigos do grupo “MASTIGATÓRIO”, os quais junto conosco trabalharam para ao final termos uma história para contar na comunidade científica.

Por fim, porem não menos importante, o nosso singular agradecimento à Msc Marina Almeida, a nossa orientadora Prof^{ta} Dr^a Marcia Sosthenes e ao Prof Dr. Cristovam Diniz, pessoas que muito nos ensinaram e que sem os quais não teríamos conseguido chegar até aqui.

*“Um pouco de ciência nos afasta de
Deus. Muito, nos aproxima”.*

Louis Pasteur

RESUMO

Para investigar possíveis influências do ambiente enriquecido nas mudanças da distribuição laminar dos astrócitos em CA1 induzidas por um regime de mastigação reduzida, fêmeas adultas de camundongos Suíços albinos foram alimentadas com dieta em pó (soft diet - SD) ou em pellet (hard diet - HD) e mantidas em condições ambientais empobrecidas ou enriquecidas. Após 6, 12 ou 18 meses, secções histológicas foram obtidas e imunomarcadas para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para identificar os astrócitos, sendo seu número estimado por método estereológico através do fracionador óptico utilizando ensaio cego. De posse das estimativas da distribuição laminar dos astrócitos em CA1 nos diferentes grupos experimentais, empregou-se a análise de variância de dois critérios para estimar a contribuição de cada variável (ambiente e idade) para as mudanças. Os resultados revelaram influências aditivas dessas variáveis com contribuições laminares distintas para cada uma delas. Realmente, com exceção do stratum pyramidale, onde o ambiente enriquecido parece aumentar o efeito da idade e da mastigação reduzindo o número de astrócitos, em todas as outras camadas o ambiente enriquecido parece atuar na direção contrária dos efeitos produzidos pela mastigação e envelhecimento. Assim, encontrou-se efeitos diferenciais promovidos pela idade, condição mastigatória e ambiente sobre a distribuição laminar dos astrócitos de CA1 e nós sugerimos a ocorrência de pelo menos dois perfis astrocíticos distintos associados a esses eventos. Os mecanismos moleculares possivelmente associados a esses efeitos diferenciais permanecem por ser investigados.

Palavras – chave: alteração mastigação, ambiente enriquecido, envelhecimento, astrócitos, fracionador óptico.

ABSTRACT

To investigate possible influences of enriched environment on the changes of CA1 astrocytic laminar distribution induced by reduced mastication, female albino Swiss mice fed with soft diet (SD) or hard diet (HD) were housed from weaning either in impoverished conditions or in enriched conditions. After 6, 12 and 18 months brain hippocampal sections from both HD and SD animals were immunolabeled for glial fibrillary acid protein to identify astrocytes and a blind optical fractionator's analysis was applied to assess possible changes in the laminar distribution. SD as compared to HD stereological estimations revealed that the laminar distribution of astrocytes in CA1 was differentially affected by reduced mastication and aging and these variables seem to produce additive effects. Apart from *stratum pyramidale* where enriched environment seem to increase aging and masticatory effects of reduction in the number of astrocytes, in all other layers enriched environment seems to counteract the impact of masticatory deprivation and aging. Thus, differential effects on CA1 astrocytic laminar distribution were found as a function of masticatory deprivation, age and environment suggesting that at least two different profiles of astrocytes may be contributing to these events. Possible molecular mechanisms associated to these differences remain to be investigated.

Key-words: masticatory deprivation, enriched environment, aging, astrocytes, optical fractionators.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. OBJETIVO GERAL.....	19
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL.....	20
2.2. CÉLULAS DA GLIA.....	21
2.3. PLASTICIDADE CEREBRAL, AMBIENTE E ENVELHECIMENTO.....	23
2.4. ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA, DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E DECLÍNIO COGNITIVO.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. ANIMAIS.....	27
3.2. ALIMENTAÇÃO E TEMPO DE VIDA.....	27
3.3. ALOJAMENTO.....	28
3.4. PERFUSÃO E CORTES.....	30
3.5. ENSAIOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS APLICADOS.....	30
3.5.1. Contracoloração de Nissl.....	32
3.6. ANÁLISE ESTEREOLOGIA.....	33
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
3.8. FOTOMICROGRAFIAS E PÓS-PROCESSAMENTO DE IMAGENS.....	39
4. RESULTADOS	39
4.1. CA1 E SUAS CAMADAS.....	39
4.2. AMBIENTE PADRÃO: NÚMERO TOTAL DE ASTRÓCITOS E QUANTIFICAÇÕES POR CAMADAS.....	43
4.3. AMBIENTE PADRÃO E AMBIENTE ENRIQUECIDO: ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE ASTRÓCITOS NAS DIFERENTES JANELAS TEMPORAIS.....	45
5. DISCUSSÃO	47
5.1. ASTRÓCITOS, ENVELHECIMENTO E PRIVAÇÃO MASTIGATÓRIA.....	48
5.2. ASTRÓCITOS, ENVELHECIMENTO E FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL EM CA1.....	50
5.3. ASTRÓCITOS, ALTERAÇÃO MASTIGATÓRIA E AMBIENTE ENRIQUECIDO.....	51

5.4. PRIVAÇÃO MASTIGATÓRIA, DECLÍNIO COGNITIVO E POPULAÇÃO ASTROCITÁRIA.....	52
5.5. AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA DA DISTRIBUIÇÃO LAMINAR DOS ASTRÓCITOS.....	53
5.6. HORMÔNIOS E ASTRÓCITOS.....	55
6. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICES.....	67
ANEXOS.....	83

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Circuito tri-sináptico simplificado do hipocampo. Corno de Amon 1, 2, 3 e 4 (CA1, CA2, CA3, CA4). O giro denteado recebe as projeções do córtex entorrinal através da via perforante (1ª sinapse) e projeta através dos axônios das células granulares para CA3 (2ª sinapse). Este último projeta para CA1 (3ª sinapse) através dos axônios das células piramidais. Fonte: www.uni-leipzig.de/.../graphic_hippo_farbig.html. 20
- Figura 2** - Alojamento dos animais em ambiente padrão. **A** - Grupo *Hard Diet*. **B** - Grupo *Soft Diet* com recipiente de aço inoxidável para ração farelada (sua tampa apresenta o centro perfurado em forma circular, dando acesso ao farelo e deslocável, cedendo em direção ao fundo do pote à medida que a ração era consumida). 29
- Figura 3** - Alojamento dos animais em ambiente enriquecido. O ambiente era modificado semanalmente a partir da alteração no posicionamento dos objetos ou mesmo troca destes. 29
- Figura 4** - Contornos ilustrando a disposição e as dimensões relativas das caixas de contagem (quadrados). As arestas verdes das caixas de contagem ilustram os planos permitidos e as representadas em vermelhas, os planos proibidos. Neste caso, a largura e o comprimento da caixa equivalem a 80µm e o espaçamento entre elas é igual 80µm. A profundidade da caixa escolhida para esta estimativa foi de 7µm. **A:** *Stratum lacunosum-moleculare* de CA1. **B:** *Stratum radiatum* de CA1. **C:** *Stratum pyramidale* de CA1. **D:** *Stratum oriens* de CA1. 36
- Figura 5** - Fotomicrografias de secção horizontal do hipocampo imunomarcada para GFAP ilustrando os objetos (astrócitos) e as regiões (camadas) de interesse do camundongo albino suíço. Note a diferença na morfologia dos astrócitos das diferentes camadas. **A:** *Stratum lacunosum-moleculare* de CA1. **B:** *Stratum oriens* de CA1. **C:** *Stratum pyramidale* de CA1. **D:** *Stratum radiatum* de CA1. Escalas: menor aumento = 250 µm, maior aumento = 25 µm. 40
- Figura 6** - Fotomicrografias de secção horizontal do hipocampo imunomarcada para GFAP ilustrando a camada piramidal (note a faixa azulada após contra-coloração pelo Nissl) e o *Stratum oriens*, para os grupos *Hard Diet* –HD e *Soft Diet* –SD criados sob um ambiente padrão (AP) ou enriquecido (AE). Escala = 40 µm. 41

Figura 7 - Fotomicrografias de secção horizontal do hipocampo imunomarcada para GFAP ilustrando o *Stratum lacunosum-moleculare* de CA1 e *radiatum* para os grupos *Hard Diet* –HD e *Soft Diet* -SD criados sob um ambiente padrão (AP) ou enriquecido (AE). Notar os dendritos de astrócitos mais longos na camada *Radiatum* e com maior número de ramificações e o *background* tecidual sempre com níveis inferiores à Lacunso Molecular. Escala = 40 µm. 42

Gráfico 1 - Representação gráfica do número total de astrócitos em CA1 do hipocampo para os animais com 6, 12 e 18 meses de idade criados em ambiente pobre de estímulos (ambiente padrão) e alimentados com pellet-HD, *Hard diet* e ração farelada-SD, *Soft diet*. (# = $p < 0,05$ para SD em diferentes idades). 43

Gráfico 2 - Número total de astrócitos por camada da região de CA1 do hipocampo para os animais com 6, 12 e 18 meses de idade criados em ambiente padrão. **A** – *Stratum lacunosum-moleculare*. **B** – *Stratum pyramidale*. **C** – *Stratum oriens*. **D** – *Stratum radiatum*. (# = $p < 0,05$ para os grupos SD ou HD em diferentes idades; ## = $p < 0,01$ para os grupos SD ou HD em diferentes idades; * = $p < 0,05$ entre SD e HD com mesma idade). 44

Gráfico 3 - Representação gráfica do número total de astrócitos de CA1 do hipocampo para os animais criados em ambiente enriquecido (AE) e padrão (AP) e alimentados com pellet-HD e ração farelada-SD nas diferentes idades: **A** - aos 6 meses; **B** – 18 meses; **C** - 12 meses. Em todas as situações de análises estatísticas obtivemos $p > 0,05$. 45

Gráfico 4 - Representação gráfica do número total de astrócitos de CA1 do hipocampo para os animais com 6, 12 e 18 meses de idade criados em ambiente enriquecido e alimentados com pellet-HD e ração farelada-SD. Notar que nessas condições ambientais a região de CA1 do hipocampo parece não sofrer os impactos da dieta ($p > 0,05$). 46

Gráfico 5 - Número total de astrócitos por camada da região de CA1 do hipocampo para os animais com 6, 12 e 18 meses de idade criados em ambiente enriquecido. **A** – *Stratum lacunosum-moleculare*. **B** – *Stratum pyramidale*. **C** – *Stratum oriens*. **D** – *Stratum radiatum*. (# = $p < 0,05$ para os grupos SD ou HD em diferentes idades; ## = $p < 0,01$ para os grupos SD ou HD em diferentes idades). 47

Quadro 1 - Número de animais para cada grupo criado em ambiente padrão (AP), segundo a janela temporal e o tipo de ração ofertada. 28

Quadro 2 - Número de animais para cada grupo criado em ambiente enriquecido (AE), segundo a janela temporal e o tipo de ração ofertada. 28

Quadro 3 - Protocolo da reação de imunohistoquímica para detecção da proteína fibrilar glial (GFAP). 32

Quadro 4 - Protocolo da coloração de NISSL. 33

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - Complexo avidina-biotina-peroxidase.

AE - Ambiente Enriquecido.

AP - Ambiente Padrão.

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

BDNF - Brain Derived Neurotrophic Factor

CA - Corno de Amon.

CE - Coeficiente de Scheaffer.

CEPAE - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

CPOD - Dentes cariados, perdidos ou obturados.

CV - Coeficiente de variação para as estimativas.

CVB - Coeficiente de Variação Biológica.

DA - Doença de Alzheimer.

DAB - Diaminobenzidine Tetrahydrochloride.

DNA - Ácido Desoxirribonucléico.

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético.

FAPESPA - Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará.

GABA - Ácido Gama-Amino Butírico.

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial.

GND - Reação de glucose, níquel e DAB.

HD - Hard diet.

HUJBB - Hospital Universitário João de Barros Barreto.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

ICB - Instituto de Ciências Biológicas.

LNI - Laboratório de Investigação em Neurodegeneração e Infecção.

MOM - Mouse on Mouse.

N - Número total de astrócitos.

NIH - National Institute of Health.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

PB - Tampão Fosfato.

PBS - Tampão Fosfato Salina.

PBST - Tampão Fosfato Salina Triton.

pH - Potencial Hidrogeniônico.

SD - Soft diet.

SNC - Sistema Nervoso Central.

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

TRIS - Hidroximetil Amino metano.

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

UFPA - Universidade Federal do Pará.

ΣQ - Número de astrócitos contados.

6M - Seis meses.

12M - Doze meses.

18M - Dezoito meses.

1. INTRODUÇÃO

Com a elevação da expectativa de vida, em especial nos países desenvolvidos, tem-se constatado um aumento significativo da população de idosos, assim como, um acréscimo na prevalência de demências (FRIDMAN *et al.*, 2004; LOPES; BOTTINO, 2002; TERASAWA *et al.*, 2002). O aumento da população idosa – considerada com idade acima de 65 anos – reforça a necessidade de uma compreensão minuciosa a respeito do processo de envelhecimento e de suas alterações e consequências, preocupação esta constante e pertinente na comunidade médica.

Segundo dados estatísticos obtidos de um total de 193 países pesquisados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2007 a população de pessoas acima dos 60 anos oscilava em torno de 11%. Regionalmente, havia uma variação dessa taxa a qual revelava o percentual de 5% na África e 19% na Europa (OMS, 2009).

No Brasil, de acordo com o censo realizado no ano 2000, possuíamos uma população de 10 milhões de pessoas com 65 anos ou mais - algo em torno de 6% da população nacional - colocando-nos, entre os 11 países com maior prevalência de pessoas dessa faixa etária. Segundo as estimativas, a população de idosos brasileira apresentará um crescimento 10 vezes maior do que a população geral até 2050 (DIAS *et al.*, 2006).

Em dados mais recentes divulgados no censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010, o percentual de idosos na população segue em crescimento, atingindo 7,4% da população brasileira e, em números absolutos, o país possui mais idosos (14 milhões) que crianças de até 4 anos de idade (13,8 milhões).

Frente a essa progressiva alteração na pirâmide demográfica mundial e brasileira nas últimas cinco décadas, revelando o crescimento da população idosa e concomitante aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas associadas, é esperado o impacto econômico dessas morbidades nas contas públicas. Observa-se, certamente, um grande desafio para os gestores da saúde (WICK, 2000), sobretudo no planejamento das políticas públicas de saúde,

tendo em vista que nem sempre essas são capazes de promover uma melhor qualidade de vida a essa população (KALARIA *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos da América, em 1998, esses custos chegaram a 100 bilhões de dólares por ano com cuidados formais (uso dos serviços públicos de saúde, acompanhamento residencial, etc), acrescidos de mais 18 bilhões de dólares com custos informais, exemplificados por cuidados não contabilizados por membros da família e a renda não gerada pelas restrições em desenvolver atividades laborais (SADIK, 2003).

No Brasil, um estudo realizado em Catanduva, interior do Estado de São Paulo, constatou que a prevalência de demência na população acima dos 65 anos de idade foi de 7,1%. Esses dados foram obtidos após o acompanhamento de um expressivo número de idosos, desde 1997 e, revelaram também, que a Doença de Alzheimer (DA) foi a responsável por 55% desses casos, percentual esse compatível com os dados da população nacional brasileira (CARAMELLI *et al.*, 2002).

Só no Estado de São Paulo, a incidência de DA representava 7,7/1000 pessoas/ano em meados do ano 2000 (CARAMELLI *et al.*, 2004). Já no Estado do Rio Grande do Sul, essas taxas chegavam a 14,8/1000 pessoas/ano, de acordo com uma pesquisa que acompanhou por até oito anos um considerável número de idosos (CAMOZATTO *et al.*, 2009).

Nesse contexto, as demências se tornam cada vez mais prevalentes e dentre essas, a DA ganha destaque como a mais importante doença neurodegenerativa da atualidade, atingindo proporções que a colocam com grande importância em termos de saúde pública, sobretudo por configurar nos países desenvolvidos como a terceira causa de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares e para o câncer (BURNS; BYRNE; MAURER, 2002; FRIDMAN *et al.*, 2004).

Somado a isso, estudos recentes vem afirmando que a redução da habilidade mastigatória estaria relacionada à demência senil. A perda dental, por exemplo, é sugerida como sendo um fator de risco para o desenvolvimento da DA (KONDO; NIINO; SHIDO, 1994; ONOZUKA *et al.*, 2000) e o mau funcionamento da mastigação poderia afetar a função

cerebral, com diminuição na densidade neuronal na região do Corno de Amon 1(CA1), do hipocampo e na formação sináptica tanto do hipocampo como um todo, quanto no córtex parietal (ONOZUKA *et al.*, 2002; TERASAWA *et al.*, 2002).

Apesar dos resultados dos estudos citados, a saúde oral, no caso brasileiro, ainda não possui a evidência merecida, principalmente quando se aborda as condições de saúde da população idosa. A perda total de dentes (edentulismo) ainda é aceita pela sociedade como algo normal e natural com o avanço da idade e não como reflexo da falta de políticas preventivas de saúde, destinadas especialmente à população adulta para que esta mantenha seus dentes até idades mais avançadas (HIRAMATSU; TOMITA; FRANCO, 2007).

Colussi e Freitas (2002), em uma revisão crítica de estudos epidemiológicos apresentados nas publicações nacionais com relação à saúde oral do idoso, constataram que, em geral, o aumento da idade foi acompanhado pela redução do número de dentes, elevação do percentual de dentes perdidos por cárie e aumento do índice CPOD (índice que expressa a média de dentes cariados, perdidos e obturados em um grupo de indivíduos). Meneguim e Saliba (2000), em seu trabalho, perceberam que o número de dentes extraídos representou 71,4% do índice CPOD para a faixa etária de 45-59 anos, passando para 92,5% nos indivíduos de setenta anos ou mais.

Aoki *et al.* (2005) afirmaram que a neurogênese que ocorre no giro denteado do hipocampo, uma importante região para a memória e aprendizado em roedores e em humanos, é regulada por alguns fatores, como exposição a um ambiente enriquecido, atividade física, envelhecimento e estresse. Somam-se a esses fatores, a influência da atividade mastigatória, que seria um elemento comportamental oral associado à neurogênese. Mitome; Hasegawa e Shirakawa (2005) detectaram que a mastigação influenciaria a sobrevivência das novas células geradas no giro denteado adulto.

A formação hipocampal, que desempenha um papel fundamental na memória espacial, é muito sensível ao processo de envelhecimento, sendo uma das primeiras regiões do cérebro a evidenciar mudanças morfológicas, fisiológicas e neuroquímicas com o avanço da idade. Bases de testes de aprendizagem em ratos sem os dentes molares mostraram que a

disfunção oclusal poderia estar envolvida no processo de degeneração associada à demência senil (WATANABE *et al.*, 2002).

Dessa maneira, pode-se justificar a importância da investigação dos fatores de risco, das bases biológicas e dos mecanismos neuropatológicos associados ao comportamento doentio ao longo do processo de interação entre neurodegeneração crônica e mastigação, com a finalidade de gerar evidências que permitam melhores ações de gestão pública na área da saúde (KALARIA *et al.*, 2008).

Por outro lado, tem sido descrito que o fluxo sanguíneo cerebral em várias regiões do cérebro é afetado pela mastigação (SESAY *et al.*, 2000; ONOZUKA *et al.*, 2002; HASEGAWA *et al.*, 2011) e que os astrócitos podem desenvolver papel chave na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (FIGLEY; STROMAN, 2011; LECRUX *et al.*, 2011; KUGA *et al.*, 2011; GIROUARD *et al.*, 2010). A regulação do fluxo sanguíneo cerebral parece ser feita através do cálcio astrocítico responsável por ondas de sinalização que podem induzir tanto a dilatação quanto a constrição das arteríolas como uma função da sua concentração (GIROUARD *et al.*, 2010).

É imprescindível, então, o desenvolvimento de modelos experimentais que simulem o quadro neuropatológico e comportamental para identificar as áreas e as células do sistema nervoso central (SNC) alteradas na fase inicial da doença, assim como, fatores predisponentes. Mesmo diante de todos os avanços promovidos pela ciência nos últimos tempos, ainda há muito que se pesquisar em relação à neurobiologia do processo de envelhecimento, sobretudo a respeito dos mecanismos comprometedores do desempenho cognitivo apresentado por alguns indivíduos que atravessam esse período da vida, tornando vital a realização de pesquisas que ajudem a distinguir o limiar que separa a normalidade das patologias (HEDDEN *et al.*, 2004).

1.1. OBJETIVO GERAL

Verificar se a exposição às alterações mastigatórias e a fatores outros, como a um ambiente enriquecido induzido experimentalmente em modelo murino senil, influenciaria no perfil de distribuição laminar dos astrócitos na região de CA1 do hipocampo.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Implantar modelo experimental para redução dos estímulos mastigatórios, empregando ração farelada a partir dos 21 dias pós-natal até o fechamento da janela temporal (dia do sacrifício);

b) Estabelecer grupos de animais controle em relação à idade (6, 12 e 18 meses) e em relação ao ambiente, comparando-os com os animais experimentais submetidos ao envelhecimento, à restrição mastigatória e ao enriquecimento ambiental;

c) 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 na região de CA1 do hipocampo e suas laminações;

d) Estimar a população astrogliar nas áreas de CA1 do hipocampo e suas laminações, relacionando-as com o ambiente enriquecido e com os processos neuropatológicos que podem se manifestar durante o envelhecimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Tendo-se em vista que as alterações a serem mensuradas possuem relação direta com a formação hipocampal, é relevante rever sua anatomia funcional.

2.1. ANATOMIA FUNCIONAL DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL

A formação hipocampal é uma região da face medial do lobo temporal de mamíferos, que inclui o hipocampo propriamente dito com as suas camadas polimórfica (*stratum oriens*), piramidal (*stratum pyramidale*) e molecular (*stratum radiatum* e *stratum lacunosum-moleculare*), o giro denteado (com as camadas polimórfica, granular e molecular), o *subiculum* e o córtex entorrinal. O hipocampo constitui um circuito tri-sináptico e é subdividido em quatro regiões chamadas Cornos de Amon (CA) 1, 2, 3 e 4, sendo que, em virtude de suas sinapses com outras regiões cerebrais, é, por alguns estudiosos, reconhecidamente uma importante área receptora e integradora de informações de todas as modalidades sensoriais.

O córtex entorrinal, através da via perfurante, realiza na camada molecular sinapses com as células granulares do giro denteado. Estas, em sequência, emitem axônios (fibras musgosas) que se conectam aos neurônios piramidais de CA3 nos *strata lucidum* e *radiatum*. De CA3, partem axônios (colaterais de Schaffer) para formar sinapses com as células piramidais de CA1, formando assim o dito circuito tri-sináptico (**Fig. 1**) (TURNER *et al.*, 1998). Os principais neurotransmissores entre as conexões hipocampais são: GABA, norepinefrina e acetilcolina (BROWN; ZADOR, 1990).

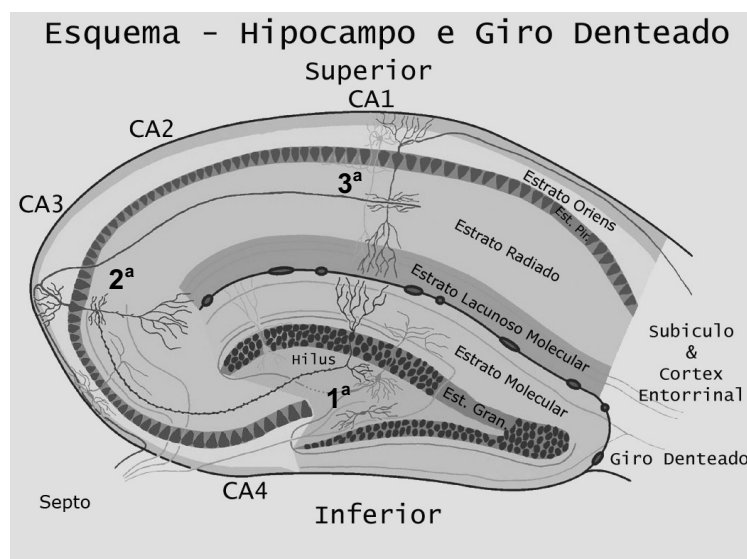


Figura 1: Circuito tri-sináptico simplificado do hipocampo. Corno de Amon 1, 2, 3 e 4 (CA1, CA2, CA3, CA4). O giro denteado recebe as projeções do córtex entorrinal através da via perfurante (1ª sinapse) e projeta através dos axônios das células granulares para CA3 (2ª sinapse). Este último projeta para CA1 (3ª sinapse) através dos axônios das células piramidais. Fonte: www.uni-leipzig.de/.../graphic_hippo_farbig.html.

Desse modo, as aferências mais densas do hipocampo provêm do córtex entorrinal e o giro denteado medeia esse processo amplificando esses sinais até CA3. Participantes disso, as células musgosas (as mais frequentes na camada polimórfica, camada essa mais interna do giro denteado), realizam papel modulador dessa resposta do hipocampo normal, pois danos a neurônios hilares (da camada polimórfica) desencadeiam déficits de memória e aprendizado (MAGLOCZKY; FREUND, 2005; MAGLOCZKY; FREUND, 1993).

Aliado a isso, dados também revelam que a célula granular do giro denteado recebe, simultaneamente, as projeções das vias responsáveis pelas tarefas de reconhecimento, da localização espacial e da forma dos objetos (LIPTON; EICHENBAUM, 2008). Exalta-se, dessa maneira, a significância da integridade do córtex entorrinal, essencial para todas as tarefas hipocampo-dependentes, a exemplo da consolidação do aprendizado e formação da memória episódica (EICHENBAUM; YONELINAS; RANGANATH, 2007; WITTER, 2007; WITTER; MOSER, 2006).

Finalmente, a perda de neurônios hilares relacionada à idade avançada é provavelmente resultado da deposição de placas beta-amilóides, da inflamação subsequente e dos danos oxidativos ao DNA. Diante de afecções por traumatismos ou infecções, o sistema nervoso central dispara uma resposta inflamatória através da ativação de microglias, astrócitos e macrófagos periféricos infiltrantes os quais, em sequência, liberam citocinas anti e pró-inflamatórias, quimiocinas, neurotransmissores e radicais livres em uma tentativa de remover debris celulares e neurônios lesados, a fim de retomar a homeostase cerebral (TAPP *et al.*, 2004; WHITNEY *et al.*, 2009).

Como o presente trabalho investiga alterações da distribuição de astrócitos, é relevante rever a organização morfofuncional da glia, indicando seus múltiplos papéis.

2.2. CÉLULAS DA GLIA

As células da glia são as unidades celulares mais numerosas constituintes do sistema nervoso e sua função primária é a de controlar o ambiente dentro do SNC. Elas mobilizam

moléculas nutritivas dos vasos sanguíneos para os neurônios, removem produtos de excreção e mantêm o ambiente eletroquímico dos neurônios, além de guiá-los ao início do desenvolvimento do SNC para as suas localizações corretas, oferecendo, assim, um suporte estrutural aos neurônios e restabelecendo um ambiente apropriado (HAINES, 2006).

Os astrócitos são as células mais numerosas dentre as várias populações celulares que constituem a glia do SNC dos mamíferos, sendo afetados em várias situações neuropatológicas, incluindo o envelhecimento, a neurodegeneração crônica e a infecção. Uma vez afetados, suas alterações comprometeriam igualmente a função sináptica, estando relacionados a eventos de plasticidade sináptica por conta da liberação de glutamato em áreas críticas para consolidação da memória, como nas regiões hipocâmpais de CA1 e CA3 e no giro denteado (LEE *et al.*, 2007; PEREA; ARAQUE, 2007; POLLAK *et al.*, 2005).

Estudos recentes sobre os astrócitos apontam que estes secretariam fatores de crescimento vitais para as funções de alguns neurônios, além de eliminarem colesterol e lipoproteínas necessários para o crescimento e a plasticidade sináptica. Somado a isso, promovem também a regulação de processos inflamatórios no SNC, secretando citocinas e mediadores imunes. Vale ressaltar também que a sustentação metabólica também é realizada pelos astrócitos os quais participam do controle dos efeitos pós-sinápticos de alguns neurotransmissores na fenda sináptica (HAINES, 2006).

Por essas razões, parece evidente que os astrócitos são imprescindíveis para a função cerebral normal e, portanto, investigações acerca de possíveis mudanças em seu número, distribuição e forma são essenciais. Entretanto, a imensa maioria dos estudos estereológicos voltados para o envelhecimento cerebral ainda tem como foco principal a estimativa do número total de neurônios ou de suas características morfométricas (MOUTON *et al.*, 2002; STARK *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2007).

No presente trabalho, pretende-se contribuir para reduzir essa lacuna, investigando as possíveis alterações que o ambiente, o envelhecimento e a redução da atividade mastigatória podem gerar na plasticidade astrogliar da formação hipocâmpal.

Nesse sentido é importante rever o conceito de plasticidade e suas relações com o ambiente e o envelhecimento.

2.3. PLASTICIDADE CEREBRAL, AMBIENTE E ENVELHECIMENTO

Para animais de laboratório, define-se como ambiente enriquecido um modelo experimental capaz de prover uma grande diversidade de possíveis meios de interação física e social (ROSENZWEIG; BENNETT, 1996; PUURUMEN; SIVENIUS, 2002). Geralmente, esses animais são alojados em gaiolas amplas, com múltiplos níveis e uma grande variedade de brinquedos, trocados de maneira periódica, sendo esses responsáveis por promover nesses animais uma infinidade de estímulos sensoriais e motores, dentre outros (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

Normalmente, de 8 a 12 animais são mantidos em uma gaiola com enriquecimento ambiental. O comportamento exploratório natural desses animais, quando expostos a variação do meio proporcionada pela mudança de brinquedos e objetos e a necessidade de localização de água e comida na gaiola, garantem a estimulação adequada à indução da plasticidade (GENTILE *et al.*, 1987; HELD *et al.*, 1985; ROSE *et al.*, 1987).

Alguns autores, como Kempermann (2002), defendem que o ambiente enriquecido, respeitando as devidas proporções, acaba por reproduzir a esses animais o mesmo tipo de interação que é encontrada na natureza, onde há a presença de um meio em mudança permanente e exploração constante, buscando comida, água, abrigo e companheiros.

Estudos vêm demonstrando que estímulos gerados a partir de um ambiente enriquecido proporcionam interação social e atividade física, sendo capazes de promover alterações comportamentais, morfológicas e neuroquímicas em determinados roedores e que estas parecem essenciais para a proteção dos déficits de aprendizado e memória associados ao processo de envelhecimento (GARDNER *et al.*, 1975; SANCHEZ; LADD; PLOTSKY, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2001).

Outro componente fundamental em gaiolas submetidas ao enriquecimento é a existência de rodas de exercício. Segundo Kempermann (2010), o exercício físico atua como forte indutor da proliferação de células neuronais e o enriquecimento ambiental é capaz de promover a sobrevivência de neurônios “neonatos”, bem como, a formação de redes neurais na formação hipocampal, o que provavelmente contribuiria para a proteção relacionada aos déficits do envelhecimento.

Estudos em humanos igualmente descrevem que existe correlação entre exercício aeróbico, fluxo sanguíneo cerebral e melhora das funções metabólicas e neuroquímicas que suportam funções executivas (CHURCHILL *et al.*, 2002).

Esses dados sugerem, ainda, que estímulos sensório-motores e sociais contribuem para o desenvolvimento cognitivo e emocional adequados (SPANGLER *et al.*, 1994; VAN DER STAAY, 2002; WINOCUR, 1998).

Em outro trabalho realizado por Diniz (2010) com fêmeas da variedade suíça albina (a mesma variedade proposta pelo presente trabalho), concluiu-se que, a longo prazo, o enriquecimento ambiental foi capaz de influenciar no número de astrócitos de diferentes camadas do giro denteado, bem como, no desempenho desses animais em testes comportamentais que avaliavam a memória espacial e a memória semelhante a episódica, demonstrando, dessa forma, os efeitos do ambiente e do envelhecimento sobre a plasticidade glial, efeitos esses, submetidos também à investigação no trabalho apresentado.

Ainda em relação ao envelhecimento, é sabido que, independentemente da idade, a estimulação promovida pelo ambiente pode gerar consideráveis mudanças tanto comportamentais quanto neuroanatômicas e químicas em grande parte das espécies animais (MOHAMMED *et al.*, 2002; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

Em 2002, em outros estudos de registros eletrofisiológicos e ópticos no sistema somatossensorial, Godde e colaboradores consolidaram a hipótese de que fenômenos neurodegenerativos e regenerativos podem coexistir durante o envelhecimento e que o processo regenerativo depende fundamentalmente de um ambiente rico em estímulos

relacionados ao déficit sensorial já instalado. Por extensão, levantaram a hipótese de que os déficits cognitivos possam igualmente ser causados pelas alterações nas áreas sensoriais primárias e que o déficit sensorial não-degenerativo pode ser corrigido, contribuindo para evitar o agravamento do déficit cognitivo a ele relacionado.

2.4. ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA, DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E DECLÍNIO COGNITIVO

A mastigação está intimamente relacionada às atividades do SNC, causando aumento no fluxo sanguíneo cerebral e nas atividades neuronais no cérebro humano. A perda de muitos dentes e a deterioração concomitante da mastigação aumenta o risco de demência senil e, em relação ao seu desenvolvimento, a literatura tem sugerido evidências relacionando-a a diminuição da habilidade mastigatória, resultante da disfunção oral, de cáries radiculares e de discinesia oral (ONOUKA *et al.*, 2000).

Especificamente com relação aos problemas de saúde oral na terceira idade, Rosa *et al.* (1992) enfatizaram serem estes relegados ao descaso no Brasil, transformando-se em fator de aceleração dos problemas naturais da velhice, inclusive agravando seus incômodos. A diminuição da eficiência mastigatória pode causar disfagia no idoso. A disfagia aumenta efeitos mórbidos, altera a qualidade de vida, desidratação, subnutrição, asfixia, congestão e infecções recorrentes do trato respiratório (FINIELS; STRUBEL; JACQUOT, 2001).

A correlação entre alterações mastigatórias, envelhecimento, testes comportamentais, ensaios imuno-histoquímicos, além da quantificação dos neurônios e astrócitos em hipocampo (CA1 e CA3) e giro denteado é muito pouco explorada pela literatura. Somado a isso, os mecanismos moleculares associados ao significado funcional alterado das células-alvo permanecem por ser elucidados, havendo, entretanto, forte correlação entre neurogênese e desempenho cognitivo, assim como, com a redução dos níveis de ansiedade (SANTARELLI *et al.*, 2003).

Estudos anteriores em ratos demonstraram que a disfunção mastigatória causa perda da memória espacial e várias outras mudanças patológicas. Essas alterações podem envolver degeneração do hipocampo na região de CA1, nas suas células piramidais, diminuição da liberação de acetilcolina no hipocampo e menor número de células astrogliais na mesma região (ONOUKA *et al.*, 1999, 2002).

Pesquisas em camundongos idosos que tiveram redução da mastigação mostraram que os animais apresentaram decréscimo no aprendizado e redução da densidade neural em CA1, sugerindo que a redução da mastigação induzida no animal pode estar relacionada à perda neural na região hipocampal, agravando a deterioração da memória espacial (KUBO *et al.*, 2007).

Segundo Almeida (2010), a privação mastigatória em animais jovens e senis criados em ambiente padrão parece aumentar o declínio cognitivo associado à redução da memória revelado pelo teste do labirinto aquático de Morris, e o envelhecimento afetaria o número de astrócitos, produzindo astrocitose na camada polimórfica do giro denteado. Sugere-se, assim, um efeito diferencial da privação mastigatória e do envelhecimento sobre o número de astrócitos de animais.

Estudo no giro denteado de ratos demonstrou que a mastigação é muito importante na manutenção de células nervosas recém-geradas no organismo adulto e pode contribuir para a função do hipocampo (MITOME *et al.*, 2005). Porém outros trabalhos com camundongos senis e com disfunção mastigatória sugeriram que o giro denteado não apresenta alterações morfológicas (TSUTSUI *et al.*, 2007).

No caso de camundongos jovens (ONOUKA *et al.*, 1999) e de meia idade (TSUTSUI *et al.*, 2007), não haveria igualmente redução no número de astrócitos e neurônios na região de CA1 (ONOUKA *et al.*, 1999; TSUTSUI *et al.*, 2007) e CA3 (TSUTSUI *et al.*, 2007) do hipocampo.

Em continuidade aos trabalhos em desenvolvimento junto ao Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção (LNI), apresenta-se a seguir, a proposta de

relacionar a alteração mastigatória com outras variáveis, a exemplo do enriquecimento ambiental e estimar o número de astrócitos nas diferentes laminações de CA1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho compôs o Projeto de Pesquisa intitulado “Alteração da Atividade Mastigatória e Declínio Cognitivo em Modelo Murino de Senescência”. Este concentra-se na área temática de Biologia/Neurociências, sob a coordenação da Profª Drª Marcia Consentino Kronka Sosthenes (ICB-UFPA) e execução dos seus orientandos, recebendo o apoio financeiro do Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA – nº outorga 136/2008) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – nº processo 475677/2008-0). O projeto supracitado foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE/UFPA, nº BIO004-09), tendo os procedimentos experimentais sido aprovados integralmente (**Anexo A**).

3.1. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados inicialmente 152 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 fornecidos pelo Biotério do Instituto Evandro Chagas, sendo manipulados segundo os "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH) nas instalações do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará.

3.2. ALIMENTAÇÃO E TEMPO DE VIDA

Esses animais foram distribuídos para a formação dos grupos de idades de 6 meses (6M), 12 meses (12M) e 18 meses (18M) e alojados em condições empobrecidas (Ambiente Padrão - AP) ou enriquecidas (Ambiente Enriquecido - AE), sendo alimentados logo após o desmame por dois diferentes tipos de ração. O grupo controle recebeu alimentação sob a

forma de ração peletizada (HD – *Hard Diet*) e o grupo experimental sofreu restrição mastigatória, sendo oferecida ração farelada e peneirada (SD – *Soft Diet*). Os sujeitos tiveram acesso livre à água e comida.

A seguir, uma divisão esquemática dos grupos analisados e seus respectivos números de animais (**Quadros 1 e 2**):

Ambiente / Janela Temporal	Número de Animais	
	Hard Diet (HD)	Soft Diet (SD)
AP 6 meses	12	12
AP 12 meses	12	12
AP 18 meses	24	18

Quadro 1: Número de animais para cada grupo criado em ambiente padrão (AP), segundo a janela temporal e o tipo de ração ofertada.

Ambiente / Janela Temporal	Número de Animais	
	Hard Diet (HD)	Soft Diet (SD)
AE 6 meses	12	12
AE 12 meses	12	12
AE 18 meses	12	12

Quadro 2: Número de animais para cada grupo criado em ambiente enriquecido (AE), segundo a janela temporal e o tipo de ração ofertada.

3.3. ALOJAMENTO

Os animais do ambiente padrão foram alojados em gaiolas plásticas de dimensões 32x39x16,5cm e cobertas por uma grade de metal (**Fig. 2**). Cada gaiola abrigou seis camundongos.

Os grupos alojados em gaiolas com condições enriquecidas estavam inseridos em um

espaço de 50x50x50cm, com dois andares, equipadas com pontes de plástico, rodas de correr, brinquedos e túneis feitos de plásticos, permitindo o exercício voluntário ao longo de todo o período. O acesso à água e à alimentação foi disposto em andares diferentes com o intuito de estimular a exploração do ambiente, mas sempre com livre acesso a eles. O ambiente sofria modificações semanalmente, seja com alteração na posição dos objetos ou mesmo troca destes (**Fig. 3**). Cada gaiola abrigou 12 camundongos.

Todas as gaiolas permaneceram em uma sala sob temperatura controlada ($23\pm1^{\circ}\text{C}$), e ciclos claro-escuro de 12 horas (período claro, 6h -18h; período escuro, 18h - 6h).



Figura 2: Alojamento dos animais em ambiente padrão. **A** - Grupo *Hard Diet*. **B** - Grupo *Soft Diet* com recipiente de aço inoxidável para ração farelada (sua tampa apresentava o centro perfurado em forma circular, dando acesso ao farelo e deslocável, cedendo em direção ao fundo do pote à medida que a ração era consumida).



Figura 3: Alojamento dos animais em ambiente enriquecido. O ambiente era modificado semanalmente a partir da alteração no posicionamento dos objetos ou mesmo troca destes.

3.4. PERFUSÃO E CORTES

Foram excluídos de nossa amostra original 27 animais encontrados mortos durante o período (não foi possível definir se tratou de morte natural ou de morte induzida por doença intercorrente). Portanto, os 125 animais remanescentes foram submetidos a testes comportamentais e logo em seguida, pesados e sacrificados. Na composição dos resultados do presente trabalho, apenas os ensaios estereológicos foram considerados.

Para perfusão e posterior processamento histológicos, os animais foram anestesiados profundamente com 2ml de solução de Avertina, seguida de uma toracotomia para acesso ao ventrículo esquerdo, através do qual perfundi-se solução salina a 0,9% heparinizada (Liquemine®) durante 10 minutos. Seguiu-se paraformaldeído a 4% (em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4) por 30 minutos. Ao final, foi realizada 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.

Após o procedimento de microtomia, adotou-se como procedimento o ensaio cego identificando as secções com códigos que impediram os experimentadores de identificar a que grupo pertenciam os animais reagidos.

3.5. ENSAIOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS APLICADOS

Uma em cada seis secções foi utilizada para imunomarcção para proteína ácida fibrilar glial (GFAP), seguindo-se o protocolo descrito abaixo.

As secções foram lavadas em tampão fosfato (PB) 0,1M (pH 7,2-7,4) e a seguir tratadas para recuperação antigênica em duas etapas: na primeira etapa foram incubadas durante uma hora em ácido bórico a 0,2M (pH 9,0) aquecido entre 65-70° e na segunda, foram incubadas em solução de Tris-EDTA por 12h. Seguiu-se, então, três lavagens de 5 minutos com tampão fosfato salina triton (PBST). Este último a uma concentração de 5%.

Em seguida, as secções foram incubadas em solução a 1% de peróxido de hidrogênio e metanol durante 10 minutos para remoção da peroxidase endógena e redução da reação de fundo e então, lavadas em tampão fosfato Salina (PBS) a 0,1M (pH 7,2-7,4), 3 vezes por 2 minutos cada. Por conta da utilização de anticorpo monoclonal produzido em camundongo, utilizou-se protocolo específico de bloqueio dos sítios antigênicos não-específicos adotando-se o kit de imunodeteção “Mouse on Mouse”, de acordo com as recomendações do fabricante (M.O.M kit, Vector Laboratories, USA).

Assim, as secções foram bloqueadas com imunoglobulina por uma hora, seguindo-se 3 lavagens em PBS, durante 2 minutos cada. A seguir, 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, CHEMICON Int, USA), diluído em solução de proteína concentrada (M.O.M kit), a 4°C, durante 3 dias, com agitação contínua e suave.

As secções foram lavadas 3 vezes em PBS durante 2 minutos cada e incubadas durante 12h na solução, contendo o anticorpo secundário de cavalo anti-camundongo biotinilado (secondary antibody M.O.M kit) diluída em 1:250 em PBS e 1:5 em concentrado de proteína. Depois, foram transferidas para a solução com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC, Vector Laboratories, USA, 1:100) por uma hora até serem lavadas novamente 3 vezes em PB 0,1M, 2 minutos cada. Seguiu-se uma lavagem de 5 minutos em tampão acetato 0,2M (pH 6) e finalmente foram processadas para a imuno-histoquímica de peroxidase utilizando como cromógeno a diaminobenzidina (DAB) intensificada pelo níquel. Essa reação utiliza a liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir da conversão enzimática da D-glicose em ácido glucônico para precipitar o cromógeno nos sítios ligados à peroxidase. O **Quadro 3** esquematiza o procedimento empregado e descrito acima.

SOLUÇÕES	Nº de Lavagens	Tempo (min)	Tempo (h)
Ácido Bórico 0,2M (70°C pH 9)	1		1
Tampão Tris-EDTA	1		12
Tampão Fosfato Salina Triton (PBST) a 5%	3	5	
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	10	
Tampão Fosfato Salina (PBS)	3	2	
MOM IgG Block (3 gotas de Mouse Ig Blocking Reagent + 10ml PBS)	1		1
PBS	3	2	
Solução de Trabalho (200µl de proteína concentrada + 10ml de PBS)	1	5	
Anticorpo Primário (4°C na diluição recomendada para GFAP (1:800) no concentrado de proteína (13µl GFAP + 200µl concentrado de proteína + 10ml PBS)	1		72
PBS	3	2	
MOM IgG Biotinylated Anti-Mouse IgG (40µl de biotinylated IgG em 200µl de concentrado de proteína + 10ml de PBS)	1		12
ABC (Complexo Biotina Avidina)	1		1
PB 0,1M	3	2	
Tampão Acetato 0,2M (pH 6)	1	5	
GND (0,6mg/ml de DAB + 25mg/ml de níquel + 0,8mg/ml de cloreto de amônio + 2mg/ml de <i>α-glucose anhydrous</i> , 96%)	1	até 30	
PB 0,1M	3	2	

Quadro 3: Protocolo da reação de imuno-histoquímica para detecção da proteína fibrilar glial (GFAP).

3.5.1. Contracoloração de Nissl

As secções processadas para imuno-histoquímica de GFAP foram montadas em lâminas gelatinizadas e posteriormente, contracoradas para Nissl. A coloração de Nissl utiliza o cresil violeta que evidencia núcleos e nucléolos, sendo neurônios e glia contracorados indistintamente por esta técnica.

Para preparar a solução de coloração é preciso aquecer o acetato de cresil violeta em banho maria a 40°C (5mg/ml), agitando-o por 5 minutos, filtrar a solução final em papel filtro e acrescentar ácido acético até que o pH da solução estabilize-se entre 3 e 3,5. As

lâminas foram mergulhadas nas soluções em sequência indicada no **Quadro 4** e posteriormente seladas com lamínula e meio de inclusão (Entelan Merck®).

Soluções	Tempo (minutos)
Álcool 70%	1
Álcool 80%	1
Álcool 90%	1
Álcool 100% I	3
Álcool 100% II	5
Álcool 100% + clorofórmio (1:1)	10
Álcool 95%	3
Álcool 75%	3
Água destilada para lavagem	0,15
Cresil violeta (40°C)	1-4
Água destilada para lavagem	0,15
Álcool 80%	3
Álcool 90%	10
Álcool 100% + clorofórmio (1:1)	3
Álcool 95% + ácido acético (15 gts/100ml)	3
Álcool 95%	6
Álcool 100% + álcool butílico (1:1)	3
Xileno I	5
Xileno II	5

Quadro 4: Protocolo da coloração de NISSL.

3.6 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Após o processamento para a imunomarcção de astrócitos, foram realizadas análises estereológicas para a estimativa do número de astrócitos nas lâminas de CA1 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 (MAC200®, Ludl Electronic Products,

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

A identificação inequívoca dos limites da região de interesse é um dos princípios que precisa ser respeitado. Nesse caso, a distribuição laminar dos astrócitos foi reconstruída através da técnica de Nissl sobreposta a imuno-histoquímica para GFAP. Assim, os limites das camadas de CA1 do hipocampo puderam ser facilmente identificados e delineados em uma objetiva de baixo aumento.

Empregando-se a objetiva de 10x, delineou-se os contornos das camadas de interesse. A distribuição laminar de CA1 foi definida tomando-se como referência a camada piramidal. Suas células contracoradas são melhor definidas pelo cresil violeta, pois este imprime no tecido uma faixa de agrupamento celular com uma coloração mais fortemente azulada. Esta visualização é justificada pelo “empacotamento” dessas células se comparadas às células piramidais de CA3, nos levando, portanto, a projetar um contorno em CA1 de uma camada mais estreita, porém mais densa (BRUCKNER *et al.*, 2003; LONG *et al.*, 1998).

O *stratum lacunosum molecular* se distingue do *stratum radiatum* pela maior intensidade do *background* imunomarcado para GFAP, assim como, pela morfologia de seus astrócitos que parecem menores, com ramos mais curtos e mais densamente imunomarcados. 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 das células piramidais de CA3, onde o “empacotamento” das pirâmides prontamente visíveis em CA1 desaparecem em CA3. (BRUCKNER *et al.*, 2003; LONG *et al.*, 1998).

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 mamíferos lisencefálicos (AMARAL; LAVENEX, 2007).

No sentido de se evitar ambiguidades na identificação dos objetos de interesse e garantir que se encontravam dentro dos planos permitidos de contagem, as objetivas de menor aumento foram substituídas por outra de 60x, planapocromática, a óleo, 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 exibía a disposição espacial das caixas em relação ao contorno, baseando-se nos parâmetros fornecidos, como ilustrados na **Figura 4**. Finalizada a contagem em um bloco, o programa mudava automaticamente a posição da lâmina para iniciar uma nova contagem em uma nova caixa.

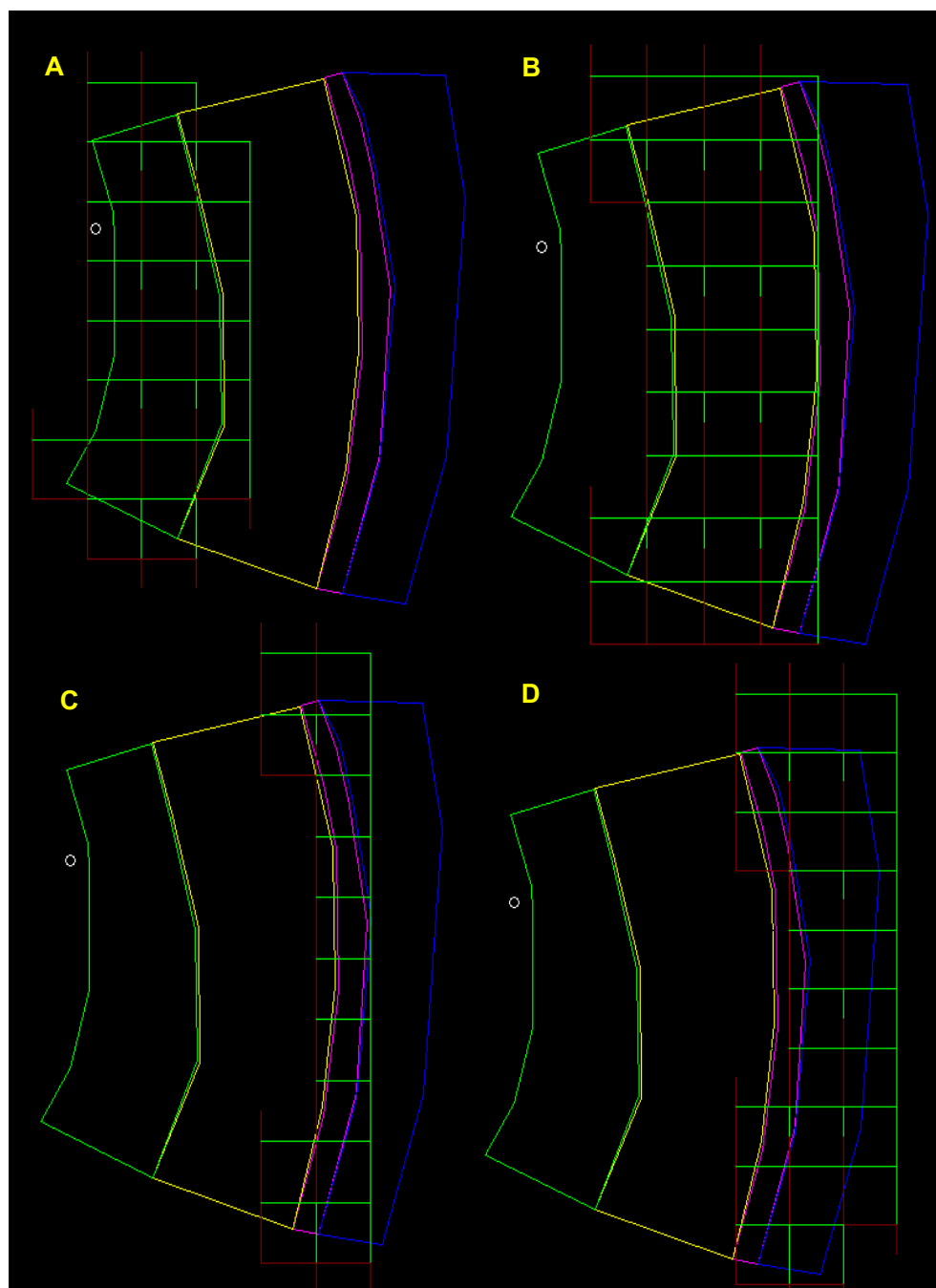


Figura 4: Contornos ilustrando a disposição e as dimensões relativas das caixas de contagem (quadrados). As arestas verdes das caixas de contagem ilustram os planos permitidos e as representadas em vermelhas, os planos proibidos. Neste caso, a largura e o comprimento da caixa equivalem a $80\mu\text{m}$ e o espaçamento entre elas é igual $80\mu\text{m}$. A profundidade da caixa escolhida para esta estimativa foi de $7\mu\text{m}$. **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 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), previamente validado por outros. Adotou-se o coeficiente de Scheaffer por ter sido demonstrado em ensaios computacionais, utilizando grandes amostras como o que mais se aproxima do erro verdadeiro (GLASER; WILSON, 1998). 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 0,5 (SLOMIANKA; WEST, 2005).

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada foram estabelecidos em experimentos piloto e uniformemente aplicados a todos os animais (**Apêndices**).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os grupos de animais foram submetidos a testes de normalidade com a identificação dos possíveis valores extremos baseados nos desvios. Quando encontrados, foram eliminados do conjunto de dados.

A análise estatística paramétrica avaliou o grau de significância dos resultados, empregando-se a análise descritiva (dados quantitativos), de variância (ANOVA) para um e dois critérios, com testes *a priori* (Bonferroni). O nível de significância para diferenças estatísticas foi definido em $\alpha < 0,05$.

Para a análise estatística foram utilizados os Programas: BioEstat[®] 5.0; GraphPad Prism 5 for Windows[®].

3.8. FOTOMICROGRAFIAS E PÓS-PROCESSAMENTO DE IMAGENS

Para obtenção de fotomicrografias utilizamos câmera digital (Microfire, Optronics, CA, USA) acoplada a microscópio Nikon (Optiphot-2, N.Y. USA) sendo as imagens pós-processadas com auxílio de *software* especializado (Adobe Photoshop 7.0.1 C.S.2, San José, CA, USA) ajustando brilho e contraste. As imagens das regiões de interesse foram selecionadas a partir de secções de cérebros de sujeitos cujas estimativas mais se aproximavam dos valores médios do grupo a que pertenciam.

4. RESULTADOS

4.1. CA1 E SUAS CAMADAS

Após o processamento imuno-histoquímico para GFAP foram evidenciados astrócitos destacados na fotomicrografia de estruturas da formação hipocampal (**Fig. 5**). Dentre elas, a de interesse e objeto deste estudo: a região de CA1 do hipocampo e suas laminações (*Stratum lacunosum-moleculare*, *Stratum radiatum*, *Stratum oriens* e *Stratum pyramidale*) são identificadas em destaque na figura em questão.

Utilizando-se, então, dos princípios do fracionador óptico aplicados à região de CA1 à secções imunomarcadas, estimamos o número total de astrócitos dessa região para todos os grupos formados.

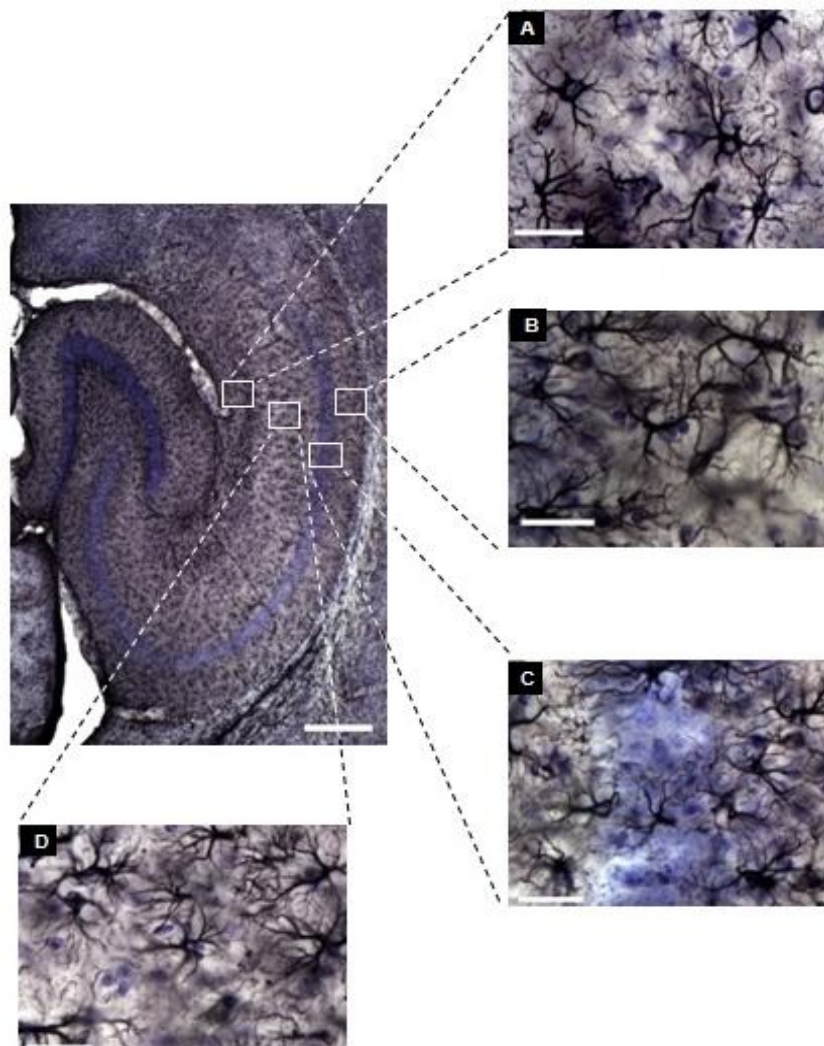


Figura 5: Fotomicrografias de secção horizontal do hipocampo imunomarcada para GFAP ilustrando os objetos (astrócitos) e as regiões (camadas) de interesse do camundongo albino suíço. Note a diferença na morfologia dos astrócitos das diferentes camadas. **A:** *Stratum lacunosum-moleculare* de CA1. **B:** *Stratum oriens* de CA1. **C:** *Stratum pyramidale* de CA1. **D:** *Stratum radiatum* de CA1. Escalas: menor aumento = 250 μm , maior aumento = 25 μm .

A seguir, são apresentadas qualitativamente as camadas identificadas para posterior quantificação astrocitária. Diferentes perfis – desenho do corpo celular e ramificações – podem ser notados. A **Figura 6** apresenta as *strata pyramidale* e *oriens*, sob diferentes ambientes, dietas e janelas temporais, enquanto a **Figura 7** envolve as camadas lacunosomolecular e *radiatum*. As imagens foram selecionadas a partir de secções de cérebros de sujeitos cujas estimativas mais se aproximavam dos valores médios do grupo a que pertenciam.

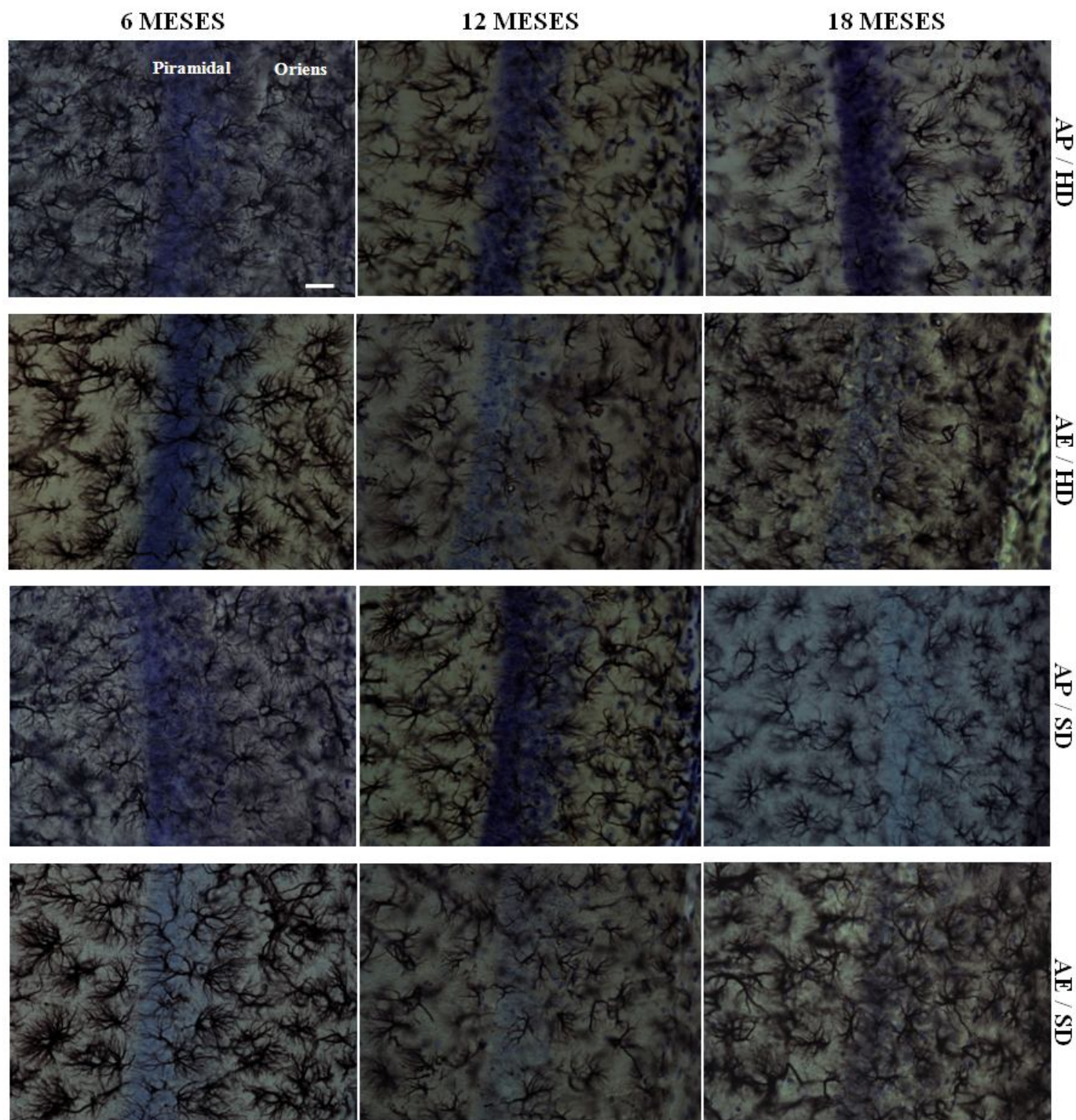


Figura 6: Fotomicrografias de secção horizontal do hipocampo imunomarcada para GFAP ilustrando a camada piramidal (note a faixa azulada após contra-coloração pelo Nissl) e o *Stratum oriens*, para os grupos *Hard Diet*-HD e *Soft Diet*-SD criados sob um ambiente padrão (AP) ou enriquecido (AE). Escala = 40 μ m.

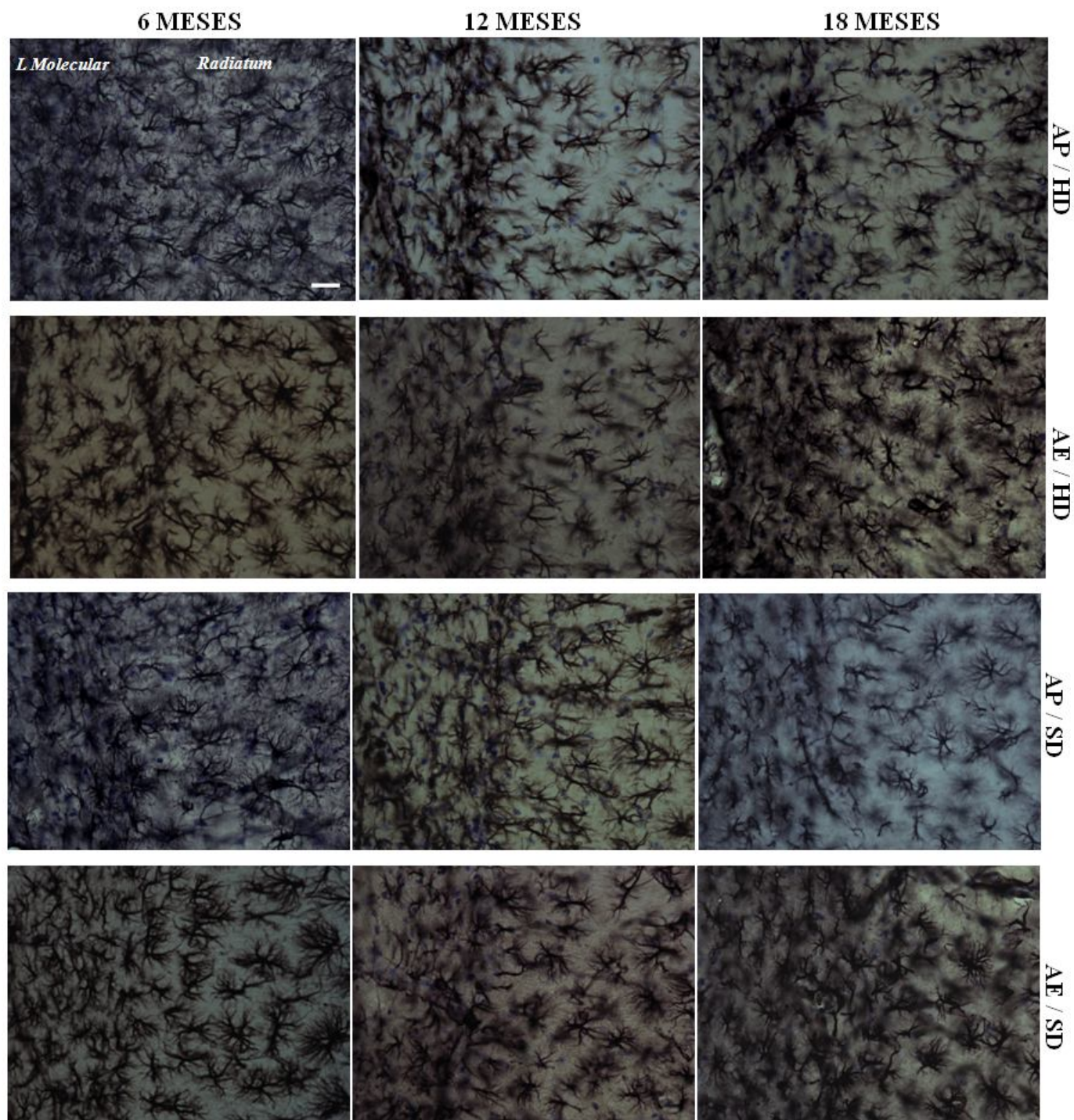


Figura 7: Fotomicrografias de secção horizontal do hipocampo imunomarcada para GFAP ilustrando o *Stratum lacunosum-moleculare* de CA1 e *radiatum* para os grupos *Hard Diet*-HD e *Soft Diet*-SD criados sob um ambiente padrão (AP) ou enriquecido (AE). Notar os dendritos de astrócitos mais longos na camada *Radiatum* e com maior número de ramificações e o *background* tecidual sempre com níveis inferiores à Lacunoso Molecular. Escala = 40 μ m.

4.2. AMBIENTE PADRÃO: NÚMERO TOTAL DE ASTRÓCITOS E QUANTIFICAÇÕES POR CAMADAS

A estimativa do número total de astrócitos em CA1 dos animais que viveram em ambiente padrão revelou que o envelhecimento impôs ao grupo HD uma redução da população astrocitária. Os grupos de 12 e de 18 meses revelaram um número menor de células se comparados ao grupo jovem (6M), entretanto, com aparente manutenção desse quantitativo entre si (**Gráfico 1**).

Em contrapartida, no grupo SD, evidenciou-se um aumento no número de astrócitos no grupo de 12 meses em relação ao de 6 meses, sendo essa diferença a única significativa ($p < 0,05$). Aos 18 meses, ocorreu discreto declínio (não significativo) na quantidade de astrócitos. O **Gráfico 1** contém representações gráficas dos valores médios e respectivas barras de erro padrão para o número total de astrócitos em CA1.

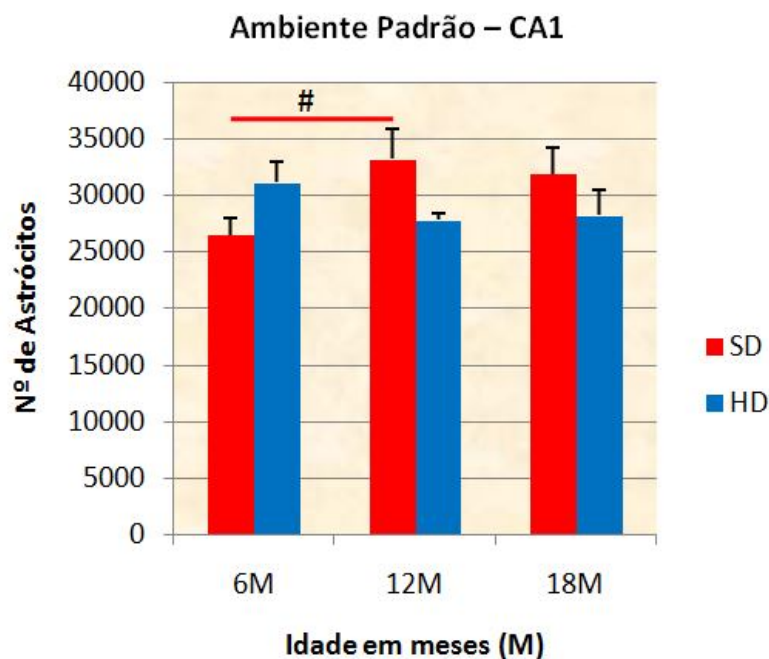


Gráfico 1: Representação gráfica do número total de astrócitos em CA1 do hipocampo para os animais com 6, 12 e 18 meses de idade criados em ambiente pobre de estímulos (ambiente padrão) e alimentados com pellet-HD, *Hard diet* e ração farelada-SD, *Soft diet*. (# = $p < 0,05$ para SD em diferentes idades).

Embora os testes estatísticos tenham revelado diferença significativa no número total de astrócitos de CA1, apenas para a comparação entre os animais HD de 6 e 12 meses, os dados da análise laminar (**Gráfico 2**) sugerem que tanto a dieta quanto o envelhecimento afetam o número de astrócitos em CA1 e que esse efeito é diferente nas diferentes camadas.

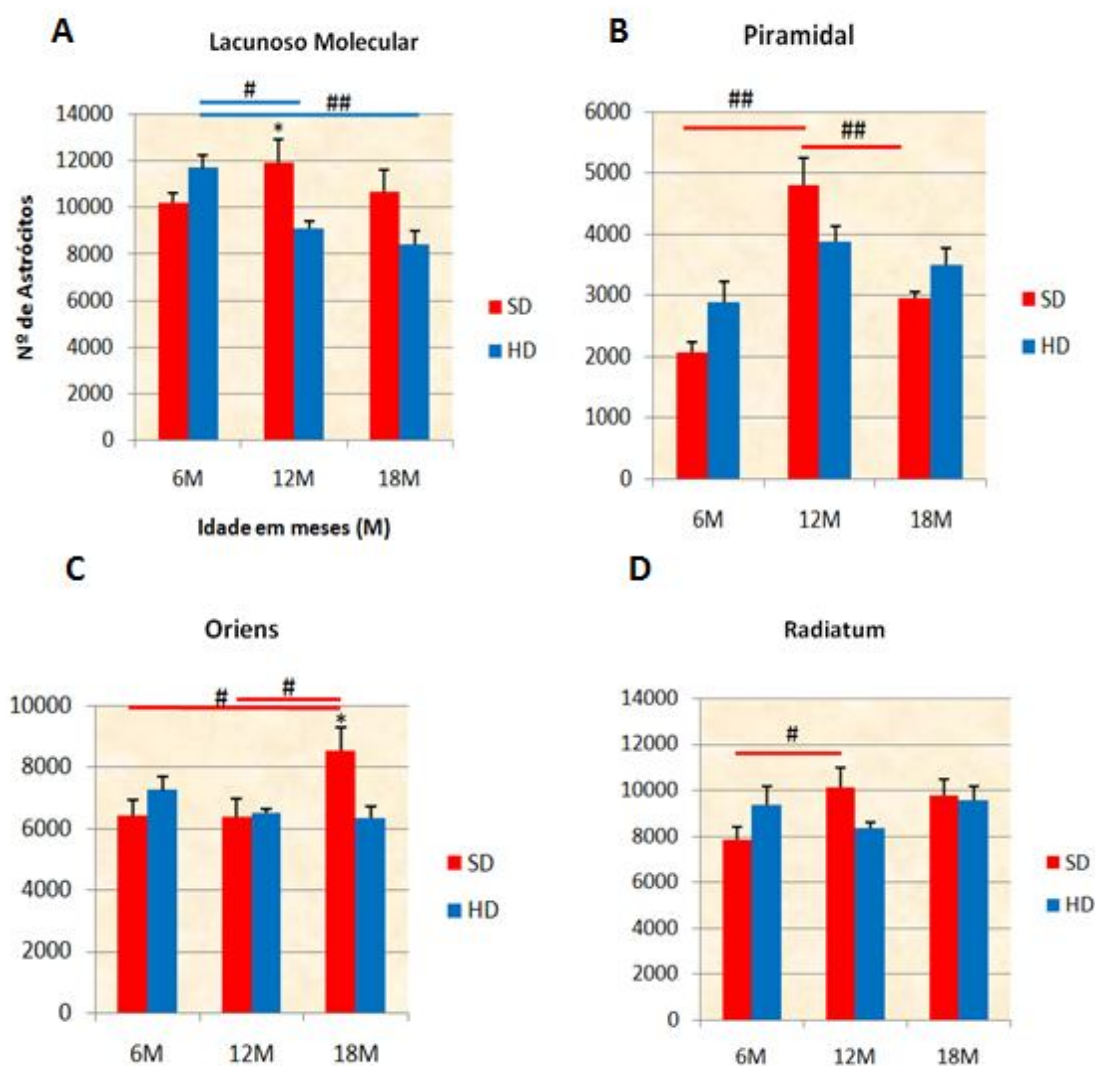


Gráfico 2: Número total de astrócitos por camada da região de CA1 do hipocampo para os animais com 6, 12 e 18 meses de idade criados em ambiente padrão. **A** – *Stratum lacunosum-moleculare*. **B** – *Stratum pyramidale*. **C** – *Stratum oriens*. **D** – *Stratum radiatum*. (# = $p < 0,05$ para os grupos SD ou HD em diferentes idades; ## = $p < 0,01$ para os grupos SD ou HD em diferentes idades; * = $p < 0,05$ entre SD e HD com mesma idade).

4.3. AMBIENTE PADRÃO E AMBIENTE ENRIQUECIDO: ESTIMATIVA DO NÚMERO TOTAL DE ASTRÓCITOS NAS DIFERENTES JANELAS TEMPORAIS

Ao se analisar o número total de astrócitos em CA1 para o grupo de animais do ambiente enriquecido, é interessante registrar que o SD-6M e o HD-6M não se distinguem um do outro apresentando número de astrócitos similar, e também superior ao seu grupo homônimo criado em ambiente padrão, diferentemente do que ocorreu entre os grupos HD dessa idade (**Gráfico 3A**).

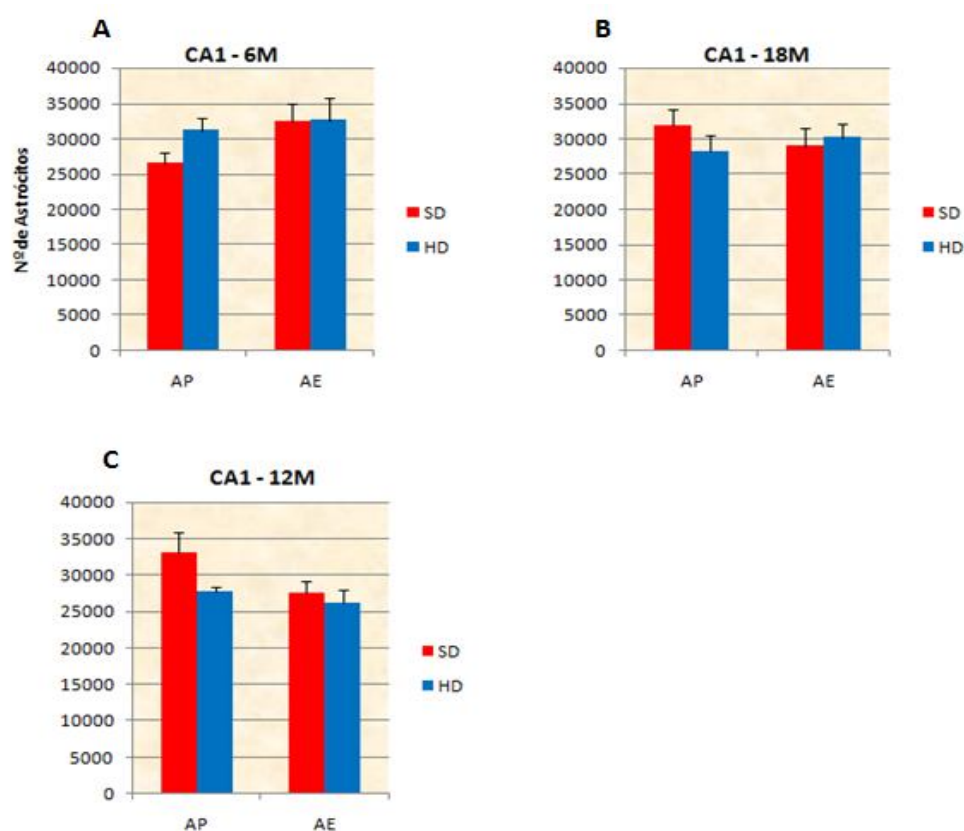


Gráfico 3: Representação gráfica do número total de astrócitos de CA1 do hipocampo para os animais criados em ambiente enriquecido (AE) e padrão (AP) e alimentados com pellet-HD e ração farelada-SD nas diferentes idades: **A** - aos 6 meses; **B** - 18 meses; **C** - 12 meses. Em todas as situações de análises estatísticas obtivemos $p > 0,05$.

Essa realidade, entretanto, não se estendeu às outras janelas temporais, uma vez que aos 12 meses e 18 meses os animais do grupo SD do ambiente enriquecido mostraram uma

tendência (estatisticamente não significante) a redução do número médio de astrócitos quando comparados aos animais do ambiente padrão. Para os grupos HD as variações foram mínimas.

Além disso, não se identificou, a partir dos 12 meses, grandes oscilações na quantidade total de células da mesma forma que foi observado nos grupos de ambiente padrão. À medida que o envelhecimento se instala, tanto para os grupos SD quanto para HD, o número de células declina e essa transição da meia-idade para a senilidade parece não implicar em grandes diferenças (**Gráfico 4**).

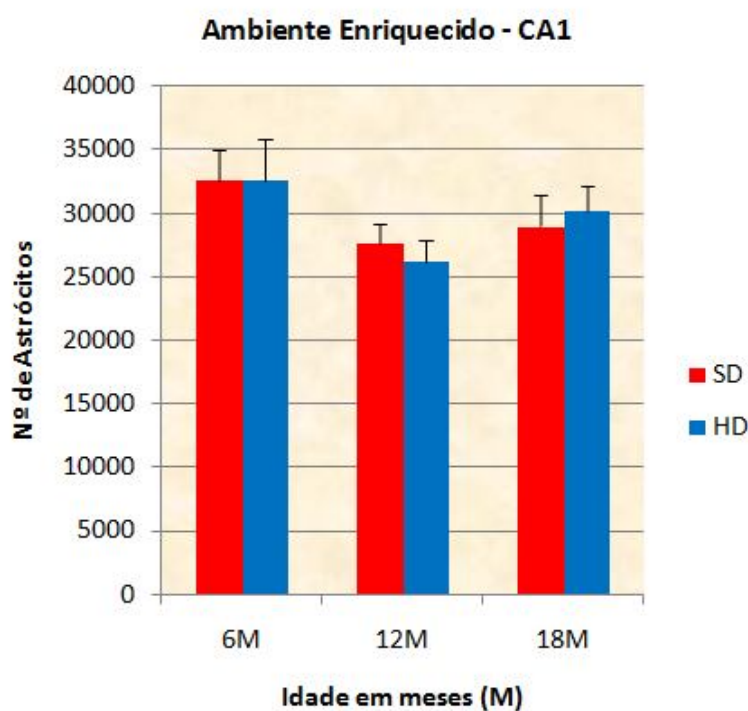


Gráfico 4: Representação gráfica do número total de astrócitos de CA1 do hipocampo para os animais com 6, 12 e 18 meses de idade criados em ambiente enriquecido e alimentados com pellet-HD e ração farelada-SD. Notar que nessas condições ambientais a região de CA1 do hipocampo parece não sofrer os impactos da dieta ($p > 0,05$).

Quando se analisa a distribuição laminar (**Gráfico 5**), observa-se que dos 6 aos 12 meses ocorre uma redução no número de astrócitos particularmente na camada piramidal.

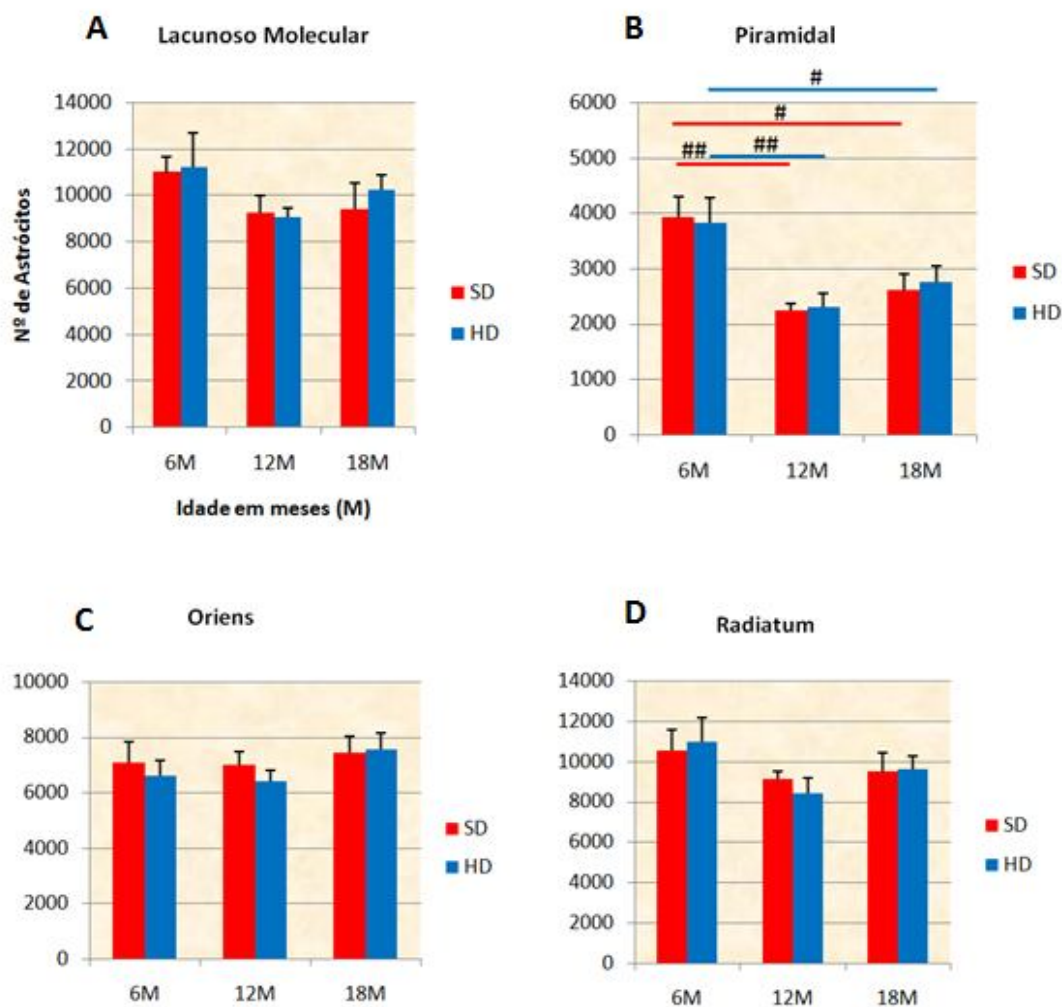


Gráfico 5: Número total de astrócitos por camada da região de CA1 do hipocampo para os animais com 6, 12 e 18 meses de idade criados em ambiente enriquecido. **A** – *Stratum lacunosum-moleculare*. **B** – *Stratum pyramidale*. **C** – *Stratum oriens*. **D** – *Stratum radiatum*. (# = $p < 0,05$ para os grupos SD ou HD em diferentes idades; ## = $p < 0,01$ para os grupos SD ou HD em diferentes idades).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho escolhemos os astrócitos de CA1 para investigar possíveis mudanças em sua distribuição laminar em correlação com alterações mastigatórias de longo

prazo, envelhecimento e enriquecimento ambiental em fêmeas adultas de camundongos suíços albinos de 6, 12 e 18 meses de idade. Para quantificar as mudanças, aplicamos o fracionador óptico, um método estereológico de grande precisão, que combina as propriedades do dissector óptico e do fracionador e que tem sido usado em uma variedade de estudos para determinar o número de células em numerosas regiões cerebrais. O fracionador óptico não é afetado pelas mudanças histológicas, retração ou expansão impostas por possíveis processos patológicos, uma questão de particular importância quando se estuda o envelhecimento e outras doenças que afetam o volume cerebral. Encontrou-se um efeito diferencial do regime mastigatório, do envelhecimento e do enriquecimento ambiental sobre a astrogênese laminar de CA1 nas diferentes idades. Identificou-se, ainda, que as diferenças impostas pela dieta e pela idade foram contrabalançadas pelo enriquecimento ambiental, onde em todos os estratos de CA1, mas não no *stratum pyramidale*, as estimativas no número de astrócitos foram semelhantes, independentemente do regime mastigatório.

5.1. ASTRÓCITOS, ENVELHECIMENTO E PRIVAÇÃO MASTIGATÓRIA

Os astrócitos hipocâmpais parecem ser particularmente sensíveis ao envelhecimento (LANDFIELD *et al.*, 1977; LINDSEY *et al.*, 1979; WU *et al.*, 2005), além do que, parecem ser afetados por desequilíbrios mastigatórios (KATO *et al.*, 1997; KUBO *et al.*, 2005; YAMAMOTO; HYRAYAMA, 2001) e mudanças ambientais (VIOLA *et al.*, 2009).

A noção de que o envelhecimento e as alterações mastigatórias possam causar alterações celulares e moleculares similares é sugerido por outros estudos que descreveram hipertrofia astrocítica em CA1 (ONOZUKA *et al.*, 2000; WATANABE *et al.*, 2001), sugerindo que os astrócitos podem ter sido ativados, aumentando sua produção de citocinas pró-inflamatórias (ONO *et al.*, 2010). No hipocampo senil, tais alterações têm sido descritas, mesmo na ausência de desequilíbrio mastigatório ou doenças neurológicas, com os astrócitos apresentando um fenótipo mais reativo nessa fase da vida (GODBOUT; JOHNSON, 2009). Em função do fato de que a maioria dos estudos anteriores, medindo o impacto da redução mastigatória, focalizou as mudanças neuronais e poucos artigos se dedicaram a avaliar

alterações da expressão de GFAP em CA1, o presente trabalho dedicou-se a essa questão com o intuito de contribuir para o preenchimento dessa lacuna.

Os estudos anteriores, empregando GFAP, revelaram que a extração dos molares acentua a hipertrofia dos astrócitos e sua densidade, e que esses efeitos é tanto maior, quanto mais duradoura a condição sem molar (ONOUZUKA *et al.*, 2000; WATANABE *et al.*, 2001). Nenhum dos estudos prévios mediu, entretanto, a influência do enriquecimento ambiental sobre tais mudanças, sendo o presente trabalho a primeira iniciativa nesse sentido.

Baseado em ensaios estereológicas, documentou-se em fêmeas adultas do camundongo suíço albino, aos 6, 12 e 18 meses que a distribuição laminar dos astrócitos de CA1 é especialmente suscetível a 6 ou mais meses de privação mastigatória, assim como, ao envelhecimento e que o ambiente enriquecido parece reduzir essa suscetibilidade. Assim, a principal novidade do presente trabalho é a descrição baseada em método estereológico sem viés de como a distribuição laminar e o número de astrócitos em CA1 muda com a redução da atividade mastigatória, o envelhecimento e o ambiente.

Dentre os achado mais interessantes da presente monografia está o fato de que o número de astrócitos no *stratum pyramidale* aos 18 meses no grupo HD é reduzido quando comparado aos animais de seis meses sob o mesmo regime mastigatório. Embora não tenhamos explicação conclusiva para esse fato, sugerimos que como o fator neurotrófico BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) contribui para a regulação da astrogênese, os níveis reduzidos de BDNF, associados ao envelhecimento e à restrição mastigatória, possam contribuir para o decréscimo no número de astrócitos (MAO; WANG, 2003). Em contraposição, sugerimos que a astrocitose observada no *stratum oriens* aos 18 meses de idade nos indivíduos HD não é dependente de BDNF, mas sim, parte da resposta inflamatória associada ao processo de envelhecimento (GODBUT; JOHNSON, 2009). Permanecem por serem investigados, entretanto, os possíveis mecanismos moleculares que tornam a astrogênese laminar diferencialmente sensível à restrição mastigatória ou aos efeitos combinados dos desequilíbrios mastigatórios e do envelhecimento. Nesse sentido, o efeito mais dramático de redução da astrogênese que ocorre no *stratum pyramidale* de CA1 nos animais de 18 meses se estende aos animais de 12 meses, incluindo todos os animais, independentemente do regime mastigatório imposto.

Em todos os outros estratos de CA1, o ambiente enriquecido parece reduzir as mudanças impostas pelo regime mastigatório tornando os grupos sob diferentes regimes de dieta indistinguíveis uns dos outros. Em conjunto, os resultados sugerem que um decréscimo na atividade mastigatória e o envelhecimento possam estar interagindo e contribuindo para promover efeitos laminares diferenciais na astrogênese de CA1 e que o ambiente enriquecido parece se contrapor aos efeitos da privação.

5.2 ASTRÓCITOS, ENVELHECIMENTO E FLUXO SANGUÍNEO CEREBRAL EM CA1

Uma intensa imunomarcção para GFAP próxima às artérias da fissura hipocampal encontrada no presente trabalho, sugere um papel para os astrócitos dessa camada na regulação do fluxo sanguíneo cerebral de CA1 e do giro denteado. Realmente, existe evidência de que os astrócitos estão envolvidos no controle neurovascular (KUGA *et al.*, 2011). Por conta do fato de que os astrócitos contribuem para o fluxo sanguíneo local no hipocampo, documentou-se uma redução da imunomarcção para GFAP nos animais velhos independentemente do regime de dieta imposto aos animais, sendo possível predizer que o fluxo sanguíneo hipocampal pode estar alterado aos 18 meses. Este decréscimo na imunomarcção para GFAP pode ser secundário a uma redução da atividade neural induzida pela idade na via de projeção temporoamônica do camundongo (VAN GROEN *et al.*, 2003; BARTESAGHI; GESSI, 2003). Entretanto, como a atrofia astrocítica nos animais submetidos à dieta farelada parece mais severa do que aquela observada nos animais HD, uma interpretação alternativa é que o envelhecimento e a dieta farelada podem contribuir para o agravamento da redução do fluxo sanguíneo. Como não fizemos nenhuma correlação entre a densidade dos processos imunomarcados para GFAP e a função astrocítica, esta questão importante permanece por ser investigada.

Alterações similares são observadas no hipocampo humano (REITZ *et al.*, 2009) e um distúrbio importante do fluxo sanguíneo durante o envelhecimento, que parece estar associado à interrupção das interações axônio-gliais, pode ser a conexão entre doença vascular e os processos de neurodegeneração crônicas associados ao envelhecimento (HORSBURGH *et al.*, 2011). Uma vez que a perda dos dentes (KAYE *et al.*, 2010) e a disfunção neurovascular (GRAMMAS, 2011) parecem predizer o declínio cognitivo em idosos é

razoável supor que a privação mastigatória em humanos pode contribuir, pelo menos em parte, para as disfunções de memória associadas ao envelhecimento (HEDDEN; GABRIELI, 2004) e que os astrócitos em mudança possam estar associados a esses eventos.

Entre as diferenças acima referidas, podemos explorar a vascularização como possibilidade para essas variâncias, já que a capilarização das diversas porções da formação hipocampal varia de maneira proporcional ao número de sinapses presentes, o que põe em destaque as camadas piramidal e lacunoso molecular em CA1, bem como, a camada molecular do giro denteado. Ainda do ponto de vista da vascularização, porém agora do ponto de vista macrovascular, cita-se a existência de variações anatômicas na irrigação arterial de CA1 que o tornaria relativamente vulnerável a eventos isquêmicos (ISOLAN, 2007).

5.3. ASTRÓCITOS, ALTERAÇÃO MASTIGATÓRIA E AMBIENTE ENRIQUECIDO

Os principais achados nos sugerem que a redução no estímulo mastigatório por um longo período, isto é, instalados logo ao 21º dia pós-natal e associada a um processo de envelhecimento, impõem alterações na distribuição laminar dos astrócitos em CA1. Entretanto, essas variações são atenuadas quando se vive em um ambiente enriquecido.

Considerando-se os animais criados em ambiente enriquecido e todas as suas camadas de CA1, vimos que não foi notória a diferença entre os grupos AE/HD e AE/SD nas três janelas temporais, como fora visto no ambiente padrão. Além disso, aos 6 meses, sobretudo no grupo SD, o que se viu em todas as camadas foi uma quantidade de astrócitos superior ao grupo AP/SD-6M. O enriquecimento ambiental, associado agora ao envelhecimento, pareceu também reduzir a quantidade de astrócitos, aproximando os valores dos grupos AE/SD 12M e 18M aos AP/HD 12M e 18M.

Tomados em conjunto esses resultados, especulamos que a astrocitose aos 6 meses reuniria maior número de astrócitos com propriedades neuroprotetoras e a privação mastigatória nessa idade impediria que o astrócito oferecesse o suporte estrutural necessário aos neurônios para o desempenho das funções cerebrais normais (HAINES, 2006).

Pode-se supor também que, em outras condições, ou seja, se submetido a um ambiente rico de estímulos, este em contraposição, ofereceria condições para um bom desenvolvimento do SNC e proteção deste na senilidade, minimizando ou mesmo impedindo as alterações promovidas pela alteração na mastigação. Em concordância, estudos outros em humanos descrevem a melhoria das funções metabólicas e neuroquímicas que suportam funções executivas quando submetido os sujeitos a essas condições (CHURCHILL *et al.*, 2002).

É preciso também considerar que o envelhecimento é um processo multifatorial, onde as idades biológicas dos diversos tecidos mostram-se grandemente variadas no mesmo indivíduo (WICK, 2000). Portanto, é razoável também considerar que as diferenças encontradas entre as laminações de CA1 podem ser justificadas pela heterogenicidade anátomo-histológica do hipocampo em função da necessidade sua de elaborar composições celulares e moleculares para a operacionalidade do seu circuito tri-sináptico.

Por conta disso, existem regiões dentro do hipocampo que concentram sinapses, outras que se responsabilizarão pela condução até que reunidas o tornam reconhecidamente uma importante área receptora e integradora de informações de todas as modalidades sensoriais (TURNER *et al.*, 1998).

5.4. PRIVAÇÃO MASTIGATÓRIA, DECLÍNIO COGNITIVO E POPULAÇÃO ASTROCITÁRIA

Alterações hipocampais em função de intervenções na atividade mastigatória são descritas envolvendo desde a densidade neuronal em CA1 do hipocampo (ONOZUKA *et al.*, 1999), a formação sináptica no hipocampo e no córtex parietal (YAMAMOTO; HIRAYAMA, 2001), de forma a reduzi-las. Corroborando para essa hipótese, outros estudiosos (ALMEIDA, 2010; KUBO, 2008, 2007, 2005; ONOZUKA *et al.*, 2002, 2000, 1999; TERASAWA *et al.*, 2002; WATANABE, 2002, 2001; YAMAMOTO; HIRAYAMA, 2001) avaliaram o impacto da alteração mastigatória na habilidade de ratos e camundongos jovens em aprender e 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.

Cogitamos também a possibilidade de que a quantidade de astrócitos no envelhecimento esteja relacionada a mecanismos pró-inflamatório e, portanto, associada a uma condição de privação mastigatória, culminaria no declínio de funções cognitivas. Almeida (2010) ao submeter camundongos velhos de ambiente padrão a testes de memória espacial, concluiu que os animais não privados da atividade mastigatória apresentaram melhor *performance* que os privados e ao estender sua análise para camundongos jovens e adultos, obteve os mesmos resultados.

Investigações em camundongos jovens, de meia-idade (ONOUKA *et al.*, 1999) e senis (ONOUKA *et al.*, 1999; TSUTSUI *et al.*, 2007), submetidos à alteração mastigatória, demonstraram aumento no número de astrócitos hipertróficos na região CA1 do hipocampo.

5.5. AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA DA DISTRIBUIÇÃO LAMINAR DOS ASTRÓCITOS

O presente trabalho estimou o número de astrócitos nas laminações em CA1 do hipocampo através de investigação estereológica sem viés. O método do fracionador óptico baseia-se na estimativa aproximada de valores reais, a partir de frações amostrais mínimas, utilizando-se da contagem sistemática e aleatória dos objetos de interesse, incluindo a terceira dimensão.

Vale ressaltar, entretanto, que nenhum trabalho disponível na literatura utilizou o mesmo método do presente estudo para quantificar o número de astrócitos. Além disso, apesar de os vários ensaios relatarem que existem alterações na região de CA1 do hipocampo, nenhum estudo avaliou essa região, enfocando a distribuição laminar dos astrócitos nessas condições de dieta, idade e ambiente.

Essa alternativa assegura a estimativa adequada do número total de células dentro da área de interesse a partir do número de células detectadas em cada caixa de contagem da amostra e da probabilidade amostral (SCHMITZ *et al.*, 2005). Ainda assim, pretende-se com esse procedimento realizar estimativas que se aproximem ao máximo do valor esperado (CRUZ-ORIVE, 1994; SCHMITZ 1998).

Entretanto, em função do protocolo utilizado nesse estudo, foi inexistente a presença de intervalos entre as caixas de contagem distribuídas aleatoriamente sobre as áreas de interesse, permitindo, assim, uma contagem celular baseada na visitação de toda a área do objeto de interesse.

Apesar disso, estimativas baseadas em estudos estereológicos podem variar em decorrência de inúmeros fatores, como linhagem de animais, variações dos procedimentos histológicos, diferentes protocolos de estereologia e ambigüidades na definição dos objetos de interesse. Para reduzir essas possíveis fontes de erro, os grupos comparados, foram submetidos à investigação estereológica após terem suas amostras submetidas aos mesmos protocolos de processamento (cortes histológicos, imuno-histoquímica, desidratação, contracoloração). Recorreu-se, ainda, a um estudo cego para evitar influências ou induções indesejáveis.

Em relação ao nível de erros aceitáveis, este foi definido como a razão entre o erro intrínseco à metodologia aplicada (CE) e o coeficiente de variação ($CV = \text{Desvio Padrão} / \text{Média}$) (GLASER; WILSON, 1998; SLOMIANKA; OESTE, 2005).

O CE expressa a precisão das estimativas do número de células e um valor $\leq 0,05$ foi considerado adequado para o presente trabalho, pois a variância introduzida pelo procedimento de estimação pouco contribuíram para a variação do grupo observado. As variações possíveis associadas com fontes não-biológicas foram reduzidas a níveis aceitáveis (MOUTON *et al.*, 2002).

A outra maneira que se empregou para se avaliar os erros relacionados à escolha da matriz amostral foi o cálculo da variação biológica definida como: $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (onde CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica)

expresso em valor percentual do coeficiente de variação. Considera-se que o coeficiente de erro é adequado sempre que ele contribui menos do que a variação biológica para o coeficiente global de variação.

Entretanto, mesmo com todos esses cuidados, as diferenças nas estimativas ainda podem existir em decorrência de outras fontes de erros possíveis, como aqueles introduzidos pelos pré-supostos do observador acerca dos grupos experimentais, pelas alterações induzidas nas secções pelo processamento do tecido, pela ambiguidade no reconhecimento de áreas ou dos objetos de interesse e pela definição dos planos de foco superior e inferior da secção.

5.6. HORMÔNIOS E ASTRÓCITOS

Alem das variáveis envelhecimento, alteração da atividade mastigatória e ambiente, outro importante fator a ser considerado e que poderia interferir em relação ao número de astrócitos no hipocampo são os hormônios sexuais. Segundo Mouton (2002), fêmeas senis da variedade C57Bl6J apresentaram 18,3% mais astrócitos que fêmeas jovens e 32% mais que machos de idades correspondentes. Em relação a esses achados, sugere-se que as fêmeas senis tenham perdido parte de sua proteção estrogênica e que, por isso, pelo menos parte da astrocitose seja fruto da estropausa. Corroborando com essa hipótese, Lei (2003), ao comparar fêmeas B6 ovariectomizadas (com 20-26 meses) tratadas com reposição hormonal com fêmeas tratadas com placebo, observou que as fêmeas que receberam o tratamento medicamentoso tiveram uma redução no número de astrócitos em hipocampo e giro denteado, fato que se traduz em uma forte evidência de que os hormônios sexuais medeiam a função das células da glia.

O presente trabalho, ao seguir o protocolo de trabalhos realizados pela maioria das pesquisas de nosso laboratório, optou pela utilização de camundongos fêmeas, introduzindo variáveis como dieta e enriquecimento ambiental e, embora não tenha apresentado como objetivos realizar a comparação entre machos e fêmeas, não poderíamos deixar de citar a questão hormonal, como fator que poderia influenciar na astrocitose dos animais do presente estudo. Torna-se assim, interessante propor a realização de reposição hormonal em grupos de

fêmeas senis, avaliando através do fracionador óptico o impacto do tratamento sobre o número de astrócitos.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A análise quantitativa estereológica da distribuição laminar dos astrócitos de CA1, empregando o fracionador óptico, revelou que alterações mastigatórias impostas pelo regime de dieta farelada altera o número de astrócitos de forma distinta nas diferentes camadas;
- ✓ As alterações do número de astrócitos parecem ser também dependentes da idade e esses fatores (envelhecimento e regime mastigatório) parecem interagir;
- ✓ Com exceção do *stratum pyramidale* de CA1, o ambiente enriquecido parece se contrapor às alterações laminares impostas pelo regime mastigatório e envelhecimento em todos os estratos de CA1, e
- ✓ Os mecanismos moleculares associados a essas mudanças permanecem por serem investigados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.N.F. **Memória espacial, atividade mastigatória e morfometria astrocítica do giro dentado 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.

AMARAL, D. G.; LAVENEX, P. Hippocampal Neuroanatomy. In: ANDERSEN, P.; MORRIS, R. G.; AMARAL, D. G.; BLISS, T.; O'KEEFE, J. (Ed.). **The Hippocampus Book**. New York: Oxford University Press, 2007. Cap.03. p. 37-114.

AOKI, H.; KIMOTO, K.; HORI, N.; TOYODA, M. Cell proliferation in the dentate gyrus of rat hippocampus as inhibited by soft diet feeding. **Gerontology**, v.51, n.6, p.369-374, 2005.

BARTESAGHI, R.; GESSI, T. Activation of perforant path neurons to field CA1 by hippocampal projections. **Hippocampus**, v.13, n.2, p.235-249, 2003.

BROWN, T.; ZARDOR, A. **Hippocampus** New York, NY: Oxford Uversity Press. p.346-387, 1990 (The Synaptic Organization of the Brain).

BRUCKNER, G. *et al.* Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. **J. Chem. Neuroanat.**, v.26, n.1, p.37-50, 2003.

BURNS, A.; BYRNE, E.J.; MAURER, K. Alzheimer's disease. **Lancet**, v.360, n.9327, p.163-65, 2002.

CAMOZZATO, A.L. *et al.* Incidence of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease in Southern Brazil. **J. Geriatr. Psychiatry Neurol.**, v.22, n.3, p.181-187, 2009.

CARAMELLI, P. *et al.* Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.**, v.16, n.2, p.103-108, 2002.

CARAMELLI, P. *et al.* Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Dis. Assoc. Disord.**, v.18, n.4, p.241-246, 2004.

CHURCHILL, J.D.; GALVEZ,R.; COLCOMBE, S.; SWAIN, R.A.; KRAMER, A.F.; GREENOUGH, W.T. Exercise, experience and the aging brain. **Neurobiology of Aging**, v.23, n.5, p.941-955, 2002.

COLUSSI, C.F.; FREITAS, S.F.T. Aspectos epidemiológicos da saúde bucal do idoso no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n.5, 2002.

CRUZ-ORIVE, L. M. Toward a more objective biology. **Neurobiol. Aging**, v.15, p.377-378; discussion 379-380, 1994.

DIAS, A. *et al.* Dementia. In: Aarli, J. A. et al, **Neurological Disorders - public health challenges**. 1^a ed. Genebra: WHO press, p.54, 2006.

DINIZ, D.G. **Envelhecimento e pobreza de estímulos sensoriomotores e cognitivps alteram a distribuição laminar dos astrócitos do giro denteado e afetam as memórias espacial e epsódica**. Belém, 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Neurociência e Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

EICHENBAUM, H.E.; YONELINAS, A.P.; RANGANATH, C. The medial temporal lobe and recognition memory. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.30, p.123-152, 2007.

FIGLEY, C.R.; STROMAN, P.W. The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals. **Eur. J. Neurosci.**, v.33, n.4, p.577-588, 2011.

FINIELS, H.; STRUBEL, D.; JACQUOT, J.M. Deglutition disorders in the elderly. Epidemiological aspects. **Presse. Med.**, v.10, n.33, p.1623-34, 2001.

FRIDMAN, C.; GREGÓRIO, S.P.; DIAS NETO, E.; OJOPI, E.P.B. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Rev. Psiq. Clín.**, v.31, n.1, p.19-25, 2004.

GARDNER, E. B.; BOITANO, J. J.; MANCINO, N. S.; D'AMICO, D. P. Environmental enrichment and deprivation: effects on learning, memory and exploration. **Physiol. Behav.**, v.14, n.3, p.321-327, 1975.

GENTILE, A. M.; BEHESHTI, Z.; HELD, J. M. Enrichment versus exercise effects on motor impairments following cortical removals in rats. **Behavioral and neural biology**, v.47, n.3, p.321-332, 1987.

GIROUARD, H.; BONEV, A.D.; HANNAH, R.M.; MEREDITH, A.; ALDRICH, R.W.; NELSON, M.T. Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.107, n.8, p.3811-3816, 2010.

GLASER, E. M.; WILSON, P. D. The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators. **J. Microsc.**, v.192, n.2, p.163-71, 1998.

GODBOUT, J. P.; JOHNSON, R.W. Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences. **Immunol. Allergy Clin. North. Am.**, v.29, n.2, p.321-337, 2009.

GODDE, B.; BERKEFELD, T.; DAVID-JURGENS, M.; DINSE, H. R. Age-related changes in primary somatosensory cortex of rats: evidence for parallel degenerative and plastic-adaptive processes. **Neurosci. Biobehav. Ver.**, v.26, n.7, p.743-752, 2002.

GRAMMAS, P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J. Neuroinflammation.**, v.8 , p.26-37, 2011.

HAYNES, D.E. *et al.* (Org.). **Neurociência Fundamental para aplicações básica e clínicas**. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p.17-18 e 30-31.

HEDDEN, T., GABRIELI, J. D. Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. **Nature reviews**, v.5, p.87-96, 2004.

HASEGAWA, Y.; ONO, T.; SAKAGAMI, J.; HORI, K.; MAEDA, Y.; HAMASAKI, T.; NOKUBI, T. Influence of voluntary control of masticatory side and rhythm on cerebral hemodynamics. **Clin. Oral. Investig.**, v.15, n.1, p.113-118, 2011.

HELD, J. M.; GORDON, J.; GENTILE, A. M. Environmental influences on locomotor recovery following cortical lesions in rats. **Behavioral Neuroscience.**,v.99, n.4, p.678–690, 1985.

HIRAMATSU, D. A.; TOMITA, N. E.; FRANCO, L.J . Perda dentária e a imagem do cirurgião-dentista entre um grupo de idosos. **Ciênc. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.12, n.4, 2007.

HORSBURGH, K.; REIMER, M. M.; HOLLAND, P.; CHEN, G.; SCULLION, G.; FOWLER, J.H. Axon-glial disruption: the link between vascular disease and Alzheimer's disease? **Biochemical Society transactions.**, v.39, n.4, p.881-885, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Brasileiro-2010**. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1866&id_pagina=1

ISOLAN, G. R. *et al.* Anatomia microcirúrgica do hipocampo na amígdalo-hipocampectomia seletiva sob a perspectiva da técnica de niemeyer e método pré-operatório para maximizar a corticotomia. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v.65, n.4, p.162-169, 2007.

KALARIA, R.; MAESTRE, G. E.; ARIZAGA, R.; FRIEDLAND, R. P.; GALASKO, D.; HALL, K.; LUCHSINGER, J. A.; OGUNNIYI, A.; PERRY, E. K.; POTOCINIK, F.; PRINCE, M.; STEWART, R.; WIMO, A.; ZHANG, Z. X.; ANTUONO, P. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries prevalence, management, and risk factors. **Lancet Neurol.**, v.7, n.9, p.812-26, 2008.

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. **Behav. Brain Res.**, v.83, n.1-2, p.239-242, 1997.

KAYE, E. K.; VALENCIA, A.; BABA, N.; SPIRO, A.3RD; DIETRICH, T.; GARCIA, R.I. Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older men. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v.58, n.4, p.713-718, 2010.

KEMPERMANN, G.; GAST, D.; GAGE, F. H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Annals of Neurology.**, v.52, n.2, p.135-143, 2002.

KEMPERMANN, G. *et al.* Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. **Frontiers in Neuroscience**, v.4, p.1-2, 2010.

KONDO K.; NIINO, M.; SHIDO K. A case-control study of Alzheimer's disease in Japan-significance of life styles. **Dementia**, v.5, n.6, p.314-326, 1994.

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.

KUBO, K.; YAMADA, Y.; IINUMA, M.; IWAKU, F.; TAMURA, Y.; WATANABE, K.; NAKAMURA, H.; ONUZUKA, M. Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and neuron degeneration via stress in SAMP8 mice. **Neurosci. Lett.**, v.414, n.2, p.188-191, 2007.

KUBO, K. Y. *et al.* The bite-raised condition in aged SAMP8 mice induces dendritic spine changes in the hippocampal region. **Neurosci. Lett.**, v.441, n.2, p.141-144, 2008.

KUGA, N.; SASAKI, T.; TAKAHARA, Y.; MATSUKI, N.; IKEGAYA, Y. Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks in vivo. **J. Neurosci.**, v.31, n.7, p.2607-2614, 2011.

LANDFIELD, P.W.; ROSE, G.; SANDLES, L.; WOHLSTADTER, T.C.; LYNCH, G. Patterns of astroglial hypertrophy and neuronal degeneration in the hippocampus of ages, memory-deficient rats. **J. Gerontol.**, v.32, n.1, p.3-12, 1977.

LECRUX, C.; TOUSSAY, X.; KOCHARYAN, A.; FERNANDES, P.; NEUPANE, S.; LEVESQUE, M.; PLAISIER, F.; SHMUEL, A.; CAULI, B.; HAMEL, E. Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. **J. Neurosci.**, v.31, n.27, p.9836-9847, 2011.

LEE, C.J.; MANNAIONI, G.; YUAN, H.; WOO, D.H.; GINGRICH, M.B.; TRAYNELIS, S.F. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. **J. Physiol.**, 581, p.1057-1081, 2007.

LEI, D. L.; LONG, J.M.; HENGEMIHLE, J.; O'NEILL, J.; MANAYE, K.F.; INGRAM, D.K.; MOUTON, P.R. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. **Neuroscience**, v.121, n.3, p.659-666, 2003.

LINDSEY, J.D.; LANDFIELD, P.W.; LYNCH, G. Early onset and topographical distribution of hypertrophied astrocytes in hippocampus of aging rats: a quantitative study. **J. Gerontol.**, v.34, n.5, p.661-671, 1979.

LIPTON, P.A.; EICHENBAUM, H. Complementary roles of hippocampus and medial entorhinal cortex in episodic memory. **Neural Plast.**, v.2008, p.1-8, 2008.

LONG, J. M. *et al.* Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. **Neurobiol. Aging [S.I.]**, v.19, n.5, p. 497-503, 1998.

LOPES, M.A.; BOTTINO, C.M.C. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo: Análise dos estudos epidemiológicos em 1994 a 2000. **Arq. Neuro-Psiq.**, v.60, n.1, p.61-69, 2002.

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.

Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. **Trends Neurosci.**, v.28, n.6, p.334-340, 2005.

MAO, L.; WANG, J. Q. Adult neural stem/progenitor cells in neurodegenerative repair. **Sheng Li Xue Bao**, v.55, n.3, p.233-244, 2003.

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.

MOHAMMED, A. H.; ZHU, S. W.; DARMOPIL, S.; HJERLING-LEFFLER, J.; ERNFORS, P.; WINBLAD, B.; DIAMOND, M. C.; ERIKSSON, P. S.; BOGDANOVIC, N. Environmental enrichment and the brain. **Prog. Brain. Res.**, v.138, p.109-133, 2002.

MOUTON, P.R.; LONG, J.M.; LEI, D.L.; HOWARD, V.; JUCKER, M.; CALHOUN, M.E.; INGRAM, D.K. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. **Brain Res.**, v.956, n.1, p.30-35, 2002.

ONO, Y.; YAMAMOTO, T.; KUBO, K.Y.; ONOZUKA, M. Occlusion and brain function: mastication as a prevention of cognitive dysfunction. **J. Oral Rehabil.**, v.37, n.8, p.624-640, 2010.

ONOZUKA, M. *et al.* Reduced mastication stimulates of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. **Brain Research.**, v.826, n.1, p.148-153, 1999.

ONOZUKA, M.; WATANABE, K.; NAGASAKI, S.; JIANG, Y.; OZONO, S.; NISHIYAMA, K.; KAWASE, T.; KARASAWA, N.; NAGATSU, I. Impairment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice. **Behavioral Brain Res.**, v.108, n.2, p.145-155, 2000.

ONOZUKA, M. *et al.* Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. **Behavioral Brain Res.**, v.133, n.2, p.197-204, 2002.

ONOZUKA, M.; FUJITA, M.; WATANABE, K.; HIRANO, Y.; NIWA, M.; NISHIYAMA, K.; SAITO, S. Mapping brain region activity during chewing: a functional magnetic resonance imaging study. **Journal dental research.**, v.81, n.11, p.743-746, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **World Health Statistics, 2009**. Genebra, p.132-140, 2009.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. **Science**, v.317, p.1083-1086, 2007.

POLLAK, D.D.; HERKNER, K.; HOEGER, H.; LUBEC, G. Behavioral testing upregulates pCaMKII, BDNF, PSD-95 and egr-1 in hippocampus of FVB/N mice. **Behavioral Brain Res.**, v.163, n.1, p.128-135, 2005.

PUURUNEN, K.; SIVENIUS J. Influence of enriched environment on spatial learning following cerebral insult. **Reviews in Neurosciences.**, v.13, n.4, p.347–364, 2002.

REITZ, C.; BRICKMAN, A.M.; BROWN, T.R.; MANLY, J.; DECARLI, C.; SMALL, S.A.; MAYEUX, R. Linking hippocampal structure and function to memory performance in an aging population. **Archives of neurology**, v.66, n.11, p.1385-1392, 2009.

ROSA, A.G.F.; FERNANDEZ, R.A.C.; PINTO, V.G.; RAMOS, L.R. Condições de saúde bucal em pessoas de 60 anos ou mais no Município de São Paulo (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, v.26, n.3, p.155-160, 1992.

ROSE, F. D. *et al.* Environmental enrichment and recovery from contralateral sensory neglect in rats with large unilateral neocortical lesions. **Behavioral Brain Res.**, v.24, n.3, p.195–202, 1987.

ROSENZWEIG, M. R., BENNETT E. L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioral Brain Res.**, V 78, n 1, p. 57–65, 1996.

SADIK, K; WILCOCK G. The increasing burden of Alzheimer disease. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, v.17, n.3, p.75-79, 2003.

SANCHEZ, M.M.; LADD, C.O.; PLOTSKY, P.M. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. **Dev Psychopathol**, v.13, n.3, p.419-449, 2001.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WESSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R., ARANCIO, O.; BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects antidepressants. **Science**, v.301, p.805-809, 2003.

SCHMITZ, C. Variation of fractionator estimates and its prediction. **Anat. Embryol. (Berl)**, v.198, p.371-397, 1998.

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

SESAY, M.; TANAKA, A.; UENO, Y.; LECAROS, P.; DE BEAUFORT, D.G. Assessment of regional cerebral blood flow by xenon-enhanced computed tomography during mastication in humans. **Keio J. Med.**, v.49, n.1, p.125-128, 2000

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

SPANGLER, E. L.; WAGGIE, K. S.; HENGEMIHLE, J.; ROBERTS, D.; HESS, B.; INGRAM, D. K. Behavioral assessment of aging in male Fischer 344 and brown Norway rat strains and their F1 hybrid. **Neurobiol. Aging**, v.15, n.3, p.319-328, 1994.

STARK, A.K.; PETERSEN, A.O.; GARDI, J.; GUNDERSEN, H.J.; PAKKENBERG B. Spatial distribution of human neocortical neurons and glial cells according to sex and age measured by the saucer method. **J. Neurosci. Methods**, v.164, n.1, p.19-26, 2007.

TANAKA, A.; WATANABE, Y.; KATO, H.; ARAKI, T. Immunohistochemical changes related to ageing in the mouse hippocampus and subventricular zone. **Mech. Ageing Dev.**, v.128, n.4, p.303-310, 2007.

TAPP, P.D.; SIWAK, C.T.; GAO, F.Q.; CHIOU, J.Y.; BLACK, S.E.; HEAD, E.; MUGGENBURG, B.A.; COTMAN, C.W.; MILGRAM, N.W.; SU, M.Y. Frontal lobe volume, function, and beta-amyloid pathology in a canine model of aging. **J. Neurosci.**, v.24, n.38, p.8205-8213, 2004.

TERASAWA, H.; HIRAI, T.; NINOMIYA, T.; IKEDA, Y.; ISHIJIMA, T.; YAJIMA, T.; HAMAUE, N.; NAGASE, Y.; KANG, Y.; MINAMI, M. Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats: immunohistochemical and biochemical studies. **Neuroscience Research**, v.43, n.4, p.373-379, 2002.

TSUTSUI, K. *et al.* Influences of reduced masticatory sensory input from soft-diet feeding upon spatial memory/learning ability in mice. **Biomed. Res.**, v.28, n.1, p.1-7, 2007.

TURNER, D.A.; BUHL, E.H.; HAILER, N.P.; NITSCH, R. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. **Prog. Neurobiol.**, v.55, n.6, p.537-562, 1998.

VAN DER STAAY, F. J. Assessment of age-associated cognitive deficits in rats: a tricky business. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.26, n.7., p.753-759, 2002.

VAN GROEN, T.; MIETTINEN, P.; KADISH, I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. **Hippocampus**, v.13, n.1, p.133-149, 2003.

VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature reviews**, v.1, n.3, p.191-198, 2000.

VAN PRAAG, H. *et al.* Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. **Journal of Neuroscience**, v.25, n.38, p.1-13, 2005.

VIOLA, G.G.; RODRIGUES, L.; AMÉRICO, J.C.; HANSEL, G.; VARGAS, R.S.; BIASIBETTI, R.; SWAROWSKY, A.; GONÇALVES, C.A.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M.; SOUZA, D.O.; AMARAL, O.B. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. **Brain Res.**, n.1274, p.47-54, 2009.

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.

WATANABE, K.; OZONO, S.; NISHIYAMA, K.; SAITO, S.; TONOSAKI, K.; FUJITA, M.; ONOZUKA, M. The molarless condition in aged SAMP8 mice attenuates hippocampal Fos induction linked to water maze performance. **Behavioral Brain Res.**, v.128, n.1, p.19-25, 2002.

WHITNEY, N.P.; EIDEM, T.M.; PENG, H.; HUANG, Y.; ZHENG, J.C. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: Relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. **J. Neurochem.**, v.108, n.6, p.1343-1359, 2009.

WICK, G. Do we need research on aging in general and publication in gerontological journals in particular? **Exp. Gerontol.**, v. 35, n.1, p.1-5, 2000.

WILLIAMS, B. M., LUO, Y., WARD, C., REDD, K., GIBSON, R., KUCZAJ, S. A. and MCCOY, J. G. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. **Physiol. Behav.**, v.73, n.4, p.649-658, 2001.

WINOCUR, G. Environmental influences on cognitive decline in aged rats. **Neurobiol. Aging**. v.19, n.6, p.589-597, 1998.

WITTER, M.P.; MOSER, E.I. Spatial Representation and the architecture of entorhinal cortex. **Trends Neurosci.**, v.29, n.12, p.671-678, 2006.

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

WU, Y.; ZHANG, A.Q.; YEW, D.T. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. **Neurochem. Int.**, v.46, n.7, p.565-574, 2005.

YAMAMOTO, T.; HIRAYAMA, A. Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. **Brain Res.**, v.902, n.2, p.255-63, 2001.

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada, uniformemente aplicados a todos os animais estudados do ambiente padrão.

Lacunoso-Molecular - CA1								
Sujeitos^(a)	a (caixa) μm²	A (x,y grade) μm²	asf	tsf	ssf	No. de caixas	No. de secções	ΣQ
Ambiente Padrão - Hard Diet / 6M								
AP HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.010	1/6	125	5	532
AP HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.008	1/6	161	6	801
AP HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.38 ± 0.003	1/6	156	6	763
AP HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.005	1/6	152	6	711
Ambiente Padrão - Hard Diet / 12M								
AP HD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.38 ± 0.003	1/6	103	5	632
AP HD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.005	1/6	120	5	571
AP HD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.002	1/6	115	5	567
AP HD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.003	1/6	115	5	539
AP HD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.006	1/6	97	5	521
Ambiente Padrão - Hard Diet / 18M								
AP HD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.002	1/6	133	6	474
AP HD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.003	1/6	108	5	467
AP HD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.002	1/6	149	6	648
AP HD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.002	1/6	125	5	503
AP HD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.004	1/6	111	5	456
Ambiente Padrão - Soft Diet / 6M								
AP SD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.015	1/6	147	5	679
AP SD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.013	1/6	134	5	602
AP SD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.014	1/6	123	5	522
AP SD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.012	1/6	132	6	493
AP SD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.29 ± 0.008	1/6	115	5	458
Ambiente Padrão - Soft Diet / 12M								
AP SD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.004	1/6	103	5	738
AP SD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.006	1/6	128	5	534
AP SD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.005	1/6	149	5	590
AP SD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.29 ± 0.001	1/6	122	5	553
AP SD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.004	1/6	172	6	687
Ambiente Padrão - Soft Diet / 18M								
AP SD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.007	1/6	126	6	489
AP SD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.004	1/6	140	6	559
AP SD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.002	1/6	168	6	556
AP SD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.008	1/6	146	6	549

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

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada, uniformemente aplicados a todos os animais estudados do ambiente padrão.

Radiatum - CA1								
Sujeitos^(a)	a (caixa) μm²	A (x,y grade) μm²	asf	tsf	ssf	No. de caixas	No. de secções	ΣQ⁻
Ambiente Padrão - Hard Diet / 6M								
AP HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.31 ± 0.012	1/6	166	5	377
AP HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.009	1/6	190	6	596
AP HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.005	1/6	203	6	705
AP HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.004	1/6	188	6	587
Ambiente Padrão - Hard Diet / 12M								
AP HD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.003	1/6	149	5	480
AP HD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.004	1/6	171	5	543
AP HD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.001	1/6	159	5	523
AP HD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.004	1/6	171	5	508
AP HD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.005	1/6	148	5	519
Ambiente Padrão - Hard Diet / 18M								
AP HD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.38 ± 0.001	1/6	211	6	639
AP HD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.003	1/6	172	5	503
AP HD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.002	1/6	223	6	706
AP HD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.002	1/6	180	5	491
AP HD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.005	1/6	182	5	567
Ambiente Padrão - Soft Diet / 6M								
AP SD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.017	1/6	166	5	501
AP SD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.016	1/6	159	5	468
AP SD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.015	1/6	144	5	381
AP SD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.010	1/6	180	6	462
AP SD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.29 ± 0.009	1/6	139	5	329
Ambiente Padrão - Soft Diet / 12M								
AP SD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.38 ± 0.004	1/6	153	5	646
AP SD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.005	1/6	149	5	438
AP SD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.004	1/6	201	5	536
AP SD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.29 ± 0.001	1/6	149	5	410
AP SD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.003	1/6	218	6	576
Ambiente Padrão - Soft Diet / 18M								
AP SD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.006	1/6	185	6	478
AP SD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.004	1/6	191	6	482
AP SD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.003	1/6	226	6	515
AP SD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.008	1/6	182	6	519

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

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada, uniformemente aplicados a todos os animais estudados do ambiente padrão.

Piramidal - CA1								
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm^2	A (x,y grade) μm^2	asf	tsf	ssf	No. de caixas	No. de secções	ΣQ
Ambiente Padrão - Hard Diet / 6M								
AP HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.30 ± 0.013	1/6	78	5	123
AP HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.38 ± 0.009	1/6	102	6	204
AP HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.38 ± 0.005	1/6	93	6	142
AP HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.002	1/6	105	6	208
Ambiente Padrão - Hard Diet / 12M								
AP HD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.003	1/6	96	5	249
AP HD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.004	1/6	101	5	235
AP HD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.002	1/6	108	5	299
AP HD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.005	1/6	98	5	185
AP HD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.004	1/6	93	5	224
Ambiente Padrão - Hard Diet / 18M								
AP HD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.38 ± 0.001	1/6	102	6	192
AP HD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.003	1/6	93	5	167
AP HD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.001	1/6	116	6	262
AP HD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.002	1/6	101	5	192
AP HD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.005	1/6	105	5	207
Ambiente Padrão - Soft Diet / 6M								
AP SD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.019	1/6	81	5	151
AP SD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.016	1/6	77	5	125
AP SD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.015	1/6	67	5	92
AP SD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.29 ± 0.008	1/6	77	6	122
AP SD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.015	1/6	55	5	84
Ambiente Padrão - Soft Diet / 12M								
AP SD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.43 ± 0.002	1/6	93	5	241
AP SD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.005	1/6	93	5	236
AP SD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.002	1/6	113	5	253
AP SD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.29 ± 0.001	1/6	97	5	257
AP SD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.27 ± 0.003	1/6	120	6	249
Ambiente Padrão - Soft Diet / 18M								
AP SD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.003	1/6	109	6	174
AP SD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.003	1/6	91	6	142
AP SD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.004	1/6	109	6	125
AP SD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.007	1/6	86	6	174

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

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada, uniformemente aplicados a todos os animais estudados do ambiente padrão.

Oriens - CA1								
Sujeitos^(a)	a (caixa) μm²	A (x,y grade) μm²	asf	tsf	ssf	No. de caixas	No. de secções	ΣQ
Ambiente Padrão - Hard Diet / 6M								
AP HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.29 ± 0.012	1/6	133	5	309
AP HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.011	1/6	141	6	433
AP HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.004	1/6	162	6	523
AP HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.003	1/6	143	6	401
Ambiente Padrão - Hard Diet / 12M								
AP HD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.004	1/6	107	5	388
AP HD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.005	1/6	117	5	393
AP HD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.002	1/6	135	5	426
AP HD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.006	1/6	122	5	353
AP HD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.005	1/6	114	5	411
Ambiente Padrão - Hard Diet / 18M								
AP HD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.001	1/6	148	6	416
AP HD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.001	1/6	122	5	315
AP HD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.001	1/6	155	6	454
AP HD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.002	1/6	131	5	337
AP HD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.006	1/6	125	5	304
Ambiente Padrão - Soft Diet / 6M								
AP SD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.019	1/6	132	5	408
AP SD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.016	1/6	110	5	349
AP SD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.011	1/6	122	5	327
AP SD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.007	1/6	135	6	363
AP SD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.28 ± 0.011	1/6	102	5	242
Ambiente Padrão - Soft Diet / 12M								
AP SD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.42 ± 0.002	1/6	117	5	414
AP SD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.005	1/6	97	5	262
AP SD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.25 ± 0.004	1/6	121	5	348
AP SD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.29 ± 0.001	1/6	100	5	279
AP SD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.27 ± 0.004	1/6	137	6	323
Ambiente Padrão - Soft Diet / 18M								
AP SD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.004	1/6	159	6	453
AP SD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.27 ± 0.003	1/6	163	6	426
AP SD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.004	1/6	183	6	432
AP SD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.007	1/6	135	6	399

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

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada, uniformemente aplicados a todos os animais estudados do ambiente enriquecido.

Lacunoso-Molecular - CA1								
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm ²	A (x,y grade) μm ²	asf	tsf	ssf	No. de caixas	No. de seções	ΣQ ⁻
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 6M								
AE HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.41 ± 0.006	1/6	140	5	632
AE HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37± 0.011	1/6	196	6	1053
AE HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.012	1/6	213	7	770
AE HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.43 ± 0.006	1/6	175	6	722
AE HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.38 ± 0.004	1/6	139	5	539
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 12M								
AE HD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.002	1/6	109	5	498
AE HD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.41± 0.003	1/6	133	6	690
AE HD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34± 0.004	1/6	108	5	463
AE HD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.005	1/6	115	5	532
AE HD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.005	1/6	140	6	673
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 18M								
AE HD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.30 ± 0.003	1/6	115	5	498
AE HD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.005	1/6	116	6	460
AE HD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.009	1/6	143	6	723
AE HD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.007	1/6	134	5	545
AE HD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.31 ± 0.004	1/6	140	6	526
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 6M								
AE SD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.43 ± 0.013	1/6	181	6	750
AE SD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.42± 0.003	1/6	191	7	871
AE SD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.39± 0.009	1/6	135	5	609
AE SD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.40± 0.007	1/6	201	7	863
AE SD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.42± 0.012	1/6	148	5	681
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 12M								
AE SD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.36± 0.009	1/6	117	6	537
AE SD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.014	1/6	98	5	427
AE SD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.007	1/6	121	5	615
AE SD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.006	1/6	140	6	637
AE SD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.34± 0.013	1/6	112	5	523
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 18M								
AE SD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.003	1/6	232	6	740
AE SD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.008	1/6	112	5	496
AE SD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.01	1/6	137	6	670
AE SD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.004	1/6	92	5	329
AE SD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.005	1/6	99	5	405

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

73

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada, uniformemente aplicados a todos os animais estudados do ambiente enriquecido.

Radiatum - CA1								
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm ²	A (x,y grade) μm ²	asf	tsf	ssf	No. de caixas	No. de secções	ΣQ
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 6M								
AE HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.008	1/6	202	5	569
AE HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.016	1/6	247	6	781
AE HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.009	1/6	313	7	871
AE HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.42 ± 0.008	1/6	270	6	937
AE HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.004	1/6	185	5	475
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 12M								
AE HD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.001	1/6	154	5	441
AE HD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.40± 0.003	1/6	210	6	691
AE HD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.33± 0.004	1/6	161	5	415
AE HD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.004	1/6	143	5	433
AE HD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.005	1/6	218	6	701
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 18M								
AE HD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.003	1/6	169	5	431
AE HD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.004	1/6	171	6	484
AE HD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.009	1/6	208	6	677
AE HD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.009	1/6	188	5	483
AE HD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.002	1/6	200	6	565
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 6M								
AE SD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.43 ± 0.009	1/6	262	6	915
AE SD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.41± 0.003	1/6	282	7	713
AE SD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.39± 0.007	1/6	194	5	559
AE SD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.006	1/6	315	7	865
AE SD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.41± 0.008	1/6	187	5	548
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 12M								
AE SD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.36± 0.010	1/6	183	6	570
AE SD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.012	1/6	161	5	494
AE SD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.003	1/6	178	5	574
AE SD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.005	1/6	191	6	637
AE SD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.35± 0.017	1/6	154	5	476
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 18M								
AE SD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.003	1/6	232	6	740
AE SD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.005	1/6	153	5	485
AE SD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.013	1/6	169	6	539
AE SD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.26 ± 0.002	1/6	139	5	342
AE SD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.007	1/6	180	5	534

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

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada, uniformemente aplicados a todos os animais estudados do ambiente enriquecido.

Piramidal - CA1								
Sujeitos^(a)	a (caixa) μm²	A (x,y grade) μm²	asf	tsf	ssf	No. de caixas	No. de secções	ΣQ⁻
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 6M								
AE HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.006	1/6	95	5	176
AE HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.017	1/6	144	6	304
AE HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.007	1/6	163	7	260
AE HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.41 ± 0.009	1/6	270	6	937
AE HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.007	1/6	110	5	172
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 12M								
AE HD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.003	1/6	73	5	110
AE HD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.005	1/6	100	6	214
AE HD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.005	1/6	81	5	104
AE HD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.006	1/6	77	5	132
AE HD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.004	1/6	92	6	177
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 18M								
AE HD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.002	1/6	135	5	71
AE HD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.005	1/6	81	6	156
AE HD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.009	1/6	94	6	217
AE HD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.010	1/6	83	5	105
AE HD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.004	1/6	90	6	155
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 6M								
AE SD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.41 ± 0.004	1/6	144	6	341
AE SD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.005	1/6	152	7	316
AE SD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.006	1/6	99	5	222
AE SD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.009	1/6	156	7	226
AE SD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.010	1/6	104	5	205
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 12M								
AE SD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.010	1/6	79	6	143
AE SD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.014	1/6	71	5	127
AE SD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.003	1/6	79	5	138
AE SD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.005	1/6	85	6	165
AE SD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.022	1/6	65	5	116
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 18M								
AE SD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.006	1/6	97	6	183
AE SD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.003	1/6	68	5	150
AE SD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.014	1/6	79	6	188
AE SD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.27 ± 0.003	1/6	62	5	91
AE SD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.006	1/6	81	5	117

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

Os parâmetros experimentais para cada camada estudada, uniformemente aplicados a todos os animais⁷⁵ estudados do ambiente enriquecido.

Oriens - CA1								
Sujeitos ^(a)	a (caixa) μm ²	A (x,y grade) μm ²	asf	tsf	ssf	No. de caixas	No. de secções	ΣQ
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 6M								
AE HD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.013	1/6	135	5	414
AE HD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.35± 0.016	1/6	160	6	451
AE HD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.68 ± 0.301	1/6	193	7	414
AE HD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.42 ± 0.002	1/6	185	6	556
AE HD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.005	1/6	124	5	289
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 12M								
AE HD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.002	1/6	127	5	389
AE HD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.40± 0.016	1/6	159	6	478
AE HD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.33± 0.005	1/6	123	5	292
AE HD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.36 ± 0.006	1/6	120	5	343
AE HD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.40 ± 0.004	1/6	149	6	485
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 18M								
AE HD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.003	1/6	111	5	298
AE HD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.004	1/6	129	6	405
AE HD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.009	1/6	155	6	535
AE HD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.008	1/6	137	5	384
AE HD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.31 ± 0.002	1/6	145	6	409
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 6M								
AE SD 6M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.42 ± 0.008	1/6	194	6	577
AE SD 6M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.41± 0.004	1/6	197	7	528
AE SD 6M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.39± 0.004	1/6	125	5	366
AE SD 6M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.39 ± 0.007	1/6	242	7	592
AE SD 6M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.39± 0.012	1/6	121	5	317
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 12M								
AE SD 12M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.35± 0.009	1/6	134	6	466
AE SD 12M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.015	1/6	114	5	330
AE SD 12M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.006	1/6	134	5	447
AE SD 12M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.37 ± 0.005	1/6	145	6	467
AE SD 12M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.35± 0.020	1/6	112	5	368
Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 18M								
AE SD 18M Animal 1	80 x 80	80 x 80	1	0.33 ± 0.004	1/6	169	6	536
AE SD 18M Animal 2	80 x 80	80 x 80	1	0.32 ± 0.005	1/6	111	5	377
AE SD 18M Animal 3	80 x 80	80 x 80	1	0.34 ± 0.016	1/6	117	6	354
AE SD 18M Animal 4	80 x 80	80 x 80	1	0.25 ± 0.003	1/6	118	5	314
AE SD 18M Animal 5	80 x 80	80 x 80	1	0.35 ± 0.008	1/6	140	5	404

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 para o grupo de ambiente padrão.

Lacunos-Molecular - CA1							
Ambiente Padrão - Hard Diet / 6M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	9900	21.74 ± 0.68	0.05	AP SD 6M Animal 1	11613	20.12 ± 0.89	0.05
AP HD 6M Animal 2	11888	17.50 ± 0.36	0.05	AP SD 6M Animal 2	9797	19.03 ± 0.76	0.05
AP HD 6M Animal 3	12019	18.40 ± 0.16	0.05	AP SD 6M Animal 3	9433	21.15 ± 1.05	0.05
AP HD 6M Animal 4	12895	21.26 ± 0.33	0.04	AP SD 6M Animal 4	9575	24.31 ± 0.68	0.06
				AP SD 6M Animal 5	10534	24.85 ± 0.76	0.05
Mean	11675	19.72 ± 0.38	0.05	Mean	10190	21.89 ± 0.90	0.05
SD	1265			SD	901		
CV ²	0.012			CV ²	0.008		
CE ²	0.002			CE ²	0.003		
CE ² /CV ²	0.136			CE ² /CV ²	0.320		
CVB ²	0.010			CVB ²	0.005		
CVB ² (%CV ²)	86.37%			CVB ² (%CV ²)	68.02%		
Ambiente Padrão - Hard Diet / 12M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 12M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 12M Animal 1	9803	18.15 ± 0.32	0.06	AP SD 12M Animal 1	10998	17.44 ± 0.45	0.05
AP HD 12M Animal 2	9371	19.10 ± 0.61	0.05	AP SD 12M Animal 2	9379	20.94 ± 0.95	0.06
AP HD 12M Animal 3	9099	18.76 ± 0.23	0.06	AP SD 12M Animal 3	13321	26.83 ± 1.27	0.05
AP HD 12M Animal 4	9233	20.18 ± 0.40	0.06	AP SD 12M Animal 4	11075	23.49 ± 0.22	0.06
AP HD 12M Animal 5	7914	17.52 ± 0.62	0.06	AP SD 12M Animal 5	14883	25.04 ± 0.90	0.05
Mean	9084	18.74 ± 0.42	0.05	Mean	11931	22.75 ± 0.77	0.05
SD	705			SD	2165		
CV ²	0.006			CV ²	0.033		
CE ²	0.003			CE ²	0.003		
CE ² /CV ²	0.415			CE ² /CV ²	0.076		
CVB ²	0.004			CVB ²	0.030		
CVB ² (%CV ²)	58.52%			CVB ² (%CV ²)	92.40%		
Ambiente Padrão - Hard Diet / 18M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 18M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 18M Animal 1	7225	17.76 ± 0.08	0.06	AP SD 18M Animal 1	9052	21.21 ± 0.46	0.06
AP HD 18M Animal 2	7760	19.32 ± 0.28	0.06	AP SD 18M Animal 2	11710	24.32 ± 0.38	0.05
AP HD 18M Animal 3	10680	19.16 ± 0.19	0.05	AP SD 18M Animal 3	12714	26.62 ± 0.29	0.05
AP HD 18M Animal 4	8579	19.94 ± 0.24	0.06	AP SD 18M Animal 4	9171	19.43 ± 0.43	0.05
AP HD 18M Animal 5	7690	19.70 ± 0.46	0.06				
Mean	8387	19.18 ± 0.25	0.05	Mean	10661	22.89 ± 0.39	0.05
SD	1371			SD	1837		
CV ²	0.027			CV ²	0.030		
CE ²	0.003			CE ²	0.003		
CE ² /CV ²	0.094			CE ² /CV ²	0.084		
CVB ²	0.024			CVB ²	0.027		
CVB ² (%CV ²)	90.64%			CVB ² (%CV ²)	91.57%		

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)

Estimativa Individual Unilateral do Número (N) de Astrócitos com respectivos Coeficientes de Erro (CE)⁷⁶ nas suas respectivas regiões do hipocampo para o grupo de ambiente padrão.

Radiatum - CA1

Ambiente Padrão - Hard Diet / 6M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	7203	22.05 ± 0.82	0.05	AP SD 6M Animal 1	8495	19.98 ± 1.01	0.04
AP HD 6M Animal 2	9060	17.89 ± 0.45	0.04	AP SD 6M Animal 2	7384	18.67 ± 0.91	0.04
AP HD 6M Animal 3	10763	17.92 ± 0.25	0.03	AP SD 6M Animal 3	6671	20.68 ± 1.07	0.05
AP HD 6M Animal 4	10345	20.65 ± 0.27	0.03	AP SD 6M Animal 4	6799	24.05 ± 0.72	0.05
				AP SD 6M Animal 5	9772	24.36 ± 0.93	0.04
Mean	9342	19.62 ± 0.44	0.04	Mean	7824	21.54 ± 0.92	0.04
SD	1600			SD	1305		
CV ²	0.029			CV ²	0.028		
CE ²	0.001			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.031			CE ² /CV ²	0.058		
CVB ²	0.028			CVB ²	0.026		
CVB ² (%CV ²)	96.93%			CVB ² (%CV ²)	94.24%		
Ambiente Padrão - Hard Diet / 12M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 12M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 12M Animal 1	7579	18.50 ± 0.32	0.05	AP SD 12M Animal 1	10166	18.34 ± 0.50	0.04
AP HD 12M Animal 2	8939	18.99 ± 0.52	0.04	AP SD 12M Animal 2	7812	20.94 ± 0.72	0.05
AP HD 12M Animal 3	8280	18.50 ± 0.20	0.04	AP SD 12M Animal 3	12033	26.23 ± 0.98	0.04
AP HD 12M Animal 4	8924	20.44 ± 0.54	0.04	AP SD 12M Animal 4	8334	23.74 ± 0.18	0.05
AP HD 12M Animal 5	8023	17.75 ± 0.52	0.05	AP SD 12M Animal 5	12112	24.89 ± 0.84	0.04
Mean	8349	18.83 ± 0.44	0.04	Mean	10091	22.83 ± 0.65	0.04
SD	587			SD	2008		
CV ²	0.005			CV ²	0.040		
CE ²	0.002			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.324			CE ² /CV ²	0.040		
CVB ²	0.003			CVB ²	0.038		
CVB ² (%CV ²)	67.63%			CVB ² (%CV ²)	95.95%		
Ambiente Padrão - Hard Diet / 18M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 18M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 18M Animal 1	9831	17.99 ± 0.06	0.04	AP SD 18M Animal 1	8606	21.21 ± 0.42	0.04
AP HD 18M Animal 2	8587	19.88 ± 0.31	0.04	AP SD 18M Animal 2	10059	24.32 ± 0.34	0.04
AP HD 18M Animal 3	11753	19.51 ± 0.20	0.04	AP SD 18M Animal 3	11735	26.72 ± 0.36	0.04
AP HD 18M Animal 4	8285	19.76 ± 0.19	0.04	AP SD 18M Animal 4	8567	19.13 ± 0.44	0.04
AP HD 18M Animal 5	9439	19.60 ± 0.56	0.04				
Mean	9578	19.35 ± 0.26	0.04	Mean	9741	22.84 ± 0.39	0.04
SD	1366			SD	1499		
CV ²	0.020			CV ²	0.024		
CE ²	0.001			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.044			CE ² /CV ²	0.068		
CVB ²	0.019			CVB ²	0.022		
CVB ² (%CV ²)	95.57%			CVB ² (%CV ²)	93.24%		

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)

Estimativa Individual Unilateral do Número (N) de Astrócitos com respectivos Coeficientes de Erro (CE)⁷⁷ nas suas respectivas regiões do hipocampo para o grupo de ambiente padrão.

Piramidal - CA1							
Ambiente Padrão - Hard Diet / 6M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	2454	22.84 ± 0.94	0.09	AP SD 6M Animal 1	2582	20.07 ± 1.12	0.07
AP HD 6M Animal 2	3175	18.26 ± 0.46	0.06	AP SD 6M Animal 2	1954	18.75 ± 0.94	0.09
AP HD 6M Animal 3	2194	18.07 ± 0.24	0.07	AP SD 6M Animal 3	1628	20.73 ± 1.00	0.07
AP HD 6M Animal 4	3722	20.86 ± 0.18	0.05	AP SD 6M Animal 4	1767	14.65 ± 1.18	0.09
				AP SD 6M Animal 5	2365	24.27 ± 0.72	0.06
Mean	1886	20.00 ± 0.45	0.07	Mean	2059	19.69 ± 0.99	0.07
SD	694			SD	403		
CV ²	0.135			CV ²	0.038		
CE ²	0.004			CE ²	0.005		
CE ² /CV ²	0.027			CE ² /CV ²	0.128		
CVB ²	0.132			CVB ²	0.033		
CVB ² (%CV ²)	97.34%			CVB ² (%CV ²)	87.20%		
Ambiente Padrão - Hard Diet / 12M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 12M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 12M Animal 1	3993	18.84 ± 0.44	0.06	AP SD 12M Animal 1	3318	16.12 ± 0.19	0.06
AP HD 12M Animal 2	3914	19.36 ± 0.54	0.05	AP SD 12M Animal 2	4249	21.02 ± 0.68	0.06
AP HD 12M Animal 3	4748	18.69 ± 0.24	0.05	AP SD 12M Animal 3	5731	26.30 ± 0.58	0.05
AP HD 12M Animal 4	3250	20.39 ± 0.65	0.07	AP SD 12M Animal 4	5325	24.25 ± 0.12	0.06
AP HD 12M Animal 5	3505	18.04 ± 0.48	0.07	AP SD 12M Animal 5	5371	25.22 ± 0.80	0.05
Mean	3881	19.06 ± 0.47	0.06	Mean	4798	22.58 ± 0.48	0.05
SD	571			SD	996		
CV ²	0.022			CV ²	0.043		
CE ²	0.003			CE ²	0.003		
CE ² /CV ²	0.166			CE ² /CV ²	0.058		
CVB ²	0.018			CVB ²	0.041		
CVB ² (%CV ²)	83.36%			CVB ² (%CV ²)	94.19%		
Ambiente Padrão - Hard Diet / 18M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 18M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 18M Animal 1	3026	18.30 ± 0.06	0.07	AP SD 18M Animal 1	3171	21.25 ± 0.22	0.07
AP HD 18M Animal 2	2942	20.44 ± 0.35	0.06	AP SD 18M Animal 2	3035	24.98 ± 0.30	0.07
AP HD 18M Animal 3	4402	19.66 ± 0.18	0.05	AP SD 18M Animal 3	2844	26.8 ± 0.46	0.07
AP HD 18M Animal 4	3288	19.97 ± 0.21	0.07	AP SD 18M Animal 4	2773	18.68 ± 0.35	0.06
AP HD 18M Animal 5	3839	21.54 ± 0.58	0.06				
Mean	3499	19.98 ± 0.28	0.06	Mean	2955	22.92 ± 0.33	0.07
SD	614			SD	181		
CV ²	0.031			CV ²	0.004		
CE ²	0.004			CE ²	0.004		
CE ² /CV ²	0.117			CE ² /CV ²	0.960		
CVB ²	0.027			CVB ²	0.000		
CVB ² (%CV ²)	88.30%			CVB ² (%CV ²)	4.04%		

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)

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

Oriens - CA1

Ambiente Padrão - Hard Diet / 6M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 6M Animal 1	6327	23.83 ± 0.92	0.05	AP SD 6M Animal 1	7238	20.71 ± 1.18	0.05
AP HD 6M Animal 2	6887	18.81 ± 0.58	0.05	AP SD 6M Animal 2	5681	19.34 ± 1.01	0.05
AP HD 6M Animal 3	8395	18.85 ± 0.24	0.04	AP SD 6M Animal 3	5878	21.28 ± 0.82	0.05
AP HD 6M Animal 4	7347	21.45 ± 0.21	0.05	AP SD 6M Animal 4	5269	25.11 ± 1.00	0.05
				AP SD 6M Animal 5	7946	25.05 ± 0.70	0.05
Mean	7239	20.73 ± 0.48	0.05	Mean	6402	22.29 ± 0.94	0.05
SD	876			SD	1135		
CV ²	0.015			CV ²	0.031		
CE ²	0.002			CE ²	0.003		
CE ² /CV ²	0.109			CE ² /CV ²	0.080		
CVB ²	0.013			CVB ²	0.029		
CVB ² (%CV ²)	89.07%			CVB ² (%CV ²)	92.04%		
Ambiente Padrão - Hard Diet / 12M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 12M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 12M Animal 1	6271	19.09 ± 0.47	0.05	AP SD 12M Animal 1	5900	16.46 ± 0.23	0.05
AP HD 12M Animal 2	6697	19.59 ± 0.66	0.05	AP SD 12M Animal 2	4781	21.23 ± 0.72	0.06
AP HD 12M Animal 3	6925	18.85 ± 0.23	0.05	AP SD 12M Animal 3	8296	27.40 ± 1.04	0.05
AP HD 12M Animal 4	6211	20.42 ± 0.80	0.05	AP SD 12M Animal 4	5751	23.98 ± 0.22	0.05
AP HD 12M Animal 5	6428	17.88 ± 0.57	0.05	AP SD 12M Animal 5	7069	25.59 ± 1.08	0.06
Mean	6506	19.16 ± 0.55	0.05	Mean	6359	22.93 ± 0.66	0.05
SD	300			SD			
CV ²	0.002			CV ²			
CE ²	0.002			CE ²			
CE ² /CV ²	1.176			CE ² /CV ²			
CVB ²	-0.0004			CVB ²			
CVB ² (%CV ²)	-17.578			CVB ² (%CV ²)			
Ambiente Padrão - Hard Diet / 18M				Ambiente Padrão - Soft Diet / 18M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AP HD 18M Animal 1	6536	18.47 ± 0.09	0.05	AP SD 18M Animal 1	8478	21.86 ± 0.30	0.05
AP HD 18M Animal 2	5620	20.62 ± 0.16	0.05	AP SD 18M Animal 2	9325	25.50 ± 0.38	0.05
AP HD 18M Animal 3	7866	20.12 ± 0.18	0.05	AP SD 18M Animal 3	9841	26.92 ± 0.45	0.05
AP HD 18M Animal 4	5884	20.27 ± 0.28	0.05	AP SD 18M Animal 4	6521	19.09 ± 0.37	0.04
AP HD 18M Animal 5	5673	21.99 ± 0.79	0.05				
Mean	6316	20.29 ± 0.30	0.05	Mean	8541	23.34 ± 0.37	0.05
SD	940			SD	1459		
CV ²	0.022			CV ²	0.029		
CE ²	0.003			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.113			CE ² /CV ²	0.055		
CVB ²	0.020			CVB ²	0.028		
CVB ² (%CV ²)	88.71%			CVB ² (%CV ²)	94.51%		

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)

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

Lacunoso-Molecular - CA1							
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 6M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 6M Animal 1	9193	17.01 ± 0.26	0.05	AE SD 6M Animal 1	10693	16.39 ± 0.51	0.05
AE HD 6M Animal 2	16758	18.88 ± 0.6	0.04	AE SD 6M Animal 2	12452	16.65 ± 0.13	0.04
AE HD 6M Animal 3	11576	17.38 ± 0.49	0.05	AE SD 6M Animal 3	9412	17.68 ± 0.43	0.06
AE HD 6M Animal 4	10121	16.29 ± 0.26	0.04	AE SD 6M Animal 4	12567	17.23 ± 0.31	0.04
AE HD 6M Animal 5	8521	18.34 ± 0.2	0.06	AE SD 6M Animal 5	9828	16.78 ± 0.47	0.05
Mean	11234	17.58 ± 0.36	0.05	Mean	10991	16.95 ± 0.37	0.05
SD	3294			SD	1462		
CV ²	0.086			CV ²	0.018		
CE ²	0.002			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.019			CE ² /CV ²	0.090		
CVB ²	0.084			CVB ²	0.016		
CVB ² (%CV ²)	98.14%			CVB ² (%CV ²)	90.96%		
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 12M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 12M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 12M Animal 1	8496	19.86 ± 0.12	0.06	AE SD 12M Animal 1	8827	19.37 ± 0.52	0.05
AE HD 12M Animal 2	10019	16.96 ± 0.15	0.05	AE SD 12M Animal 2	6973	19.04 ± 0.76	0.05
AE HD 12M Animal 3	8133	20.41 ± 0.23	0.05	AE SD 12M Animal 3	11025	20.7 ± 0.46	0.05
AE HD 12M Animal 4	8551	18.83 ± 0.28	0.05	AE SD 12M Animal 4	10332	18.67 ± 0.34	0.05
AE HD 12M Animal 5	10089	14.41 ± 0.25	0.05	AE SD 12M Animal 5	9204	20.68 ± 0.83	0.06
Mean	9058	18.09 ± 0.21	0.05	Mean	9272	19.69 ± 0.58	0.05
SD	924			SD	1556		
CV ²	0.010			CV ²	0.028		
CE ²	0.003			CE ²	0.003		
CE ² /CV ²	0.240			CE ² /CV ²	0.089		
CVB ²	0.080			CVB ²	0.026		
CVB ² (%CV ²)	75.99%			CVB ² (%CV ²)	91.12%		
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 18M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 18M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 18M Animal 1	9786	23.18 ± 0.24	0.05	AE SD 18M Animal 1	19919	20.37 ± 0.14	0.05
AE HD 18M Animal 2	8659	21.96 ± 0.39	0.05	AE SD 18M Animal 2	8838	20.9 ± 0.56	0.05
AE HD 18M Animal 3	12596	20.48 ± 0.58	0.05	AE SD 18M Animal 3	12103	21.1 ± 0.58	0.05
AE HD 18M Animal 4	10223	21.73 ± 0.52	0.05	AE SD 18M Animal 4	7388	26.14 ± 0.38	0.06
AE HD 18M Animal 5	9974	21.98 ± 0.31	0.05	AE SD 18M Animal 5	6725	19.44 ± 0.3	0.06
Mean	10248	21.86 ± 0.41	0.05	Mean	9395	21.59 ± 0.39	0.05
SD	1443			SD	2508		
CV ²	0.020			CV ²	0.071		
CE ²	0.003			CE ²	0.003		
CE ² /CV ²	0.126			CE ² /CV ²	0.040		
CVB ²	0.017			CVB ²	0.068		
CVB ² (%CV ²)	87.39%			CVB ² (%CV ²)	95.99%		

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)

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

Radiatum - CA1							
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 6M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 6M Animal 1	8371	17.33 ± 0.34	0.04	AE SD 6M Animal 1	12881	16.37 ± 0.35	0.03
AE HD 6M Animal 2	12241	18.94 ± 0.87	0.03	AE SD 6M Animal 2	10412	16.9 ± 0.14	0.04
AE HD 6M Animal 3	13234	17.93 ± 0.43	0.04	AE SD 6M Animal 3	8516	17.66 ± 0.34	0.04
AE HD 6M Animal 4	13338	16.42 ± 0.33	0.03	AE SD 6M Animal 4	12868	17.63 ± 0.29	0.04
AE HD 6M Animal 5	7576	18.8 ± 0.22	0.05	AE SD 6M Animal 5	8076	17.04 ± 0.37	0.04
Mean	10952	17.88 ± 0.44	0.04	Mean	10551	17.12 ± 0.30	0.04
SD	2767			SD	2296		
CV ²	0.064			CV ²	0.047		
CE ²	0.001			CE ²	0.001		
CE ² /CV ²	0.014			CE ² /CV ²	0.019		
CVB ²	0.063			CVB ²	0.046		
CVB ² (%CV ²)	98.58%			CVB ² (%CV ²)	98.09%		
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 12M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 12M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 12M Animal 1	7449	19.87 ± 0.09	0.04	AE SD 12M Animal 1	9267	19.12 ± 0.52	0.04
AE HD 12M Animal 2	10121	17.16 ± 0.13	0.04	AE SD 12M Animal 2	8057	18.92 ± 0.66	0.04
AE HD 12M Animal 3	7343	20.64 ± 0.24	0.04	AE SD 12M Animal 3	9893	20.08 ± 0.19	0.04
AE HD 12M Animal 4	6895	18.59 ± 0.22	0.05	AE SD 12M Animal 4	10133	18.51 ± 0.25	0.04
AE HD 12M Animal 5	10370	17.26 ± 0.21	0.04	AE SD 12M Animal 5	8137	20.16 ± 0.99	0.04
Mean	8436	18.70 ± 0.18	0.04	Mean	9097	19.36 ± 0.52	0.04
SD	1668			SD	967		
CV ²	0.039			CV ²	0.011		
CE ²	0.002			CE ²	0.001		
CE ² /CV ²	0.041			CE ² /CV ²	0.080		
CVB ²	0.037			CVB ²	0.010		
CVB ² (%CV ²)	95.91%			CVB ² (%CV ²)	92.03%		
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 18M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 18M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 18M Animal 1	8256	22.24 ± 0.26	0.04	AE SD 18M Animal 1	12985	20.52 ± 0.20	0.03
AE HD 18M Animal 2	8922	21.58 ± 0.33	0.04	AE SD 18M Animal 2	8614	20.9 ± 0.34	0.04
AE HD 18M Animal 3	11665	20.26 ± 0.58	0.04	AE SD 18M Animal 3	9430	20.61 ± 0.71	0.04
AE HD 18M Animal 4	8799	21.3 ± 0.58	0.04	AE SD 18M Animal 4	7731	26.41 ± 0.29	0.05
AE HD 18M Animal 5	10482	21.69 ± 0.18	0.04	AE SD 18M Animal 5	8734	19.25 ± 0.41	0.04
Mean	9625	21.41 ± 0.39	0.04	Mean	9499	21.54 ± 0.39	0.04
SD	1409			SD	2040		
CV ²	0.021			CV ²	0.046		
CE ²	0.002			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.075			CE ² /CV ²	0.034		
CVB ²	0.020			CVB ²	0.045		
CVB ² (%CV ²)	92.54%			CVB ² (%CV ²)	96.62%		

EGENDA:

- 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)

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

Piramidal - CA1							
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 6M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 6M Animal 1	2628	17.35 ± 0.28	0.07	AE SD 6M Animal 1	4943	16.96 ± 0.2	0.06
AE HD 6M Animal 2	4845	19.17 ± 0.98	0.05	AE SD 6M Animal 2	4693	17.34 ± 0.23	0.06
AE HD 6M Animal 3	4315	19.12 ± 0.37	0.07	AE SD 6M Animal 3	3428	17.98 ± 0.3	0.06
AE HD 6M Animal 4	4460	16.97 ± 0.4	0.06	AE SD 6M Animal 4	3438	17.7 ± 0.41	0.06
AE HD 6M Animal 5	2904	19.33 ± 0.4	0.08	AE SD 6M Animal 5	3087	17.52 ± 0.45	0.07
Mean	3830	18.39 ± 0.49	0.06	Mean	3918	17.50 ± 0.05	0.06
SD	995			SD	839		
CV ²	0.068			CV ²	0.046		
CE ²	0.004			CE ²	0.004		
CE ² /CV ²	0.053			CE ² /CV ²	0.079		
CVB ²	0.064			CVB ²	0.042		
CVB ² (%CV ²)	94.67%			CVB ² (%CV ²)	92.14%		
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 12M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 12M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 12M Animal 1	1896	20.1 ± 0.17	0.08	AE SD 12M Animal 1	2224	18.63 ± 0.49	0.06
AE HD 12M Animal 2	3136	17.14 ± 0.24	0.05	AE SD 12M Animal 2	2089	19.11 ± 0.76	0.07
AE HD 12M Animal 3	1796	20.37 ± 0.29	0.08	AE SD 12M Animal 3	2288	19.54 ± 0.17	0.07
AE HD 12M Animal 4	2087	18.54 ± 0.31	0.07	AE SD 12M Animal 4	2655	18.61 ± 0.26	0.06
AE HD 12M Animal 5	2628	17.22 ± 0.2	0.06	AE SD 12M Animal 5	1924	19.64 ± 1.14	0.07
Mean	2309	18.67 ± 0.24	0.07	Mean	2236	19.11 ± 0.56	0.07
SD	563			SD	273		
CV ²	0.059			CV ²	0.015		
CE ²	0.004			CE ²	0.004		
CE ² /CV ²	0.061			CE ² /CV ²	0.242		
CVB ²	0.056			CVB ²	0.011		
CVB ² (%CV ²)	93.95%			CVB ² (%CV ²)	75.80%		
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 18M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 18M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 18M Animal 1	2538	21.88 ± 0.16	0.07	AE SD 18M Animal 1	3167	20.39 ± 0.35	0.05
AE HD 18M Animal 2	2862	21.35 ± 0.34	0.06	AE SD 18M Animal 2	2681	20.72 ± 0.20	0.06
AE HD 18M Animal 3	3672	19.97 ± 0.57	0.06	AE SD 18M Animal 3	3282	20.44 ± 0.76	0.06
AE HD 18M Animal 4	1839	20.7 ± 0.6	0.07	AE SD 18M Animal 4	2042	25.93 ± 0.36	0.07
AE HD 18M Animal 5	2864	21.53 ± 0.32	0.06	AE SD 18M Animal 5	1909	19.10 ± 0.35	0.06
Mean	2755	21.08 ± 0.4	0.06	Mean	2616	21.32 ± 0.4	0.06
SD	661			SD	629		
CV ²	0.058			CV ²	0.058		
CE ²	0.004			CE ²	0.004		
CE ² /CV ²	0.062			CE ² /CV ²	0.064		
CVB ²	0.054			CVB ²	0.054		
CVB ² (%CV ²)	93.75%			CVB ² (%CV ²)	93.62%		

• = Média número de astrócitos por grupo

• = Desvio padrão

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

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

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

Oriens - CA1							
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 6M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 6M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 6M Animal 1	6251	17.75 ± 0.63	0.05	AE SD 6M Animal 1	8268	16.61 ± 0.3	0.04
AE HD 6M Animal 2	7509	19.87 ± 0.96	0.05	AE SD 6M Animal 2	7527	16.8 ± 0.19	0.05
AE HD 6M Animal 3	6647	18.47 ± 0.48	0.06	AE SD 6M Animal 3	5696	18.01 ± 0.2	0.05
AE HD 6M Animal 4	7878	16.64 ± 0.1	0.04	AE SD 6M Animal 4	8995	17.94 ± 0.31	0.04
AE HD 6M Animal 5	4701	19.14 ± 0.28	0.06	AE SD 6M Animal 5	4921	17.76 ± 0.56	0.06
Mean	6597	18.37 ± 0.49	0.05	Mean	7082	17.42 ± 0.31	0.05
SD	1244			SD	1721		
CV ²	0.036			CV ²	0.059		
CE ²	0.003			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.070			CE ² /CV ²	0.027		
CVB ²	0.033			CVB ²	0.057		
CVB ² (%CV ²)	92.97%			CVB ² (%CV ²)	97.29%		
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 12M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 12M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 12M Animal 1	6767	20.3 ± 0.17	0.06	AE SD 12M Animal 1	8033	19.87 ± 0.52	0.05
AE HD 12M Animal 2	7131	17.5 ± 0.72	0.05	AE SD 12M Animal 2	5603	19.63 ± 0.87	0.05
AE HD 12M Animal 3	5257	20.95 ± 0.35	0.05	AE SD 12M Animal 3	7768	20.15 ± 0.35	0.05
AE HD 12M Animal 4	5707	19.34 ± 0.34	0.05	AE SD 12M Animal 4	7452	18.56 ± 0.25	0.05
AE HD 12M Animal 5	7240	17.44 ± 0.19	0.04	AE SD 12M Animal 5	6160	20.02 ± 1.08	0.05
Mean	6420	19.11 ± 0.35	0.05	Mean	7003	19.65 ± 0.61	0.05
SD	889			SD	1063		
CV ²	0.019			CV ²	0.023		
CE ²	0.003			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.130			CE ² /CV ²	0.069		
CVB ²	0.017			CVB ²	0.021		
CVB ² (%CV ²)	86.96%			CVB ² (%CV ²)	93.05%		
Ambiente Enriquecido - Hard Diet / 18M				Ambiente Enriquecido - Soft Diet / 18M			
Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)	Sujeitos	N	Espessura (µm)	CE (Scheaffer)
AE HD 18M Animal 1	5800	22.49 ± 0.21	0.05	AE SD 18M Animal 1	9741	21.16 ± 0.31	0.04
AE HD 18M Animal 2	7608	21.91 ± 0.33	0.05	AE SD 18M Animal 2	6994	21.67 ± 0.39	0.05
AE HD 18M Animal 3	9527	20.92 ± 0.62	0.05	AE SD 18M Animal 3	6311	20.80 ± 0.90	0.05
AE HD 18M Animal 4	6992	20.29 ± 0.53	0.05	AE SD 18M Animal 4	7337	27.05 ± 0.33	0.06
AE HD 18M Animal 5	7783	22.13 ± 0.2	0.05	AE SD 18M Animal 5	6888	19.89 ± 0.48	0.05
Mean	7542	21.75 ± 0.38	0.05	Mean	7454	21.11 ± 0.48	0.05
SD	1355			SD	1330		
CV ²	0.032			CV ²	0.032		
CE ²	0.002			CE ²	0.002		
CE ² /CV ²	0.050			CE ² /CV ²	0.077		
CVB ²	0.031			CVB ²	0.029		
CVB ² (%CV ²)	95.04%			CVB ² (%CV ²)	92.31%		

LEENDA:

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 A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER BIO004-09

Projeto: Alteração da atividade mastigatória e declínio cognitivo em modelo murino de senescência

Coordenador: Prof. Dra. Marcia Consentino Kronka

Área Temática: Biologia/Neurociências

Vigência: 03/2008 a 03/2011

Nº no CEPAE-UFPA: BIO004-09

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 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação 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, 17 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa
Com Animais de Experimentação da Universidade
Federal do Pará