



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

**ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ASTRÓCITOS E DE REDES PERINEURONAIS DE
CA1, CA2, CA3 DO MACACO PREGO (*Cebus apella*) UTILIZANDO O
FRACIONADOR ÓPTICO.**

MAYRA HERMÍNIA SIMÕES HAMAD FARIAS DO COUTO

Belém
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MAYRA HERMÍNIA SIMÕES HAMAD FARIAS DO COUTO

ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ASTRÓCITOS E DE REDES PERINEURONAIS DE CA1, CA2, CA3 DO MACACO PREGO (*Cebus apella*) UTILIZANDO O FRACIONADOR ÓPTICO.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

Belém
2010

MAYRA HERMINIA SIMÕES HAMAD FARIAS DO COUTO

**ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ASTRÓCITOS E DE REDES PERINEURONIAIS DE
CA1, CA2, CA3 DO MACACO PREGO (*Cebus apella*) UTILIZANDO O
FRACIONADOR ÓPTICO.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como Requisito para a Obtenção do Grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Defendido e aprovado em: ____/____/____

Conceito: _____

Banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Cristovam W. Picanço Diniz
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Lucidia Fonseca Santiago
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof. Dra. Emiliania Guerra da Rocha
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Dedico este trabalho científico a minha filha Mayte, meu marido Marcelo e minha mãe Alda, pelo amor, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela vida e força nas etapas dessa jornada. Agradeço a todos que me auxiliaram e incentivaram, estando presentes nessa caminhada, principalmente ao meu orientador Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço-Diniz, um exemplo de sabedoria, que inspira a todos que cruzam seu caminho com enorme conhecimento e vivência, tendo paciência e dando oportunidade aqueles que tão pouco sabem e tanto almejam por conhecimento. Agradeço a pessoas indispensáveis no início desse trabalho como Carlos Santos, Renata Reis, Roseane Oliveira, João Bento, Marina Almeida e Lane, bem como aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Neurodegeneração e Infecção, pela troca de experiência e apoio.

Agradeço a realização desse trabalho também pela oportunidade de encontrar uma amiga verdadeira, Roberta Bentes, que ao longo dos percalços, sempre foi bem mais que meu ombro amigo, uma pessoa especial de um grande coração, sendo uma companheira que espero guardar para toda a vida.

A minha filha Mayte, que mesmo sem saber, foi uma grande incentivadora. Ao meu marido Marcelo, pelas noites de compreensão com minha ausência e apoio incontestável. A minha mãe Alda, pelo amor infinito e dedicação absoluta. E a todos que participaram direta e indiretamente dessa conquista, minha irmã Mayara, meu pai João Jorge e a família de meu marido.

RESUMO

Investigações anatômicas usando métodos estereológicos para quantificar astrócitos e redes perineuronais no hipocampo de primatas do Novo Mundo não estão disponíveis. O objetivo do presente trabalho é quantificar a distribuição laminar dos astrócitos e das redes perineuronais em CA1, CA2 e CA3 do *Cebus apella* por método sem viés baseado em estereologia. Os animais foram sacrificados e perfundidos com fixadores aldeídicos e tiveram seus cérebros cortados serialmente, paralelo ao plano coronal. Secções alternadas foram imunoreagidas para a proteína fibrilar ácida glial (GFAP) ou reagidas para detecção histoquímica dos sítios de ligação da lectina *Wisteria floribunda* biotinizada e contracoradas pelo cresil violeta. Empregamos o método do fracionador óptico para estimar o número de astrócitos e de redes perineuronais do hipocampo do macaco prego. A análise das estimativas dos astrócitos tendo em conta o volume de cada camada em cada região revelou que independentemente da área, é a camada piramidal a que mais concentra esses elementos. Por outro lado a contagem do número total de redes perineuronais limitada às camadas piramidal e oriens dos campos hipocampais revelou que CA2 é a região que de longe concentra o maior número de redes com 3 vezes mais do que o encontrado em CA1 ou CA3. Nós sugerimos que diferente do encontrado no giro denteado as camadas de grande concentração de corpos celulares neuronais concentra os números mais altos de astrócitos e de redes perineuronais. Permanecem por serem investigadas as implicações funcionais de tal distribuição.

Palavras-chave: Astrócitos, redes perineuronais, Hipocampo, *Cebus apella*.

ABSTRACT

Anatomical stereological investigations of perineuronal nets and astrocytes of the hippocampus have not been done in New World primates. The aim of the present study is to quantify the laminar distribution of the astrocytes and perineuronal nets of CA1, CA2 and CA3 of the Cebus monkey (*Cebus apella*) by stereological based unbiased method. Subjects were sacrificed and perfused with aldehyde fixatives and had their brains cut parallel to the coronal plane. Alternated coronal series of sections were immunoreacted for glial fibrillary acid protein (GFAP) or lectin histochemical stained with *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) counterstained by cresyl violet. We have used the optical fractionator method to estimate the number of astrocytes and perineuronal nets in the hippocampus of the Cebus monkey. The laminar distribution of astrocytes relatively to the layer volumes revealed an asymmetric pattern of distribution with the highest number of them in the pyramidal layer whereas perineuronal nets estimations revealed a higher concentration in the oriens and pyramidal layer. We suggest that the layers that concentrate neuronal cell bodies also concentrate perineuronal nets and astrocytes. It remains to be investigated the functional implications of these pattern of distribution.

Key-words: Astrocytes, perineuronal nets, Hippocampus, *Cebus apella*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros experimentais e resultados da contagem de redes perineuronais (ΣQ^-) em CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de quatro exemplares de <i>Cebus apella</i> utilizando o fracionador óptico ⁽¹⁾	40
Tabela 2	Estimativa de volumes planimétricos unilaterais individuais do hipocampo do <i>Cebus apella</i> , espessura das secções e estimativas numéricas totais de redes perineuronais na camada Piramidal e Oriens.....	42
Tabela 3	Estimativas numéricas da contagem de redes perineuronais (ΣQ^-) para os tipos 1 e 2 em CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de quatro exemplares de <i>Cebus apella</i> utilizando o fracionador óptico(1).....	44
Tabela 4	Parâmetros experimentais e resultados da contagem de astrócitos (ΣQ^-) em CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de quatro exemplares de <i>Cebus apella</i> utilizando o fracionador óptico ⁽¹⁾	49
Tabela 5	Estimativas de volumes planimétricos unilaterais individuais do hipocampo do <i>Cebus apella</i> , estimativas numéricas e de espessura correspondentes de astrócitos.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Três tipos de redes perineuronais demonstrado pela marcação de imunoflorescência de wisteria floribunda aglutinina (WFA) no córtex parietal de ratos, setas mostram marcação em dendritos.....	18
Figura 2	Fotomicrografia ilustrando a posição relativa do hipocampo em relação às estruturas anatômicas circunvizinhas em uma secção coronal rostral corada com a lectina <i>Wisteria floribunda</i> e contracorada com cresil violeta, marcando redes perineuronais Escala: 5mm.....	31
Figura 3	Fotomicrografia em 3.2X de uma secção coronal rostral (A), intermediária (B) e caudal (C) corada com lectina <i>Wisteria floribunda</i> e contracorada com cresil violeta. As setas indicam o limite de CA2 distinguido dos outros campos hipocampais pela marcação mais intensa. Notar laminação bem diferente no giro denteado (DG) quando comparada a do Corno de Amon. Escala: 5mm.....	33
Figura 4	Fotomicrografia em 3.2X de uma secção coronal rostral (D) corada com lectina <i>Wisteria floribunda</i> e contracorada com cresil violeta. Inserções com aumento de 10X de CA1 (A), CA2 (B) e CA3 (C). Escala em D: 500 µm e escala em A-C 25 µm.....	34
Figura 5	Fotomicrografia em grande aumento de uma secção coronal rostral de CA1 reagida histoquimicamente para a lectina <i>Wisteria floribunda</i> e contracorada com cresil violeta. A seta branca aponta para uma rede do tipo 2 e o asterisco identifica rede do tipo 1. A cabeça de seta branca aponta para uma célula glial e as duplas setas pretas para neurônios. Escala: 25 µm.....	36
Figura 6	Fotomicrografia em 60X de uma secção coronal rostral de CA1 reagida histoquimicamente para a lectina <i>Wisteria floribunda</i> e	37

contracorada com cresil violeta, ilustrando uma rede perineuronal do tipo 1. Escala: 25 μm

- Figura 7 Fotomicrografia em 60X de uma secção coronal rostral de CA1 reagida histoquimicamente para a lectina *Wisteria Floribunda* e contracorada com cresil violeta, mostrando a rede perineuronal do tipo 2. Escala: 25..... 38
- Figura 8 Fotomicrografia em 60X de uma secção coronal rostral de CA1 reagida histoquimicamente para a lectina *Wisteria floribunda* e contracorada com cresil violeta, ilustrando a rede perineuronal do tipo 3. Escala: 25 μm 38
- Figura 9 Fotomicrografia em 3.2X de uma secção coronal rostral (C) corada com GFAP marcando astrócitos. Fotomicrografias com objetiva de 40X do mesmo corte no stratum piramidale de CA1 (A) e CA3-CA2 (B) e no stratum radiatum de CA1 (D) e CA3-CA2 (E). Escala em C: 250 μm e escala em A,B,D e E 25 μm 46
- Figura 10 Fotomicrografia em 60X obtidas a partir de secções imunomarcadas para GFAP marcando astrócitos e contracorada com Nissl para ilustrar um neurônio no stratum radiatum de CA3 em diferentes focos. Escala: 25 μm 47

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. O Hipocampo de Primatas Não Humanos.....	12
1.2. O Hipocampo do <i>Cebus apella</i>	14
1.3. Astroglia no Sistema Nervoso Central.....	15
1.4. A Matriz Extracelular no Sistema Nervoso Central (SNC).....	16
1.5. Estereologia.....	19
1.6.O Fracionador Óptico.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Processamento do tecido.....	24
3.2. Coloração.....	25

3.2.1. Imunohistoquímica para revelação de astrócitos.....	25
3.2.2. Histoquímica para revelação das redes perineuronais.....	26
3.3. Estereologia.....	27
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Redes Perineuronais.....	30
4.1.1. Análises Qualitativas.....	30
4.1.2. Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico.....	39
4.2. Astrócitos.....	45
4.2.1. Análises Qualitativas	45
4.2.2. Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico.....	47
4.3. Análise Quantitativa Comparada da Distribuição de Redes Perineuronais e Astrócitos.....	54
5. DISCUSSÃO.....	54
5.1. Células Gliais no Hipocampo do <i>Cebus apella</i>	54
5.2. Redes Perineuronais do Hipocampo do <i>Cebus apella</i>	56
5.3. Proporções Neurônio/Glia no Hipocampo e Habilidades Cognitivas.....	57
5.4. Limitações Técnicas não Estereológicas.....	58
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

ESTIMATIVA DO NÚMERO DE ASTRÓCITOS E DE REDES PERINEURONIAIS DE CA1, CA2, CA3 DO MACACO PREGO (*Cebus apella*) UTILIZANDO O FRACIONADOR ÓPTICO.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Hipocampo de Primatas Não Humanos.

A formação hipocampal de primatas não humanos é localizada inteiramente no lobo temporal com a parte mais rostral da formação hipocampal começando rostromedialmente no uncus do lobo temporal medial. Na parte caudal, a formação hipocampal se estende dentro do átrio do ventrículo lateral. Andando em direção antero-posterior observamos o corpo principal do hipocampo e podemos dividi-lo em anterior, medial e posterior. A região posterior é continua com o núcleo pulvinar inferior e lateral e constitui aproximadamente o terço caudal do corpo principal. O corpo medial é contínuo com o núcleo geniculado lateral e constitui o terço medial do corpo principal. O corpo anterior é continuo com o trato ótico e com o hipocampo uncal e constitui o terço rostral do corpo principal e em seus primeiros cortes podemos identificar o uncus (Rosene, 1987; Amaral, 2007).

O uso do termo hipocampo propriamente dito é restrito à faixa estreita de neurônios piramidais que Ramón y Cajal referiu como contendo uma região inferior e superior e que Lorente de Nó (1934) dividiu em Cornos de Ammon (1- 4) CA1, CA2, CA3 e CA4. Já o termo formação hipocampal é usado para designar todo o allocórtex (arquicórtex) dentro da saliência ondulada genericamente definida como hipocampo, incluindo o giro denteado ou fascia dentata, o hipocampo propriamente dito (CA1 a CA4) e o subículo (incluindo pró-subículo). Essa subdivisão foi feita com a impregnação de Golgi, identificando um único tipo de célula, no entanto, com a coloração de Nissl foi observada a mesma subdivisão. O limite entre as camadas piramidais são mais oblíquos que perpendiculares, resultando no deslocamento horizontal do tipo celular e sua superposição às camadas vizinhas que caracteriza as regiões de transição entre as diferentes subregiões hipocampais (Rosene, 1987; Amaral, 2007).

O termo formação hipocampal engloba áreas distintas devido a quatro

características compartilhadas. Primeira: todas essas áreas são um tipo simples de córtex, o allocórtex e são comprimidas em apenas três camadas corticais: uma camada plexiforme superficial contendo dendritos, axônios, glia e poucos neurônios dispersos; uma camada celular proeminente situada mais profundamente com células granulares no giro denteado e células piramidais no CA e no subículo; uma camada polimórfica contendo dendritos e axônios assim como neurônios dispersos polimórficos. Segunda: todas essas áreas recebem inputs aferentes diretos das áreas perialocorticais adjacentes, assim como terminais axonais na parte mais superficial da camada molecular. Terceira: essas áreas são ligadas juntas por um grupo serial de conexões intrínsecas começando no giro denteado e terminando no subículo na transição com o córtex do pré-subículo. Quarta: todas as suas subdivisões exibem uma organização laminar de aferentes intrínsecos e extrínsecos que são altamente segregados (com pouca sobreposição). Por tudo isso, as áreas perialocorticais adjacentes como pré-subículo, parasubículo e entorrinal constituem diferenças morfológicas distintas embora alguns autores costumem incluí-las na formação hipocampal. Assim, o termo formação hipocampal tem sido reservado para todas as áreas com as três camadas do arquicórtex no lobo temporal medial: giro denteado, hipocampo propriamente dito (CA) e subículo (Rosene, 1987; Amaral, 2007).

O principal input do hipocampo e do giro denteado tem origem no córtex entorrinal, na região septal e no hipocampo contralateral. Também existem aferentes importantes, no entanto menos numerosos, oriundos de outras regiões incluindo o tronco cerebral, hipotálamo, tálamo e amígdala. As áreas de associação são as fontes mais importantes das aferências do córtex entorrinal, e estas em geral provem de córtices associativos polimodais ou supramodais. O hipocampo é as vezes considerado como uma das mais complexas áreas de associação multimodal, parcialmente porque este recebe e integra informação de todas as modalidades sensoriais (Swanson, 1983).

Dados experimentais e clínicos derivados de primatas humanos e não humanos sugerem que o hipocampo é um componente essencial do sistema neural responsável por aprendizado e memória. Muito do trabalho realizado até então sobre o hipocampo dos primatas não humanos foi feito em macacos do Velho Mundo e o macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), tem sido a espécie de escolha para a maioria dos

estudos experimentais por sua similaridade neuroanatômica e cognitiva com os humanos (Gallagher and Rapp, 1997; Squire et al., 2004; Amaral, 2007; Murray et al., 2007). Entretanto permanece limitada ao Rhesus a informação anatômica e funcional necessária à interpretação dos mecanismos associados às funções cognitivas. Até recentemente o número de unidades neuronais no hipocampo e giro denteado só era conhecido para aquela espécie (Keuker et al., 2003; Amaral, 2007; Christensen et al., 2007; Jabes et al., 2010) não havendo, entretanto nenhuma estimativa estereológica empregando marcadores seletivos. Em primatas do Novo Mundo o cenário é ainda mais limitado havendo apenas duas publicações utilizando estereologia estimando o número de neurônios do giro denteado no *Calitrix jachus* (Kozorovitskiy et al., 2005) e no *Cebus apella* (Diniz et al., 2010; Guerreiro-Diniz et al., 2010). No que concerne ao número de astrócitos e redes perineuronais, foco do presente trabalho não há uma única referência disponível. Isso torna o esforço dedicado a essas estimativas realizado no presente trabalho na espécie *Cebus apella* relevante e único, sendo a presente dissertação a primeira dedicada a essas questões em uma espécie de primata do Novo Mundo.

1.2. O Hipocampo do *Cebus apella*

O *Cebus apella* é um primata do Novo Mundo, sul americano, utilizado frequentemente como modelo em uma variedade de ensaios comportamentais, incluindo tarefas cognitivas hipocampo-dependentes (Tavares et al., 2002; Resende et al., 2003; Dufour et al., 2006; VanMarle et al., 2006; Spinozzi et al., 2007). É também utilizado em estudos anatômicos que incluem a formação hipocampal e.g. (Eidelberg and Saldias, 1960; Manocha, 1968; Girgis, 1973; Kordower et al., 1988; Mufson et al., 1994) embora nenhum desses estudos tenha se dedicado a estimar o número de astrócitos, neurônios ou de redes perineuronais do hipocampo ou do giro denteado utilizando marcadores seletivos.

Em estudo prévio em nosso laboratório descreveu-se a cito- e a mieloarquitectura empregando as técnicas de Nissl e Gallyas, assim como a arquitetura histoquímica do hipocampo e do giro denteado. Para esta última empregou-se um marcador dos elementos da matriz extracelular (a lectina *Wisteria floribunda* biotinilada) e um ensaio enzimático para localização da atividade histoquímica da NADPH-diaforase

(Guerreiro-Diniz et al., 2010). Nesse estudo estimou-se igualmente o número de neurônios empregando marcador seletivo para neurônios (NeuN) comparando os resultados com os números de neurônios e células da glia estimados a partir da coloração de Nissl.

A organização estrutural do hipocampo do *Cebus apella* (Guerreiro-Diniz et al., 2010; Guerreiro-Diniz, 2010) é bastante similar àquela descrita para o Rhesus (Rosene, 1987; Amaral, 2007) compreendendo os Cornos de Amon 1, 2 e 3, o subiculum e o prosubiculum. Como esperado o hipocampo propriamente dito do *Cebus apella* apresenta organização tri-laminar típica do allocórtex que inclui uma camada principal designada como camada de células piramidais de CA1, CA2 e CA3.

As células piramidais em CA1 e CA3 aparecem mais intensamente empacotadas (contornos celulares mais nítidos) do que aquelas de CA2. Também é bastante evidente que as piramidais de CA3 são menos organizadas (disposição laminar mais dispersas) do que as de CA1 e CA2. Na borda com a região prosubicular o limite é distinguido no ponto onde a condensação de células piramidais observada em CA1 é substituída pela distribuição mais larga das células da região prosubicular que ocupam toda a extensão da única camada do prosúbiculo que é mais espessa do que aquelas de CA1 (Guerreiro-Diniz et al., 2010; Guerreiro-Diniz, 2010).

Os cornos de Amon, entretanto se distinguem um do outro mais facilmente através das características da matriz extracelular reveladas pela histoquímica para *Wisteria floribunda* biotinilada. As diferenças no padrão de coloração da neurópila entre os campos hipocámpais CA1, CA2, CA3 e o prosubiculum foram conspícuas permitindo prontamente a definição dos limites histoarquitetônicos. Em CA2 a intensidade da marcação da neurópila foi claramente maior do que nas áreas vizinhas (CA1 e CA3). O prosubiculum e a região subicular apresentaram numerosas redes perineuronais intensamente marcadas e marcação moderada da neurópila enquanto que a neurópila de CA1 e CA3 revelou-se menos marcada do que as redes perineuronais (Guerreiro-Diniz et al., 2010).

1.3. Astroglia no Sistema Nervoso Central.

Os astrócitos são as células gliais mais numerosas do hipocampo e a eles

tem se associado uma variedade de papéis funcionais contribuindo para a formação, adaptação e operação dos circuitos neurais. Em uma única frase, os astrócitos permitem que os neurônios funcionem fornecendo energia e substratos para a neurotransmissão contribuindo diretamente para a formação e modulação das sinapses através de mecanismo bidirecional de comunicação com os neurônios (Allen and Barres, 2009).

Os astrócitos, portanto são hoje considerados elementos ativos no circuito cerebral integrando a sinalização neuronal e exibindo excitabilidade Ca^{2+} -dependente. Essa sinalização através de correntes de Ca^{2+} em astrócitos ativado pode desencadear a liberação de muitas moléculas neuroativas, chamadas gliotransmissores, como o glutamato, ATP e d-serinas, que podem modular a excitabilidade neuronal, a atividade sináptica e plasticidade. Além disso, os astrócitos contribuem para o controle do fluxo sanguíneo cerebral, para constituição da barreira hemato-encefálica e para a resposta imune à agentes agressores (Wang and Bordey, 2008).

Mais recentemente emergiu o conceito de redes astrogliais para comunicação a longa distância associando os astrócitos à redes de conexão organizadas que permitem a troca de informações reguladas por sinais intra e extracelulares, através de canais que atravessam junções em fenda (do inglês “gap junctions”). Essa comunicação a longa distância entre células da glia modulando a atividade sináptica neuronal e contribuindo diretamente para a plasticidade sináptica adicionou nova dimensão de complexidade a análise das funções cerebrais (Giaume et al., 2010).

Até o presente não há, entretanto nenhum ensaio quantitativo em primatas do Novo Mundo que tenha descrito a distribuição laminar dessas células no hipocampo sendo, portanto relevante preencher essa lacuna. O presente trabalho é a primeira descrição quantitativa e qualitativa da distribuição laminar dos astrócitos em um primata neotropical o *Cebus apella* sendo essa informação essencial para o reconhecimento da distribuição potencial de redes astrogliais no hipocampo dessa espécie.

1.4. A Matriz Extracelular no Sistema Nervoso Central (SNC)

A matriz extracelular (MEC) do SNC apresenta um complexo altamente

organizado de macromoléculas fibrilares e não fibrilares que se localizam ao redor dos vasos sanguíneos, das células gliais e dos neurônios. O acúmulo de moléculas de MEC ao redor de certos neurônios forma as redes perineuronais (RPs)(Celio and Blumcke, 1994; Celio et al., 1998). As RPs são compostas por vários proteoglicanos sulfato de condroitina (PSCs) e ácido hialurônico, estão ao redor do soma neuronal e dos dendritos proximais formando estruturas semelhantes à redes em distintas populações de neurônios do cérebro (Celio et al., 1998; Yamaguchi, 2000; Rhodes and Fawcett, 2004). Elas separam botões sinápticos vizinhos (Bruckner et al., 1993; Koppe et al., 1997; Hagihara et al., 1999). 2007) e estão interpostas entre a superfície das células neuronais e processos astrocíticos adjacentes (Bruckner et al., 1993; Blumcke et al., 1995). As PSCs são capazes de se ligar a fatores neurotróficos, proteases e seus inibidores, tendo provavelmente um papel na regulação trófica do microambiente dos neurônios (Celio and Blumcke, 1994; Sugahara et al., 2003).

Essas RPs contribuem de forma positiva para criar um microambiente ao redor dos neurônios (Hockfield et al., 1990; Bruckner et al., 1993; Hartig et al., 1999), sendo formadas durante o desenvolvimento cerebral pós-natal com seus padrões variando de acordo com a região (Koppe et al., 1997; Bruckner et al., 2000) e em paralelo com a sinaptogênese e a maturação funcional das células (Hockfield et al., 1990). Estão envolvidas também no tamponamento de íons, no desenvolvimento, estabilização e remodelagem das sinapses assim como na regulação do microambiente neuronal particularmente ao redor de neurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos no córtex cerebral (Hartig et al., 1999; Baig et al., 2005).

Histologicamente é possível identificar três tipos de matriz no SNC. A primeira é uma matriz difusa que existe em todo SNC. A segunda é definida por moléculas da matriz associada à superfície da célula. A terceira é a matriz organizada em densas redes perineuronais (Deepa et al., 2006).

As redes perineuronais ainda são caracterizadas em três tipos distintos, as redes do tipo 1, 2 e 3, que variam com suas características morfológicas. As redes do tipo 1 tem contorno nítido associado com neurônios não piramidais mostrando uma morfologia “basket cell-like” (células em cesta), a estrutura como uma treliça é vista distintamente ao redor do corpo celular, parte proximal dos dendritos e no segmento inicial dos axônios de neurônios “não-piramidais”. As redes do tipo 2 estão ao redor

de células piramidais, a delicada estrutura e a baixa marcação de intensidade são aspectos característicos das redes “piramidais”. As redes do tipo 3 não possuem um contorno morfológico claro, são altamente marcadas com *Wisteria floribunda*, são difusas ao redor do corpo celular neural e da parte proximal do dendrito, no entanto, a morfologia somatodendrítica das redes difusas são mais variáveis e seus contornos como “cotton wool-like” (malha de algodão) de matriz extracelular ao redor do soma são mais densos, como visto na figura 1 (Wegner et al., 2003).

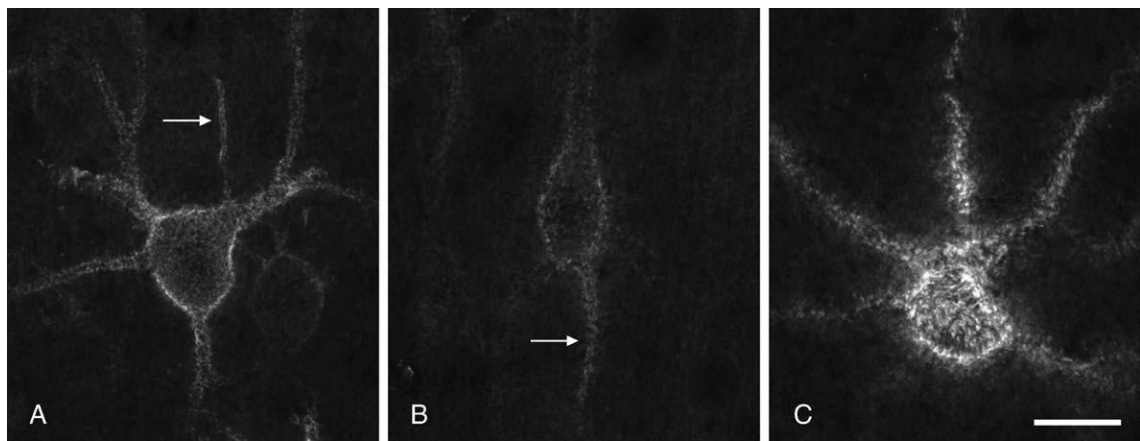


Figura 1- três tipos de redes perineuronais demonstrado pela marcação de imunofluorescência de wisteria floribunda aglutinina (WFA) no córtex parietal de ratos, setas mostram marcação em dendritos. Escala de 20µm (Wegner et al., 2003)

No cérebro do adulto, a matriz extracelular está presente principalmente nos espaços intercelulares, entre as células gliais e neuronais e a maior parte dessa matriz é amorfa. A estrutura especializada de matriz densa chamada de rede perineuronal está ao redor de alguns neurônios nos locais de contato sináptico (Deepa et al., 2006). A rede perineuronal com grande diversidade molecular forma a matriz extracelular de muitos neurônios no sistema nervoso central, rodeando o corpo celular do neurônio e seus dendritos proximais em uma estrutura entrelaçada com um orifício aberto no local do contato sináptico (Hockfield and McKay, 1983; Zaremba et al., 1989; Matthews et al., 2002).

Durante o desenvolvimento do cérebro a matriz extracelular desempenha um papel de adesão celular, migração celular e direcionamento axonal, no cérebro de adulto conferindo estabilização às conexões neuronais e determina a plasticidade neural madura do sistema nervoso central (SNC). A rede perineuronal é primeiramente detectada na fase tardia do desenvolvimento, como um circuito sináptico maduro e estável do SNC. Embora ainda se discuta sua composição e função as redes parecem desempenhar papel importante no reconhecimento do alvo

e da formação sináptica (Matthews et al., 2002).

A matriz extracelular é rica em proteoglicanos, ácido hialurônico (AH) e tenascinas. Existem evidências de que os componentes da matriz extracelular, como proteoglicanos sulfato condroitina versican, brevican, neurocan, aggrecan, fosfacan, AH, tenascin-c, tenascina C e R e ligantes de proteína estão envolvidos na regulação da plasticidade neuronal, na neuroproteção e em suporte da homeostase iônica ao redor da alta ativação neuronal (Deepa et al., 2006).

Trabalhos prévios mostraram que as lectinas estão envolvidas na manutenção de potenciais de longa duração da expressão em inglês “long-term potentiation” (LTP), fenômeno esse relacionado à plasticidade sináptica em diversas regiões do SNC (Faissner et al., 2010). Realmente, após a produção pelos astrócitos os componentes da matriz integram a formação das redes e estas parecem essenciais para que os eventos estruturais relacionadas à formação de novas sinapses e estabilização das existentes ocorram (Gogolla et al., 2009; Faissner et al., 2010).

Em estudo prévio descrevemos a distribuição qualitativa das redes perineuronais no hipocampo do *Cebus apella* permanecendo por ser analisada sua distribuição laminar quantitativa empregando técnicas estereológicas sem viés (Guerreiro-Diniz et al., 2010). No presente trabalho pretendemos preencher essa lacuna analisando quantitativamente a distribuição espacial dessas redes no hipocampo do *Cebus apella* empregando a técnica do fracionador óptico.

1.5. Estereologia

Embora haja um conjunto notável de estudos dedicados a revelar aspectos morfológicos, fisiológicos e comportamentais associados à formação hipocampal dos primatas, tanto em condições normais como em alteradas, não há esforço sistemático para investigar o número de elementos celulares que compõem àquela região, empregando estimativas sem viés. Quando se fala de estimativas sem viés no contexto da contagem de elementos de interesse em uma dada região, estamos nos referindo a um capítulo da estatística espacial denominada estereologia, que permite a realização de análises quantitativas de estruturas tridimensionais, a partir da reconstrução serial de estruturas bidimensionais (Weibel, 1989). Dado que neste trabalho estima-se o número de células empregando o fracionador óptico, é

interessante rever, ainda que superficialmente, suas bases conceituais. A regra geral em análises qualitativas é encontrar palavras descritivas tais como menores, maiores, mais largas, menos freqüentes, mais freqüentes, diferente, similar, ausência ou presença que em geral são suficientes para os propósitos investigados (Schmitz and Hof, 2005). Entretanto, outros estudos que geram análises quantitativas e expressam valores numéricos sobre contagem de células, densidades, áreas e volumes apresentam resultados controversos que se devem à suposições prévias acerca do tecido, da geometria das células e de suas distribuições no plano da secção (Geinisman et al., 1995; Mayhew, 1996). Esses estudos quantitativos eventualmente introduzem vieses de amostragem e/ou erros sistemáticos, cuja magnitude é impossível de ser apreciada, qualquer que seja a resolução da análise: óptica (Mayhew, 1996; Gardella et al., 2003; Mandarim-de-Lacerda, 2003), confocal (Peterson, 1999; Kubinova and Janacek, 2001) ou eletrônica (Fiala and Harris, 2001; Nyengaard and Gundersen, 2006).

A análise microscópica, em qualquer nível, é uma ferramenta analítica poderosa para se descrever formas normais e anormais de tecidos biológicos, particularmente se for possível gerar números a partir de secções histológicas. Entretanto é necessário considerar que, se um microscópio é utilizado para analisar a estrutura de interesse, é inevitável, na maioria dos experimentos, que apenas uma pequena fração da área de interesse original será de fato analisada em detalhe (Schmitz and Hof, 2005). Para contornar tais vieses amostrais, empregam-se técnicas estereológicas que estimam o número total dos objetos contidos em uma dada região de interesse através de coleta de informação aleatória e sistemática, multiplicando-se o número de elementos de interesse registrados pelos valores de probabilidade da amostra (West, 2002).

O termo *sem viés* é utilizado para definir sistemas de amostragem que são independentes das propriedades do tecido, onde as dimensões da sonda amostral (caixa de contagem) e os parâmetros amostrais a ela associados (número e intervalo entre elas) são definidos *a priori*, desprezando-se a coleta de dados acerca do tamanho, forma e orientação espacial da área a ser investigada (Glaser and Glaser, 2000). Assim, os números estimados a partir da amostragem podem ser expressos em valores relativos ou absolutos indicando volume, número, conectividade, distribuição espacial e tamanho das estruturas biológicas, sem

conhecimento prévio da geometria das células ou do tecido a ser investigado e.g. (Glaser and Glaser, 2000; West, 2002; Schmitz and Hof, 2005).

Dentre todos os procedimentos utilizados para estimar o número total de objetos de interesse dentro de uma determinada região ou camada, o fracionador óptico é o que tem sido usado com mais frequência, pois combina as propriedades da sonda tri-dimensional para contagem dos elementos de interesse (o dissector óptico) com o sistema de amostragem sistemática e aleatória (o fracionador), removendo vieses amostrais e pressuposições (West et al., 1991). Essa metodologia foi adotada no presente trabalho e sua utilização para fins práticos é descrita a seguir.

1.6. O Fracionador Óptico

Para estimar o número de células dentro de um volume específico, usando investigação estereológica sem viés, a estereologia utiliza caixas de contagem virtuais (sondas estereológicas) aplicadas a uma série ordenada de secções histológicas obtidas das regiões de interesse. É possível seccionar opticamente as secções histológicas usando objetivas de grande abertura numérica para produzir imagens de baixa profundidade de foco. O plano de foco (ou secção óptica) pode ser deslocado, através de distâncias conhecidas, ao longo da espessura da secção, produzindo planos de foco contínuos através dos quais a contagem é feita de acordo com as regras de contagem do dissector escolhido. Na prática, o que acontece é a inclusão na contagem de objetos novos que entram em foco (ou saem de foco) enquanto descemos ou subimos dentro da caixa de contagem de volume conhecido.

A combinação do dissector óptico com o fracionador de amostras, conhecida na literatura como fracionador óptico (West et al., 1991), tem numerosas vantagens práticas, sendo a principal o fato de não ser afetado pela retração do tecido e não requerer definições rigorosas de fronteiras estruturais, que podem ser feitas em objetivas de baixo aumento. O fracionador óptico envolve a contagem de objetos utilizando sondas de dissectores ópticos, em uma amostra sistemática uniforme que constitui uma fração conhecida do volume da região em análise. Na prática, isso é feito através de amostragem sistemática de uma fração conhecida da espessura da secção, tsf (iniciais de “thickness sample fraction”), de uma fração conhecida da área

seccional asf (iniciais de “area sample fraction”) e de uma fração conhecida do número de secções que incluem a região de interesse, ssf (iniciais de “section sample fraction”).

Cada análise estereológica começa com o delineamento dos limites da região de interesse em uma série de secções escolhidas de forma randômica e sistemática (Howard, 2005). Para analisar sistematicamente e registrar a ocorrência dos objetos de interesse, é necessário mudar para uma objetiva de grande aumento (60x) com elevada abertura numérica e reduzida profundidade de foco (Schmitz and Hof, 2005).

Utilizando essa metodologia não é possível contar todas as células dentro da região de interesse. Para contornar esse dilema e obter estimativas confiáveis (que se aproximam do real) a partir de uma diminuta fração amostral, é necessária a utilização de coleta sistemática e aleatória de dados, incluindo a terceira dimensão. 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 and Hof, 2005).

A partir de critérios arquitetônicos, hodológicos e de marcadores seletivos, é possível caracterizar sem ambigüidades as áreas e os objetos de interesse com arquitetura clássica utilizando técnicas consagradas (como o Nissl); imunohistoquímica e histoquímicas específicas.

Para caracterização de áreas ou núcleos funcionais específicos no sistema nervoso, uma série de critérios são aplicados e foram resumidos em cinco principais abordagens experimentais: estudos arquitetônicos, padrão de conexões, mapeamento topográfico, análise eletrofisiológica de propriedades de neurônios isolados e déficits comportamentais após lesões seletivas reprodutíveis (Phillips et al. 1984).

Em estudo prévio caracterizamos as áreas de interesse (CA1, CA2 e CA3) empregando marcadores cito, mielo e histoarquitetônicos, restando caracterizar os objetos de interesse que para as finalidades da presente análise correspondem aos astrócitos e as redes perineuronais (Guerreiro-Diniz et al., 2010).

Para quantificar o número de astrócitos e de redes perineuronais utilizamos imunomarcador seletivo para a proteína ácida fibrilar glial e a histoquímica para a lectina *Wisteria floribunda* que revela sítios da matriz extracelular que contem

proteoglicanos. Uma vez definidos os objetos e as áreas de interesse escolhemos o fracionador óptico para estimar o número dos objetos de interesse em cada área.

O processo inteiro consiste, em resumo, de duas etapas:

1ª Etapa – Amostragem: que exige acesso à estrutura inteira com todas as regiões de interesse com chances similares de contribuição para a amostra, assim como o reconhecimento dos objetos de interesse sem ambigüidade.

2ª Etapa – Medidas: que exigem o uso de métodos baseados em design (medidas tridimensionais) ao invés de métodos baseados em suposições acerca da espessura da secção ou da forma dos objetos de interesse (medidas bidimensionais).

O protocolo do fracionador óptico pode ser usado para quantificar o número de células e estruturas subcelulares e é aplicável a qualquer estrutura tridimensional que possa ser fracionada em secções a partir de onde se colhem as amostras. O fracionador óptico é a combinação do dissector óptico e do fracionador (West, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer um conjunto de informações qualitativas e quantitativas acerca da distribuição laminar da astroglia e das redes perineuronais da formação hipocampal do *Cebus apella*, para dar suporte anatômico a estudos que utilizam a espécie como modelo para ensaios comportamentais envolvendo tarefas hipocampo dependentes.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Descrever a distribuição laminar dos astrócitos e das redes perineuronais em CA1, CA2 e CA3 do *Cebus apella*;
- 2) Estimar o número total de astrócitos e das redes perineuronais presentes nas diversas camadas de CA1, CA2 e CA3 utilizando o método do fracionador óptico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados quatro macacos prego (*Cebus apella*) machos adultos jovens, todos doados pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) em apreensões de contrabando ou provenientes de cativeiro, como o bosque Rodrigues Alves e o Bioparque Amazônia Crocodilo Safari.

O projeto foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará – UFPA.

3.1. Processamento do tecido

Após 5-7 dias de adaptação ao alojamento do Laboratório os animais foram profundamente anestesiados com cetamina (30 mg/kg) + xilazina (0,8 mg/kg) e perfundidos por via transcardíaca com solução salina heparinizada 0.9% por 10 minutos, seguida de paraformaldeído a 4% pH 7.2-7.4 por 30 minutos.

Após craniotomia e ainda com o encéfalo na base do crânio, a cabeça do animal foi colocada no estereotáxico Horsley-Clarke para animais de médio porte. O animal foi fixado com pontas de orelha inseridas nos dutos auditivos, e a mandíbula apoiada com pino de fixação colocado entre os dentes incisivos. O encéfalo foi cortado no plano coronal, perpendicular ao plano de Frankfurt (plano definido pela linha reta que passa através dos condutos auditivos e a borda inferior das órbitas oculares). Seguiu-se a retirada do encéfalo, e a dissecação da formação hipocampal do hemisfério esquerdo dos animais seguida do seccionamento em plano coronal das regiões encefálicas de interesse em um vibrátomo (Vibratome Sectioning System, Pelco 120 a 70µm de espessura).

As coleções cortadas foram coradas por imunohistoquímica para a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e por histoquímica para a lectina *Wisteria floribunda* montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas, diafanizadas e encobertas com lamínulas e selante (Enthelan, Merck).

3.2. Coloração

3.2.1. Imunohistoquímica para revelação de astrócitos

Para identificação de astrócitos em secções fixadas utilizamos o anticorpo primário para proteína ácida fibrilar glial (MAB360, CHEMICON Int, CA, USA). As secções foram reagidas seguindo a seqüência indicada no Quadro 1.

Quadro 1- Passos da reação de imunohistoquímica para detecção da proteína fibrilar ácida GFAP

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (horas)
Acido Bórico 0.2M (70 °C pH 9)	1		1
TRIS EDTA	1		12
Salina Tamponada de Fosfato + Triton (PBS-T) a 5%	3	5	
Peróxido de Hidroqênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	10	
PBS	3	2	
Anticorpo primário (Mouse Anti-Neuronal Nuclei) a 4º C em	1		72
PBS	3	2	
MOM IqG Biotinylated Anti-Mouse IqG (60ul de Biotinylated	1		12
PBS	3	2	
ABC (Complexo Biotina Avidina	1		1
PB 0.1 M	3	2	
Tampão acetato 0.1 M	1	5	
GND (0,5mg/ml de DAB + 1,2mg/ml Níquel)	1	20	
PB 0,1M	3	5	

As secções foram incubadas em uma solução de trabalho contendo anticorpo primário anti-GFAP (MAB360, CHEMICON Int, USA) em diluição 1:800 em tampão fosfato salina 0.1M pH 7.2-7.4 4°C com agitação suave durante 3 dias. As secções foram lavadas 3 vezes, 2 min de cada vez em PBS e incubadas durante a noite no anticorpo secundário biotilado produzido em cavalo e dirigido para imunoglobulina de camundongo (Vector Laboratories, USA) em diluição 1:200 em tampão fosfato salina. Após três lavagens em PBS as secções foram então incubadas em solução contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase em diluição 1:200 por 90 minutos e então reagidas para revelação do cromógeno empregando o protocolo de Glucose Oxidase/Nickel/Diaminobenzidina (GND) (Shu et al., 1988). A reação era interrompida sempre que as ramificações distais dos astrócitos eram visualizadas ao microscópio. Em geral esse momento ocorria 15 a 20 minutos após a adição da glucose-oxidase à solução de reação. Após 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada

as secções eram montadas em lâminas gelatinizadas, contra-coradas com cresil violeta, desidratadas, diafanizadas e encobertas com lamínulas em meio de montagem Enthelan (Merck). As secções foram contracoradas seguindo a seqüência indicada no Quadro 2.

Quadro 2- Passos da reação para contracoloração com cresil violeta utilizando a técnica de Nissl.

Soluções	Tempo
Álcool etílico 90 %	1 min
Álcool etílico 70 %	1 min
Álcool etílico 50 %	1 min
Água destilada + ácido acético	2 min
Cresil violeta	5 min
Álcool etílico 70 %	15 s
Álcool etílico 90 % + ácido acético	15 s
Álcool etílico 100 %	1 min
Álcool etílico 100 %	1 min
Álcool etílico 100 % + xileno	1 min
Xileno	3 min
Xileno	3 min

3.2.2. Histoquímica para revelação das redes perineuronais

A quantificação das redes perineuronais em secções fixadas foi realizada a partir da revelação da lectina *Wisteria floribunda* biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), que identifica resíduos de açúcar da matriz extracelular. As secções foram reagidas seguindo a seqüência indicada no Quadro 3.

As secções reagidas foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e diafanizadas para posterior análise qualitativa e quantitativa.

Quadro 3. Passos da reação de histoquímica para detecção da rede perineuronal

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo (minutos)	Tempo (horas)
TRIS + Triton a 5%	3	5	
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	20	
TRIS + Triton a 5%	2	5	
TRIS + Triton a 5%	1	20	
Lectina <i>Wisteria floribunda</i> biotinizada (3 µl sol estoque + 1ml PBS)	1		12
TRIS 0,1 M pH 7,4	3	2	
ABC (Complexo Biotina Avidina)	1		1
TRIS 0,1 M	3	2	
Tampão acetato 0,1 M	1	5 (máx.)	
GND (0,5mg/ml de DAB + 1,2mg/ml Níquel)		20	
TRIS 0,1 M	1	5	

3.3. ESTEREOLOGIA

No sentido de fazer com que os dados provenientes dos diferentes indivíduos dos vários grupos experimentais fossem comparáveis, secções anatômicas equivalentes foram selecionadas para a estimativa do número de objetos de interesse. As secções escolhidas proveram valores representativos das diversas regiões anatômicas.

A determinação do número de astrócitos e de redes perineuronais foi feita através da distribuição sistemática e aleatória de blocos de contagem, dentro de uma série de secções que continham a região de interesse. O experimentador definia os limites da região de interesse indicando para o programa as três dimensões da caixa de contagem (largura, comprimento e altura), o espaçamento entre elas, e as zonas de guarda, preenchendo um protocolo definido pelo programa. Após o preenchimento, o programa exhibe a disposição espacial das caixas em relação ao contorno da secção a partir dos parâmetros preenchidos e muda automaticamente a posição da lâmina para iniciar uma nova contagem em uma nova caixa toda vez que o experimentador dá por encerrada a contagem da caixa anterior. Ao final da contagem de todas as caixas de cada secção, o programa estima o número total de objetos de interesse naquela secção e gera uma série de

dados estatísticos que incluem o número total de objetos marcados pelo experimentador e a estimativa total esperada para a secção com o respectivo coeficiente de erro. Este último é usado como indicador para avaliarmos se as dimensões e o número de caixas é adequado para obtermos valores médios representativos do total do número de objetos na estrutura que estamos analisando. Coeficientes de erro maiores que 0,05 indicam na maioria dos casos a necessidade de mudanças nos parâmetros escolhidos.

O processo se inicia empregando-se objetiva de 3.2x, delineando-se nas secções de cada animal, os contornos das camadas de interesse para os diferentes níveis antero-posteriores. Empregou-se microscópio óptico (Optiphot2, NIKON) com platina motorizada e conversores análogo-digitais (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) para a transmissão de informação das coordenadas espaciais (X, Y, Z) de cada ponto digitalizado. Esse sistema foi acoplado a microprocessador que controlava os movimentos da platina com auxílio de programa especializado (Stereoinvestigator, MicroBrightField, Williston, VT, USA) e estocava as coordenadas dos pontos de interesse. No sentido de se evitar ambigüidades na identificação dos objetos de interesse e garantir que se encontravam dentro dos planos permitidos de contagem, a objetiva de 3.2x era substituída por outra de 60x, planapocromática, a óleo, com valor de abertura numérica 1.4 (NIKON, NA=1.4) utilizada para todas as contagens empreendidas.

O programa permite a definição de zonas de guarda superpostas às regiões de corte da fatia onde os procedimentos de microtomia produzem variações indesejáveis (ou seja, nas superfícies de corte).

A estimativa do número total de astrócitos dentro da região de interesse é obtida através do método do fracionador óptico, multiplicando-se o número de astrócitos contados dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra. Esses valores dependem: 1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções que contem a região de interesse ("section sampling fraction"); 2) da área dos blocos de contagem comparada com a área da matriz de contagem ("area sampling fraction"); e 3) da altura do bloco de contagem comparada com a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos ("thickness sampling fraction").

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

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/ média da espessura da secção

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 (Glaser and 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 com esse valor de CE contribui pouco para a variância observada para cada grupo. 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 and West, 2005). Os parâmetros experimentais para cada camada do giro denteado foram estabelecidos em experimentos piloto e uniformemente aplicados a todos os animais. As tabelas 1 a 3 apresentam os parâmetros experimentais e os resultados médios de contagens dos astrócitos de cada lâmina de interesse (molecular, granular e polimórfica) do giro denteado para cada grupo experimental.

4. RESULTADOS

4.1 – Redes perineuronais

4.1.1- Análises Qualitativas

Para examinar a distribuição de redes perineuronais no hipocampo do *Cebus apella* utilizou-se a histoquímica para revelar a presença de sítios com resíduos de açúcar que compoem os proteoglicanos da matriz extracelular. A revelação desses sítios foi obtida com a lectina *Wisteria floribunda* biotinilada usando como cromógenos a diamino benzidina intensificada pelo níquel e contracorada com cresil violeta, como descrito anteriormente. A Figura 2 ilustra a arquitetura revelada por essa reação para diversas áreas do encéfalo do macaco prego em uma secção coronal do hemisfério esquerdo que inclui os campos hipocâmpais CA1, CA2 e CA3 e o giro denteado (DG). A posição anatômica do hipocampo e do giro denteado ilustrado na Figura 2 é similar àquela descrita para o hipocampo do macaco Rhesus (*Macaca mulata*). O padrão de marcação extracelular reconhecido nas secções hipocâmpais do *Cebus apella* reagidas para detecção histoquímica das redes perineuronais e contracoradas com o cresil violeta permitiu a definição inambígua dos limites arquitetônicos entre o súbiculum e CA1, entre CA1 e CA2 e entre CA2 e CA3. Na substância cinzenta a matriz extracelular aparece com aspecto difuso além de dar origem as redes em torno dos neurônios denominadas de perineuronais. O padrão difuso da matriz que permitiu a definição dos campos arquitetônicos aparece muito mais intenso na região de CA2 e essa diferença é o aspecto arquitetônico mais evidente dessa região. As redes perineuronais foram encontradas predominantemente no interior ou em torno da camada piramidal e em pequena proporção no stratum oriens e radiatum dos campos hipocâmpais. Nas regiões prosubiculares e subiculares também foram encontradas em grande proporção em meio a uma neurópila de moderada intensidade de marcação



Figura 2. Fotomicrografia ilustrando a posição relativa do hipocampo em relação às estruturas anatómicas circunvizinhas em uma secção coronal rostral corada com a lectina *Wisteria floribunda* e contracorada com cresil violeta, marcando redes perineuronais. Put: Putamen; Tha: tálamo; GL: Genuculado Lateral. Escala:5 mm

Na figura 3 são visto cortes coronais do hipocampo do *Cebus apella* com aumento de 3.2X, os cortes representam diferentes níveis do eixo ântero-posterior: rostral (A), intermediário (B) e caudal (C). Pode-se observar a delimitação do giro denteado e do cornu de Amon e suas camadas específicas com a histoquímica para a lectina *Wisteria floribunda*. No cornu de Amon a marcação histoquímica demonstra

claramente a separação das regiões em CA1, CA2 e CA3, com uma intensa marcação em CA2. Note que a distribuição das redes perineuronais é diferente ao longo do eixo ântero-posterior, com uma maior quantidade de redes na secção rostral quando comparada à secção mais caudal, principalmente em CA1 e CA3.

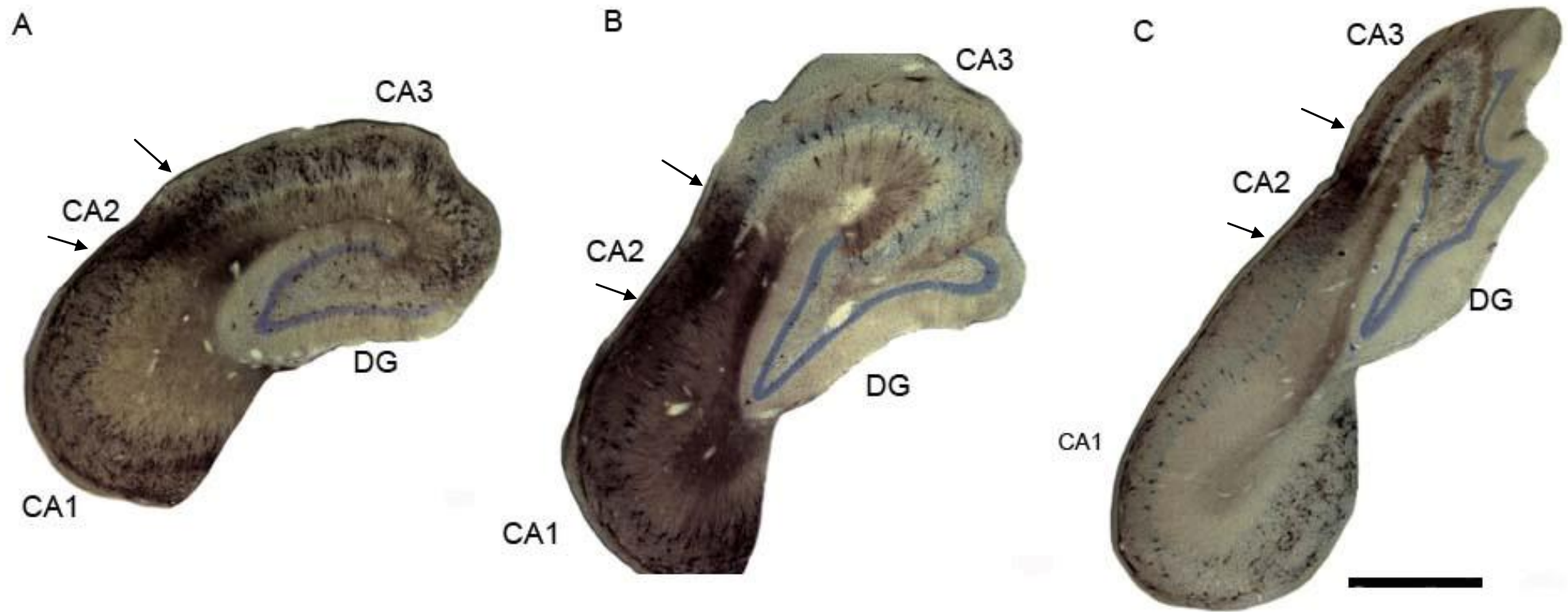


Figura 3-. Fotomicrografia em 3.2X de uma secção coronal rostral (A), intermediária (B) e caudal (C) corada com lectina *Wisteria floribunda* e contracorada com cresil violeta. As setas indicam o limite de CA2 distinguido dos outros campos hipocâmpais pela marcação mais intensa. Notar laminação bem diferente no giro dentado (DG) quando comparada a do Corno de Amon. Escala: 5mm.

A Figura 4 ilustra em baixo (Objetiva 3.2X, Figura 4 D) e médio aumentos (Objetiva 10X, Figura 4 A – C) detalhes arquitetônicos importantes a partir de uma secção coronal rostral. Notar as diferenças arquitetônicas reconhecidas prontamente pela distribuição distinta das redes e da neurópila em cada subregião do hipocampo do *Cebus apella*. Da análise qualitativa pode ser observado que CA2 possui marcação mais intensa do que CA1 e CA3, com maior número de redes que se dispõem bem próximas umas das outras (Figura 4B). Em CA1 e CA3 as redes encontram-se mais afastadas umas das outras e menos ramificadas (Figura 4 A e C).

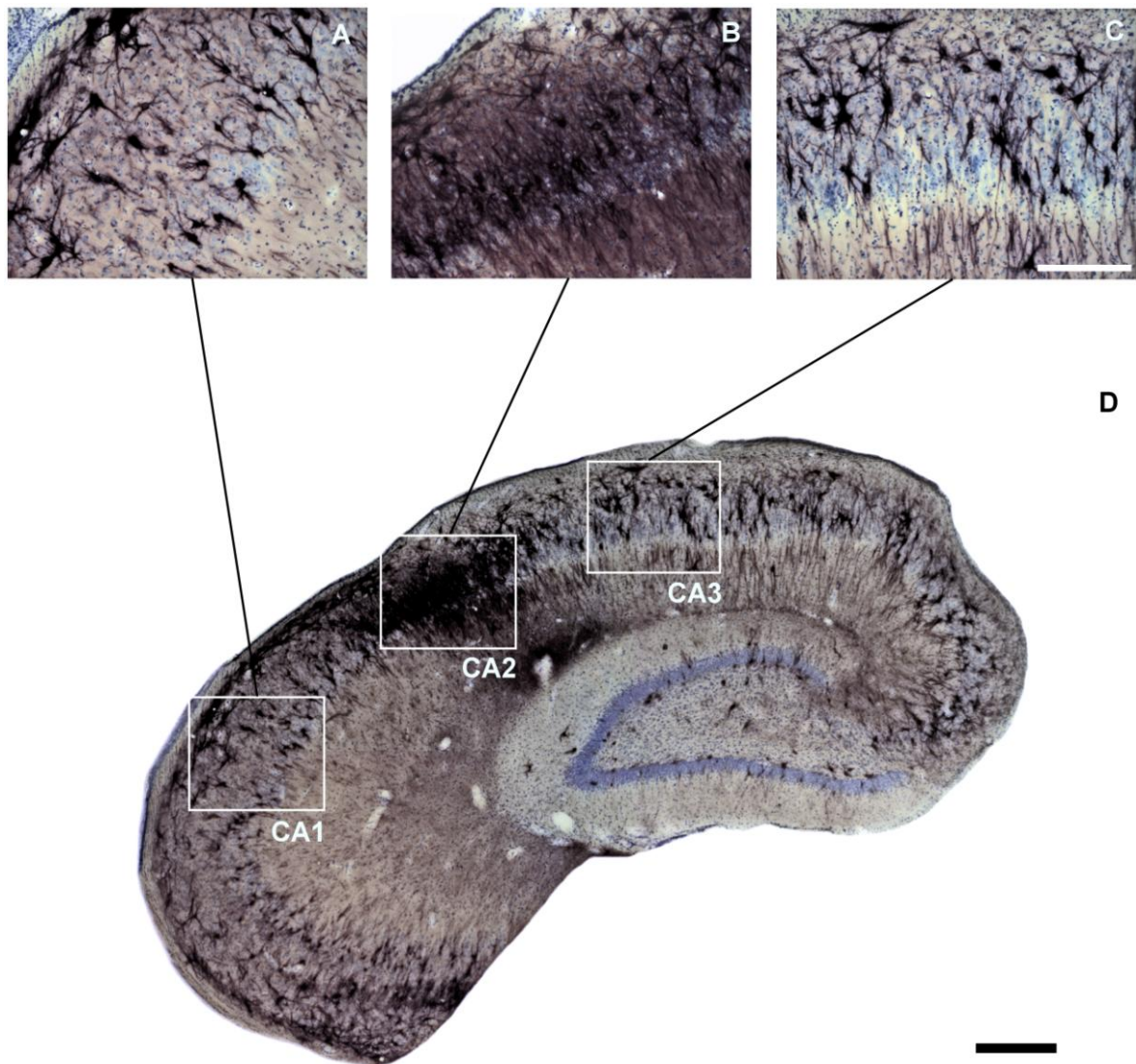


Figura 4 - Fotomicrografia em 3.2X de uma secção coronal rostral (D) corada com lectina *Wisteria floribunda* e contracorada com cresil violeta. Inserções com aumento de 10X de CA1 (A), CA2 (B) e CA3 (C). Escala em D: 500 μ m e escala em A-C 25 μ m.

Na Figura 5 ilustra-se detalhes da estrutura ramificada das redes perineuronais, revelando que se pode classificá-las em dois grandes grupos de acordo com suas características morfológicas: redes do tipo 1 e redes do tipo 2. Um terceiro tipo de distribuição muito escassa no hipocampo pode eventualmente ser encontrado (Figura 8). As redes do tipo 2 (apontada pela seta na Figura 5) se caracterizam por envolver o soma neuronal e alguns ramos dendríticos primários fracamente marcados. As do tipo 1 (marcadas com asterisco na Figura 5) se caracterizam por envolverem o soma, dendritos primários, secundários e eventualmente outros dendritos de ordem superior. As do tipo 3 envolvem o corpo celular neural e parte proximal do dendrito primário apresentando morfologia somatodendrítica mais variável e contornos mais densos do tipo “cotton wool-like” (malha de algodão) ao redor do soma (Figura 8). A contracoloração pelo Nissl revela a presença de neurônios de tamanhos variados com nucléolo evidente e numerosas células da glia com cromatina formando grupos numerosos e dispersos.

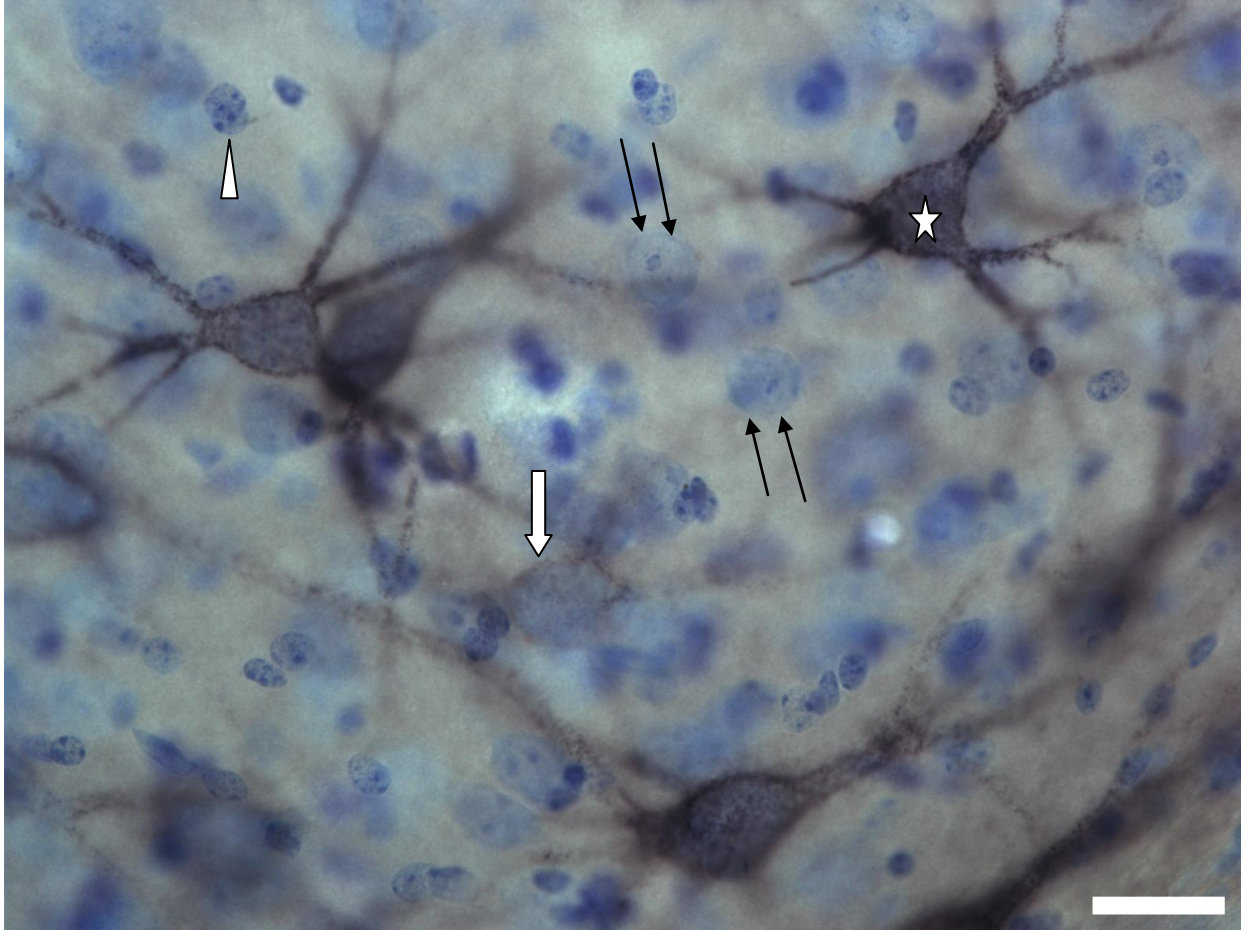


Figura 5 - Fotomicrografia em grande aumento de uma secção coronal rostral de CA1 reagida histoquimicamente para a lectina *Wisteria floribunda* e contracorada com cresil violeta. A seta branca aponta para uma rede do tipo 2 e o asterisco identifica rede do tipo 1. A cabeça de seta branca aponta para uma célula glial e as duplas setas pretas para neurônios. Escala: 25 μ m

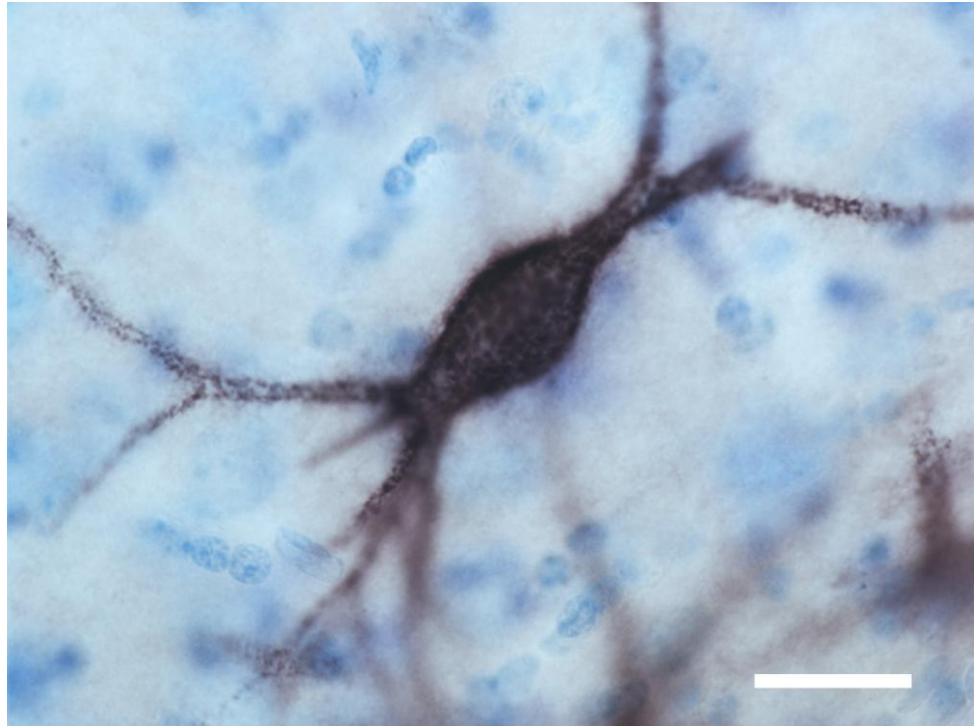


Figura 6 - Fotomicrografia em 60X de uma secção coronal rostral de CA1 reagida histoquimicamente para a lectina *Wisteria floribunda* e contracorada com cresil violeta, ilustrando uma rede perineuronal do tipo 1. Escala: 25 μ m.

Na figura 6 podemos identificar uma rede perineuronal Tipo 1, de morfologia similar a células não-piramidais, envolvendo o soma, partes proximal de dendritos e segmentos de neurônios não piramidais com um contorno intenso ao redor do revestimento da Matriz.

Na figura 7 podemos identificar uma rede perineuronal Tipo 2, envolvendo célula de morfologia similar à células piramidais, onde a marcação para a lectina *Wisteria floribunda* é menos intensa. Normalmente a rede que envolve essas células inclui o segmento inicial do axônio e a parte proximal do dendrito apical em concordância com descrição prévia (Wegner et al., 2003).

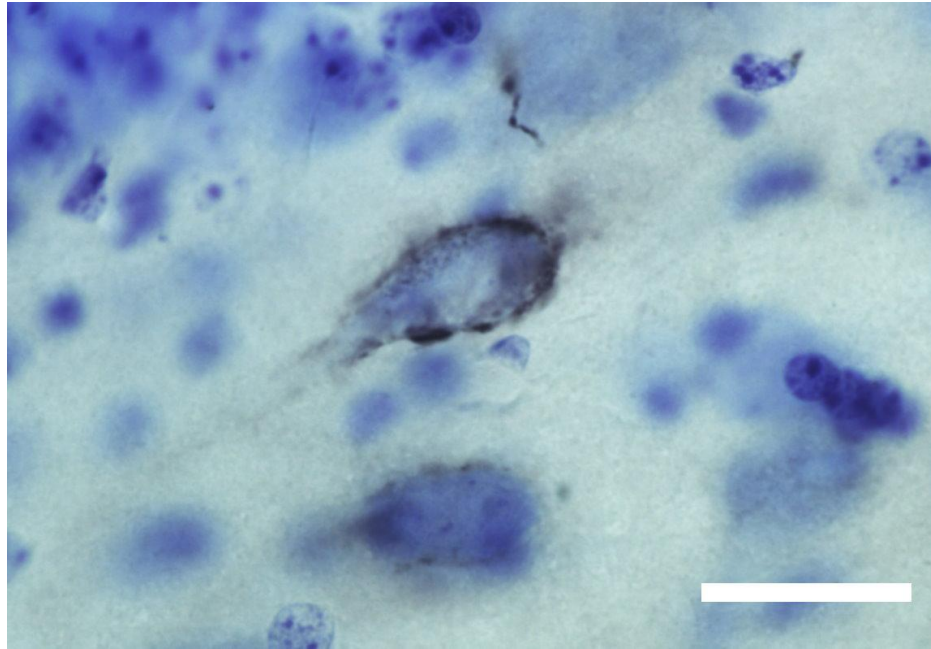


Figura 7 - Fotomicrografia em 60X de uma secção coronal rostral de CA1 reagida histoquimicamente para a lectina *Wisteria Floribunda* e contracorada com cresil violeta, mostrando a rede perineuronal do tipo 2. Escala: 25 μ m.

A figura 8 ilustra a rede perineuronal do tipo 3 com matriz de distribuição extracelular de distribuição difusa e marcação mais intensa, pouco presente no corno de Amon.

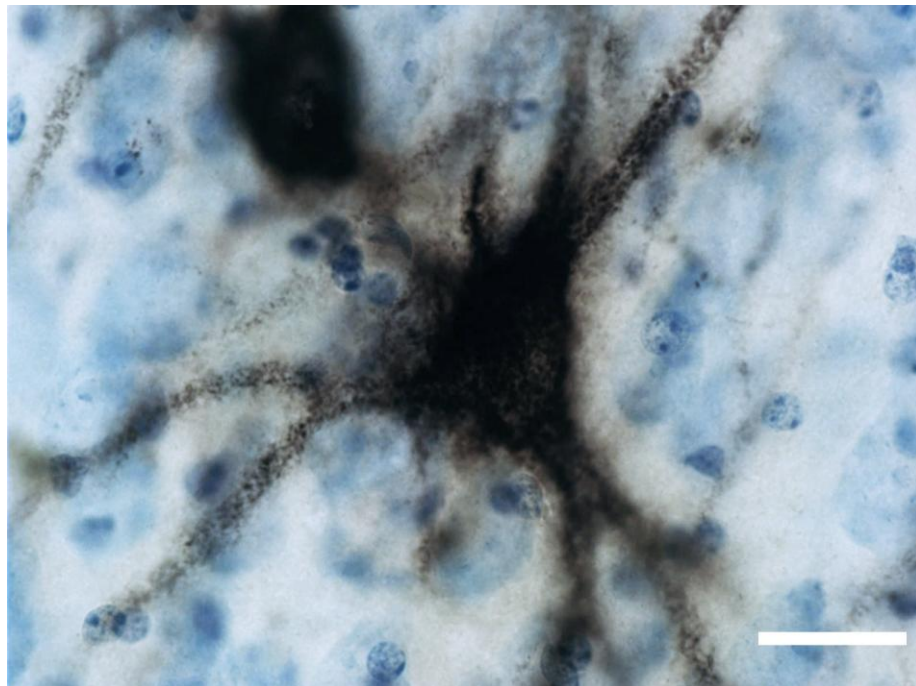


Figura 8 - Fotomicrografia em 60X de uma secção coronal rostral de CA1 reagida histoquimicamente para a lectina *Wisteria floribunda* e contracorada com cresil violeta, ilustrando a rede perineuronal do tipo 3. Escala: 25 μ m.

4.1.2- Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico

Para a contagem de redes perineuronais, utilizou-se zona de guarda de 2 μm e altura do dissector de 10 μm . Na tabela 1 observa-se os parâmetros experimentais e resultados da contagem de redes perineuronais (RP's) em CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de quatro exemplares de *Cebus apella* utilizando o fracionador óptico. Em todas as áreas (piramidal de CA3, CA2 e CA1) foi utilizado o mesmo protocolo para a contagem pelo fracionador óptico com caixa de contagem de 155 X 115 e a caixa da matriz amostral de 155 X 115, escolhido para incluir na contagem todos os objetos contidos na área de interesse, resultando num ssf de 1 (μm). O tsf médio variou de 0,55 em CA3, a 0,54 em CA2 e CA1. O ssf para todas as áreas foi de 1 a cada 10 secções (1/10). O número de caixas de contagem variou de 1870 à 2580, com média de 2226 em CA3, de 1110 à 1258 com média de 1180 em CA2 e 1781 à 2145 com média de 1994 para CA1. O número de secções incluídas na contagem não variou entre os sujeitos e correspondeu a um total de 17. A média de marcadores (redes efetivamente contadas) ficou em 2404, 6827 e 2219 para CA3, CA2 e CA1, respectivamente. A quantidade média total estimada de RP's e seus respectivos desvios padrão variou em CA3, CA2 e CA1 e correspondeu respectivamente a 44.754 ± 4.207 , 133.428 ± 7.624 e 42.763 ± 6.148

Tabela 1- Parâmetros experimentais e resultados da contagem de redes perineuronais (ΣQ^-) em CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de quatro exemplares de *Cebus apella* utilizando o fracionador óptico⁽¹⁾.

Sujeitos ⁽²⁾	a(caixa) (μm^2)	A(x,y) (μm^2)	asf	tsf	ssf	No. de caixas de contagem	No. de secções	ΣQ^-	N
Redes Perineuronais									
CA3									
MP1	155 x 115	155 x 115	1	0.59 ± 0.06	1/10	2100	17	2272	40.471
MP2	155 x 115	155 x 115	1	0.52 ± 0.05	1/10	1870	17	2275	45.654
MP3	155 x 115	155 x 115	1	0.59 ± 0.05	1/10	2353	17	2827	50.201
MP5	155 x 115	155 x 115	1	0.53 ± 0.07	1/10	2580	17	2243	42.686
CA2									
MP1	155 x 115	155 x 115	1	0.58 ± 0.08	1/10	1205	17	7136	133.198
MP2	155 x 115	155 x 115	1	0.49 ± 0.05	1/10	1110	17	6029	127.057
MP3	155 x 115	155 x 115	1	0.58 ± 0.05	1/10	1258	17	7297	129.247
MP5	155 x 115	155 x 115	1	0.50 ± 0.06	1/10	1148	17	6842	144.210
CA1									
MP1	155 x 115	155 x 115	1	0.59 ± 0.08	1/10	1914	17	1979	35.785
MP2	155 x 115	155 x 115	1	0.49 ± 0.06	1/10	1781	17	2341	49.778
MP3	155 x 115	155 x 115	1	0.58 ± 0.04	1/10	2145	17	2618	45.527
MP5	155 x 115	155 x 115	1	0.50 ± 0.07	1/10	2136	17	1938	39.959

¹⁾Área da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

Note que os números em CA2 são aproximadamente 3 vezes mais elevados do que em CA1 e CA3 a despeito do volume de CA2 que é aproximadamente a metade do volume de CA1 e CA3, como observado na tabela 2.

Na tabela 2 apresenta-se as estimativas de volumes planimétricos unilaterais individuais do hipocampo do *Cebus apella*, estimativas numéricas e de espessura das secções correspondentes utilizadas nas contagens de redes perineuronais na camada piramidal e oriens. A espessura média e o respectivo desvio padrão encontrado foi de $18,10 \pm 1,24$ para CA3, $18,88 \pm 1,59$ para CA2 e $18,87 \pm 1,93$ para CA1, mostra pouca diferença entre as espessuras.

Já em relação ao volume, a camada piramidal e oriens de CA3 apresenta o dobro do volume em CA2 e o volume em CA1 é aproximadamente 70% a maior que CA2, sendo o volume médio e o respectivo desvio padrão de $19,97 \pm 2,93$ para CA3 com coeficiente de erro médio (CE) de 0,025, para CA2 de $10,18 \pm 0,60$ e CE de 0,04 e para CA1 de $17,67 \pm 1,67$ e CE de 0,0325. O coeficiente de variação biológico para o volume foi de 97,11% em CA3, 53,74% em CA2 e 88,13% em CA1.

As médias das estimativas de todas os tipos de redes perineuronais somadas e seus respectivos desvios padrão foram de 44.753 ± 4.207 em CA3, foi de 133.428 ± 7.624 em CA2, de 42.762 ± 6.148 em CA1 e CE (Scheaffer) médio de 0,03. O coeficiente de variação biológico para a estimativa numérica das RP's foi de 84,94% em CA3, 57,80% em CA2 e 96,76% em CA1.

Tabela 2- Estimativa de volumes planimétricos unilaterais individuais do hipocampo do *Cebus apella*, espessura das secções e estimativas numéricas totais de redes perineuronais na camada Piramidal e Oriens.

Sujeitos	Espessura (µm)	Volume (mm ²)	CE	N	CE (Scheaffer)
Redes Perineuronais					
Piramidal e Oriens de CA3					
MP1	17,04 ± 2,41	19,13	0,04	40.471	0,045828
MP2	19,32 ± 2,10	16,24	0,02	45.654	0,031947
MP3	17,03 ± 1,65	21,61	0,02	50.201	0,036646
MP5	19,02 ± 2,81	22,90	0,02	42.686	0,031491
Média	18,10 ± 1,24	19,97	0,025	44.753	0,036478
SD		2,9378564		4.207,0576	
CV ²		0,021642		0,008837	
CE ²		0,000625		0,001331	
CE ² /CV ²		0,029		0,15	
CVB ²		0,021017378		0,007506234	
CVB ² (%CV ²)		97,11%		84,94%	
Piramidal e Oriens de CA2					
MP1	17,65 ± 2,88	10,48	0,04	133.198	0,035696
MP2	20,27 ± 2,20	9,60	0,04	127.057	0,034257
MP3	17,35 ± 1,56	10,88	0,04	129.247	0,036184
MP5	20,24 ± 3,00	9,78	0,04	144.210	0,042322
Média	18,88 ± 1,59	10,185	0,04	133.428	0,037115
SD		0,5989713		7624,0424	
CV ²		0,003459		0,003265	
CE ²		0,0016		0,001378	
CE ² /CV ²		0,46		0,42	
CVB ²		0,001858518		0,001887419	
CVB ² (%CV ²)		53,74%		57,80%	
Piramidal e Oriens de CA1					
MP1	17,14 ± 3,01	17,01	0,03	35.785	0,028669
MP2	20,72 ± 2,76	15,62	0,04	49.778	0,025152
MP3	17,27 ± 1,40	19,06	0,03	45.527	0,025089
MP5	20,35 ± 2,95	19,00	0,03	39.959	0,024615
Média	18,87 ± 1,93	17,67	0,0325	42.762	0,025881
SD		1,6672407		6148,3708	
CV ²		0,0089		0,020672	
CE ²		0,001056		0,00067	
CE ² /CV ²		0,12		0,032	
CVB ²		0,007843968		0,020002463	
CVB ² (%CV ²)		88,13%		96,76%	

CVB² = CV² - CE²; CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica, N: número de redes; SD, desvio padrão.

Na tabela 3 ilustra-se a distribuição das redes perineuronais na camada piramidal e oriens de CA3, CA2 e CA1 de acordo com os tipos de redes. As redes do tipo 2 são muito mais numerosas que as do tipo 1, e as redes do tipo 3 são raras em todas as camadas. Quando comparadas em suas camadas, as redes do tipo 2 são 3 vezes mais presentes em CA2 que em CA1 e CA3, a estimativa numérica média e desvio padrão das redes do tipo 2 são de 40.550 ± 3.814 em CA3, 124.283 ± 6.592 em CA2 e 35.481 ± 5.561 em CA1 e coeficiente de variação biológica de 98,43% em CA3, 97,23% em CA2 e 99,49% em CA1.

As redes do tipo 1 em CA2 são aproximadamente duas vezes maiores que em CA3 e aproximadamente 26% a mais em CA1, com a estimativa numérica e desvio padrão de 4.159 ± 657 em CA3, 9.032 ± 2.038 em CA2 e 7.163 ± 1.493 em CA1, e coeficiente de variação biológica de 96,79% em CA3, 98,58% em CA2 e 98,68% em CA1. Já as do tipo 3 como são muito raras e as vezes possuem apenas 1 marcador por secção não tem validade estatística.

Tabela 3 - Estimativas numéricas da contagem de redes perineuronais (ΣQ^-) para os tipos 1 e 2 em CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de quatro exemplares de *Cebus apella* utilizando o fracionador óptico(1).

Sujeitos	ΣQ^-	N	CE (Scheaffer)	ΣQ^-	N	CE (Scheaffer)	ΣQ^-	N	CE (Scheaffer)
Redes Perineuronais do Tipo 1									
CA3			CA 2			CA1			
MP1	179	3.188	0,076602	375	6.999	0,055776	292	5.280	0,05817
MP2	216	4.334	0,070553	459	9.673	0,05278	314	6.676	0,056337
MP3	254	4.510	0,071414	444	7.864	0,063676	493	8.573	0,046294
MP5	242	4.605	0,066066	550	11.592	0,054158	394	8.123	0,049338
Média		4.159	0,071159		9.032	0,056598		7.163	0,052535
SD		657,14144			2038,0515			1493,75	
CV ²		0,1579733			0,2256381			0,2085212	
CE ²		0,0050636			0,0032033			0,0027599	
CE ² /CV ²		0,032			0,014			0,013	
CVB ²		0,1529098			0,2224348			0,2057613	
CVB ² (%CV ²)		96,79%			98,58%			98,68%	
Redes Perineuronais do Tipo 2									
CA 3			CA 2			CA1			
MP1	2092	37.265	0,047967	6756	126.105	0,036939	1684	30.451	0,030366
MP2	2053	41.199	0,034192	5562	117.215	0,035673	2019	42.931	0,027192
MP3	2572	45.673	0,038013	6847	121.277	0,036868	2112	36.728	0,028431
MP5	2000	38.062	0,033642	6288	132.533	0,043892	1543	31.814	0,028105
Média		40.550	0,038454		124.283	0,038343		35.481	0,028524
SD		3814,372			6592,5063			5651,184	
CV ²		0,094066			0,0530443			0,1592715	
CE ²		0,001479			0,0014702			0,0008136	
CE ² /CV ²		0,016			0,028			0,005	
CVB ²		0,092587			0,0515741			0,1584579	
CVB ² (%CV ²)		98,43%			97,23%			99,49%	

CVB² = CV² - CE²; CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica, N: número de redes; SD, desvio padrão.

4.2. – Astrócitos

4.2.1- Análises Qualitativas

A figura 9 ilustra a imunomarcção de astrócitos utilizando anticorpos anti-GFAP nas camadas piramidal, radiatum e oriens nas regiões CA1 e CA2-CA3. A camada piramidal de CA1 (Fig. 9 A) mostrou igualmente uma concentração maior de astrócitos com ramos mais espessos em relação a mesma camada em CA2-CA3 (Fig. 9 B). O stratum radiatum de CA1 (Fig. 9 D) parece possuir diferenças morfológicas importantes no que concerne ao padrão de marcação em relação á mesma equivalente da região de CA2-CA3 (Fig. 9 E), com um número mais abundante de astrócitos na região de CA2-CA3 e um padrão de ramificação mais fino em CA1. E quando comparada a camada radiatum de CA1 e CA2-CA3 (Fig. 9 D-E) com a camada piramidal de CA1 e CA2-CA3 (Fig. 9 A-B) observamos uma quantidade maior de astrócitos na camada piramidal, confirmados quantitativamente na análise pelo fracionador óptico.

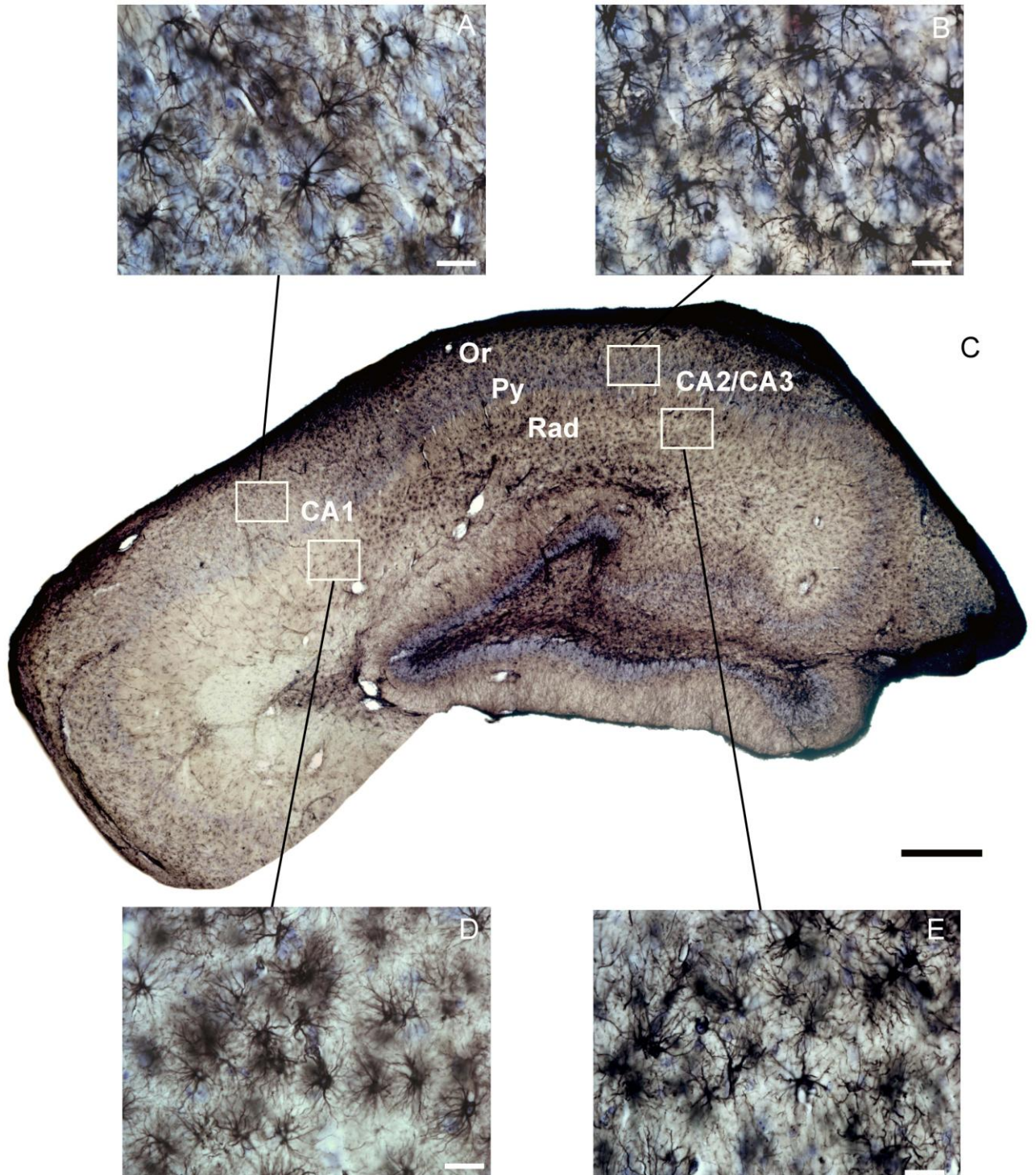


Figura 9 - Fotomicrografia em 3.2X de uma secção coronal rostral (C) corada com GFAP marcando astrócitos. Fotomicrografias com objetiva de 40X do mesmo corte no stratum piramidal de CA1 (A) e CA3-CA2 (B) e no stratum radiatum de CA1 (D) e CA3-CA2 (E). Escala em C: 250 μm e escala em A,B,D e E 25 μm .

A Figura 10 mostra a fotomicrografia do soma de um neurônio marcado por Nissl, sendo envolvido pelos ramos de um astrócito marcado pela imunohistoquímica de GFAP, em diferentes focos, ilustrando que a íntima relação que o astrócito mantém com neurônios ocorre igualmente no hipocampo do *Cebus apella*.

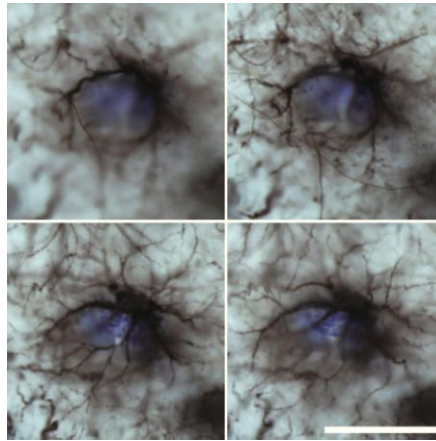


Figura 10 – Fotomicrografia em 60X obtidas a partir de secções imunomarcadas para GFAP marcando astrócitos e contracorada com Nissl para ilustrar um neurônio no stratum radiatum de CA3 em diferentes focos. Escala: 25 μ m.

4.2.2- Análises Quantitativas pelo Fracionador Óptico

A tabela 04 ilustra os parâmetros de contagem e o número de astrócitos contados por animal na região do hipocampo propriamente dito, nas regiões CA1 e CA2/CA3, nas camadas piramidal e estratos radiatum e oriens.

Para a contagem de astrócitos, utilizou-se a zona de guarda de 1 μ m e altura do dissector de 8 μ m e o tamanho das caixas de contagem permaneceram iguais para todas as áreas de 145 X 75. A matriz de contagem no stratum radiatum de CA1 foi de 190 x105, (asf = 0,55), enquanto que nas demais áreas a matriz de contagem foi de 300 X 150 (asf = 0.25). O tsf médio da piramidal de CA1 e CA2/CA3 e radiatum de CA1 foi de 0,33, e no oriens de CA1 e CA2/CA3 e radiatum de CA2/CA3 foi de 0,32. O ssf para todas as áreas foi de 1 a cada 10 secções (1/10 ou 0,1). As

caixas de contagem tiveram média de 489, 239 e 873 na piramidal, oriens e radiatum de CA1 e 732, 358 e 545 na piramidal, oriens e radiatum de CA2/CA3. Foram contadas 16 (dezesesseis) secções em 3 (três) macacos e 15 (quinze) secções em 1 (um) macaco. A média de marcadores ficou em 2.722, 1.324 e 3.576 para piramidal, oriens e radiatum de CA1 e 5.257, 2.417 e 3.558 na piramidal, oriens e radiatum de CA2/CA3, respectivamente. A quantidade média de astrócitos e seus desvios padrão foram estimados em 343.233 ± 61.437 , 169.518 ± 27.309 e 197.102 ± 45.525 na piramidal, oriens e radiatum de CA1 respectivamente e 651.001 ± 43.646 , 303.500 ± 15.570 , e 442.218 ± 82.820 na piramidal, oriens e radiatum de CA2/CA3.

Tabela 4- Parâmetros experimentais e resultados da contagem de astrócitos (ΣQ^+) em CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de quatro exemplares de *Cebus apella* utilizando o fracionador óptico⁽¹⁾.

Sujeitos ⁽²⁾	a(caixa) (μm^2)	A(x,y) (μm^2)	asf	tsf	ssf	No. de caixas de contagem	No. de secções	ΣQ^+
Piramidal CA1								
MP2	145 x 75	300 x 150	0.25	0.36 \pm 0.01	1/10	372	15	2685
MP3	145 x 75	300 x 150	0.25	0.27 \pm 0.01	1/10	652	16	2854
MP4	145 x 75	300 x 150	0.25	0.28 \pm 0.01	1/10	517	16	2044
MP5	145 x 75	300 x 150	0.25	0.41 \pm 0.02	1/10	417	16	3307
Oriens CA1								
MP2	145 x 75	300 x 150	0.25	0.36 \pm 0.01	1/10	171	15	1302
MP3	145 x 75	300 x 150	0.25	0.27 \pm 0.01	1/10	332	16	1290
MP4	145 x 75	300 x 150	0.25	0.27 \pm 0.02	1/10	260	16	1283
MP5	145 x 75	300 x 150	0.25	0.41 \pm 0.03	1/10	194	16	1423
Radiatum CA1								
MP2	145 x 75	190 x 105	0.55	0.36 \pm 0.01	1/10	678	15	3617
MP3	145 x 75	190 x 105	0.55	0.27 \pm 0.01	1/10	1221	16	3674
MP4	145 x 75	190 x 105	0.55	0.28 \pm 0.01	1/10	865	16	2155
MP5	145 x 75	190 x 105	0.55	0.41 \pm 0.02	1/10	728	16	4859

Tabela 4 (Continuação) Parâmetros experimentais e resultados da contagem de astrócitos (ΣQ^{-}) em CA1, CA2 e CA3 do hipocampo de quatro exemplares de *Cebus apella* utilizando o fracionador óptico⁽¹⁾.

Sujeitos ⁽²⁾	a(caixa) (μm^2)	A(x,y) (μm^2)	asf	tsf	ssf	No. de caixas de contagem	No. de secções	ΣQ^{-}
Piramidal CA3-CA2								
MP2	145 x 75	300 x 150	0.25	0.36 ± 0.02	1/10	665	15	5862
MP3	145 x 75	300 x 150	0.25	0.27 ± 0.01	1/10	795	16	4321
MP4	145 x 75	300 x 150	0.25	0.28 ± 0.01	1/10	661	16	3983
MP5	145 x 75	300 x 150	0.25	0.41 ± 0.03	1/10	808	16	6862
Oriens CA3-CA2								
MP2	145 x 75	300 x 150	0.25	0.35 ± 0.02	1/10	298	15	2413
MP3	145 x 75	300 x 150	0.25	0.27 ± 0.01	1/10	416	16	2074
MP4	145 x 75	300 x 150	0.25	0.28 ± 0.02	1/10	357	16	2124
MP5	145 x 75	300 x 150	0.25	0.41 ± 0.02	1/10	361	16	3058
Radiatum CA3-CA2								
MP2	145 x 75	300 x 150	0.25	0.36 ± 0.02	1/10	531	15	4036
MP3	145 x 75	300 x 150	0.25	0.27 ± 0.01	1/10	467	16	2152
MP4	145 x 75	300 x 150	0.25	0.28 ± 0.01	1/10	616	16	3571
MP5	145 x 75	300 x 150	0.25	0.40 ± 0.03	1/10	569	16	4475

⁽¹⁾Área da caixa de contagem, a(caixa); dimensões de X, Y, A(X,Y); asf, fração amostral da área da grade [a(caixa)/A(X, Y)]; tsf, fração amostral da espessura da secção calculada como a razão entre a altura da caixa dividida pela espessura da secção: h/espessura da secção; ssf, fração amostral do número de secções. ⁽²⁾ Todas as avaliações foram feitas com objetiva planapocromática 60X (N.A. 1.4; D.F. 0,75 μm).

A tabela 5 contém as estimativas de volumes planimétricos unilaterais individuais e médios do hipocampo do *Cebus apella*, estimativas numéricas e de espessura das secções imunomarcadas para contagem de astrócitos. A espessura média e o respectivo desvio padrão encontrado foi de $24,86 \pm 4,99$, $24,84 \pm 5,00$ e $23,61 \pm 5,18$ para piramidal, oriens e radiatum de CA1, $24,87 \pm 4,93$, $24,87 \pm 4,65$ e $24,87 \pm 4,70$ para piramidal, oriens e radiatum de CA2/ CA3 demonstrando pequena variação entre as espessuras. Já em relação aos volumes planimétricos o valor médio e o respectivo desvio padrão estimados foram os seguintes: $11,10 \pm 2,87$ com coeficiente de erro médio (CE) de 0,035, na piramidal de CA1; $2,92 \pm 1,09$ e CE de 0,035, no oriens de CA1; $8,51 \pm 2,28$ e CE de 0,04, no radiatum de CA1 enquanto que na piramidal de CA2/CA3 foi de $16,17 \pm 2,20$ e CE de 0,047, no oriens de CA2/CA3 de $4,89 \pm 0,97$ e CE de 0,035 e no radiatum de CA2/CA3 de $12,18 \pm 1,87$ e CE de 0,06. O coeficiente de variação biológico para o volume foi de 93,29%, 99,12% e 97,77% na piramidal, oriens e radiatum de CA1 e 87,86%, 96,89% e 84,79% na piramidal, oriens e radiatum de CA2/CA3 demonstrando que em todas essas medidas a variação encontrada é fruto majoritário da variabilidade individual, validando nossos procedimentos metodológicos.

Os valores médios das estimativas do número de astrócitos, desvio padrão e CE (Scheaffer) em CA1 foram respectivamente de 343.233 ± 61.437 e 0,026 na piramidal, 169.518 ± 27.309 e 0,051 no oriens e 197.102 ± 45.525 e 0,022 no radiatum enquanto que em CA2/CA3 foi de 651.001 ± 43.646 e 0,022 na piramidal, 303.500 ± 15.570 e 0,039 no oriens e 442.218 ± 82.820 e 0,025 no radiatum. O coeficiente de variação biológico para a estimativa numérica de astrócitos foi de 96,79% na piramidal, 89,89% no oriens e 99,08% no radiatum em CA1 e 89,13% na piramidal, 40,53% no oriens e 98,07% no radiatum em CA2/CA3. Note que a contribuição pequena para a variação encontrada no stratum oriens a partir da variabilidade individual não compromete a escolha dos parâmetros experimentais utilizados para a contagem dessa camada por conta da variação metodológica induzida de apenas 4% (coeficiente Scheaffer = 0.039).

Tabela 5- Estimativas de volumes planimétricos unilaterais individuais do hipocampo do *Cebus apella*, estimativas numéricas e de espessura correspondentes de astrócitos.

Sujeitos	Espessura (µm)	Volume (mm ²)	CE	N	CE (Scheaffer)
Astrócitos					
Piramidal CA1					
MP2	22,15 ± 1,22	8,42	0,03	307.295	0,026834
MP3	29,53 ± 1,34	14,95	0,03	433.739	0,020845
MP4	28,52 ± 1,80	11,57	0,04	302.679	0,028217
MP5	19,20 ± 1,09	9,49	0,04	329.220	0,030133
Média	24,86 ± 4,99	11,1075	0,035	343.233	0,026507
SD		2,876205544		61437,76302	
CV ²		0,067051299		0,032039894	
CE ²		0,004495877		0,001026555	
CE ² /CV ²		0,067051299		0,032039894	
CVB ²		0,062555422		0,031013339	
CVB ² (%CV ²)		93,29%		96,79%	
Oriens CA1					
MP2	22,06 ± 1,02	1,73	0,03	148.569	0,052614
MP3	29,56 ± 1,34	4,12	0,04	196.569	0,038835
MP4	28,54 ± 2,29	3,53	0,03	189.359	0,051068
MP5	19,22 ± 1,77	2,34	0,04	143.574	0,06241
Média	24,84 ± 5,00	2,9275	0,035	169.518	0,051232
SD		1,091799		27.309,122	
CV ²		0,139089		0,025953	
CE ²		0,001225		0,002625	
CE ² /CV ²		0,008807335		0,101133389	
CVB ²		0,137863607		0,023328084	
CVB ² (%CV ²)		99,12%		89,89%	
Radiatum CA1					
MP2	22,04 ± 1,00	6,60	0,04	182.344	0,022558
MP3	29,40 ± 1,25	11,74	0,04	248.023	0,017393
MP4	28,41 ± 1,71	8,48	0,04	141.918	0,025036
MP5	19,40 ± 1,01	7,25	0,04	216.123	0,023654
Média	23,61 ± 5,18	8,5175	0,04	197.102	0,02216
SD		2,2854084		45525,887	
CV ²		0,071995		0,05335	
CE ²		0,0016		0,000491	
CE ² /CV ²		0,022223713		0,009204804	
CVB ²		0,07039517		0,052858965	
CVB ² (%CV ²)		97,77%		99,08%	

CVB² = CV² - CE²; CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica, N: número de redes; SD, desvio padrão.

Tabela 5 (Continuação). Estimativas de volumes planimétricos unilaterais individuais do hipocampo do *Cebus apella*, estimativas numéricas e de espessura correspondentes de secções imunomarcadas para identificação de astrócitos.

Sujeitos	Espessura (µm)	Volume (mm ²)	CE	N	CE (Scheaffer)
Piramidal CA3-CA2					
MP2	22,13 ± 1,45	14,76	0,05	669.769	0,022022
MP3	29,50 ± 1,25	17,49	0,03	658.561	0,021183
MP4	28,53 ± 1,19	13,90	0,06	588.042	0,02482
MP5	19,34 ± 1,38	18,56	0,05	687.633	0,020412
Média	24,87 ± 4,93	16,1775	0,0475	651.001	0,022109
SD		2,2056953		43.646,903	
CV ²		0,01859		0,004495	
CE ²		0,002256		0,000489	
CE ² /CV ²		0,12137214		0,108743915	
CVB ²		0,016333271		0,004006319	
CVB ² (%CV ²)		87,86%		89,13%	
Oriens CA3-CA2					
MP2	22,47 ± 1,41	3,56	0,05	280.222	0,04011
MP3	29,22 ± 1,25	5,87	0,03	312.345	0,032039
MP4	28,28 ± 2,03	5,20	0,03	311.945	0,038886
MP5	19,52 ± 1,25	4,94	0,03	309.490	0,047209
Média	24,87 ± 4,65	4,8925	0,035	303.500	0,039561
SD		0,970889		15570,24	
CV ²		0,03938		0,002632	
CE ²		0,001225		0,001565	
CE ² /CV ²		0,031107		0,594652	
CVB ²		0,038155		0,001067	
CVB ² (%CV ²)		96,89%		40,53%	
Radiatum CA3-CA2					
MP2	21,96 ± 1,62	11,73	0,05	459.100	0,02396
MP3	29,24 ± 1,21	9,82	0,05	327.278	0,02723
MP4	28,49 ± 1,26	14,20	0,08	524.964	0,024305
MP5	19,80 ± 1,76	13,01	0,06	457.532	0,028446
Média	24,87 ± 4,70	12,1875	0,06	442.218	0,025985
SD		1,875302		82.820,34	
CV ²		0,023676		0,035075	
CE ²		0,0036		0,000675	
CE ² /CV ²		0,152051		0,019251	
CVB ²		0,020076		0,0344	
CVB ² (%CV ²)		84,79%		98,07%	

CVB² = CV² - CE²; CV, coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica, N: número de redes; SD, desvio padrão.

4.3. Análise Quantitativa Comparada da Distribuição de Redes Perineuronais e Astrócitos

A comparação direta das estimativas de astrócitos e redes perineuronais nas várias camadas e áreas do hipocampo revelaram proporções significativamente diferentes. Por exemplo, quando se considera a soma do número médio de astrócitos nas camadas piramidal e oriens de CA1 em comparação ao número médio de redes estimadas em CA1 nas mesmas camadas, observa-se em média 12.2 vezes mais astrócitos do que redes enquanto que em CA3-CA2 essa proporção cai para 5.4 vezes. Não se detectou, entretanto correlação simples entre o número de redes e o número de astrócitos havendo portanto a necessidade de se aumentar o número de animais contados (hoje restrito a quatro) para explorar melhor essa possibilidade.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho estimou-se pelo fracionador óptico o número de astrócitos e de redes perineuronais nos campos hipocámpais CA1, CA2 e CA3 do *Cebus apella* encontrando-se proporcionalmente maior número desses elementos em CA2-CA3 do que em CA1. A análise dos astrócitos tendo em conta o volume de cada camada em cada região revelou que independentemente da área, é a camada piramidal a que mais concentra esses elementos. Por outro lado a contagem do número total de redes perineuronais limitada às camadas piramidal e oriens dos campos hipocámpais revelou que a despeito do volume de CA2 (duas vezes menor) o número de redes nessa área é cerca de 3 vezes maior do que o encontrado em CA1 ou CA3.

5.1 Células Gliais no Hipocampo do *Cebus apella*.

Estimativas do número de células gliais realizadas anteriormente no macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) revelaram que a camada piramidal de CA1 daquela espécie contém em média 2.25×10^6 de células gliais enquanto que a piramidal de

CA2/CA3 contem 1.05×10^6 (Christensen et al., 2007) distribuídas em volumes correspondentes de 23,45 e 7,40 mm³. Por outro lado, Guerreiro-Diniz et al., 2010 encontrou valores estimados para as camadas equivalentes do hipocampo do *Cebus apella* de 0.66×10^6 em CA1 e 0.87×10^6 para CA2/CA3 em volumes de 15.69mm³ para CA1 e 13.59mm³ para CA2-CA3. Assim a camada piramidal de CA1 e CA2-CA3 somadas na espécie *Macaca mulatta* contem 2.2 vezes mais células da glia do que a camada equivalente no *Cebus apella*. Como os macacos do Velho e do Novo Mundo divergiram em linhas evolutivas separadas cerca de 35 milhões de anos atrás (Schrage and Russo, 2003; Poux et al., 2006), o número de células da glia e os volumes das camadas hipocámpais não precisam necessariamente ser os mesmos. Realmente os volumes estimados para a camada piramidal de CA1 e CA2-CA3 e o número de células da glia em comparação aos números equivalentes no macaco Rhesus são significativamente diferentes (Christensen et al., 2007; Guerreiro-Diniz et al., 2010).

Entretanto nada se pode dizer ainda acerca do número de astrócitos no hipocampo do macaco Rhesus por não haver um único trabalho utilizando método sem viés, baseado em estereologia, que tenha utilizado marcador seletivo para essa população glial. De qualquer modo, no presente trabalho as contagens de astrócitos nas mesmas camadas e áreas de interesse foram respectivamente $0,35 \times 10^6$ em CA1 e 0.65×10^6 em CA2-CA3. Quando esses números são comparados ao número total de células da glia estimados por (Guerreiro-Diniz et al., 2010) nas camadas correspondentes, encontra-se que os astrócitos representam respectivamente 53% e 74% das células da glia em CA1 e CA2-CA3. As contagens de astrócitos limitadas às camadas de CA2-CA3 revelou que a soma do número de astrócitos (1.396.720) é quase 2 vezes maior do que o total de astrócitos estimado em CA1 (709.853) ainda que os volumes de CA2 e CA3 somados (33,26mm³) representem apenas 30% a mais do que o volume de CA1 (22,55mm³). Entretanto, em números absolutos de todas as camadas passíveis de serem distinguidas na contagem dos astrócitos no corno de Amon é a piramidal que contem o maior número deles, tanto em CA1 (343.233) quanto em CA2/CA3 (651.001), entretanto, a piramidal de CA2/CA3 possui quase o dobro de CA1. Além disso quando somadas as estimativas dos astrócitos em CA1 e CA2/CA3, a piramidal (994.234) tem um número maior de astrócitos que o estratos radiatum (639.320) ou oriens (473.018). É necessário

considerar entretanto que o volume somado das estimativas de CA1 e CA2/CA3 na piramidal foram de $27,27 \text{ mm}^3$, no radiatum de $20,71 \text{ mm}^3$ e no oriens de $7,82 \text{ mm}^3$ indicando que em números relativos é o stratum oriens o que mais concentra astrócitos no hipocampo do *Cebus apella*.

Um outro aspecto importante a ser comparado é a relação neurônio/glia para se avaliar se existe correlação estreita entre a frequência de neurônios e o número de astrócitos. Nesse caso, diferente do valor de 1.7 encontrado para as medidas realizadas na camada piramidal de CA1 do hipocampo da espécie *Macaca mulatta* (Christensen et al., 2007), a relação neurônio/glia no *Cebus apella* nessa mesma camada foi de 0.87 (Guerreiro-Diniz et al., 2010). Levando em conta essa mesma relação, agora aplicada de forma seletiva às estimativas dos astrócitos do presente trabalho e sua relação com o número de neurônios da camada piramidal (Guerreiro-Diniz et al., 2010; Guerreiro-Diniz, 2010), a relação neurônio/astrócito na camada piramidal de CA1 é de 1.61 e na piramidal de CA2-CA3 de 0.85. Importante ressaltar que a relação neurônio/astrócito cai para metade em CA2-CA3, a despeito do volume de CA2-CA3 ser 2 mm^3 menor do que o volume de CA1 (Guerreiro-Diniz et al., 2010; Guerreiro-Diniz, 2010) e do número de neurônios ser praticamente o mesmo na piramidal de CA1 em comparação à soma daqueles nas camadas piramidais de CA2-CA3. Isso sugere que não há uma correlação linear direta entre número de neurônios e número de astrócitos no hipocampo do *Cebus apella*. Realmente quando se compara o número de astrócitos nas camadas onde a ocorrência de neurônios é escassa com a piramidal onde os neurônios são freqüentes, levando-se em conta o volume de cada uma delas, encontram-se índices de $40.2 \times 10^3 / \text{mm}^3$ para a piramidal, $62 \times 10^3 / \text{mm}^3$ para o stratum oriens e $36 \times 10^3 / \text{mm}^3$ para o stratum radiatum.

5.2 Redes Perineuronais do Hipocampo do *Cebus apella*

No que concerne às redes perineuronais não há resultados que tenham se dedicado a estimar sua distribuição em primatas tornando impossível a análise comparativa dos achados do presente trabalho com o de outras espécies. Entretanto, a imensa maioria das redes perineuronais esteve concentrada nas camadas piramidal e oriens com predominância absoluta das redes do tipo 2. Além disso foi na região de CA2 que encontramos o maior número desses elementos.

Nesse contexto, os estudos funcionais dedicados a compreender a contribuição regional para as funções hipocâmpais tem se dedicado em larga extensão a CA1 e CA 3 e negligenciado CA2 (Zhao et al., 2007). CA2 tem sido descrito em todas espécies como a estreita zona celular interposta entre CA1 e CA3 e que a semelhança de CA1, não recebe aferências musgosas, possuindo marcadores neuroquímicos distintos (Seress et al., 1993; Sakurai and Kosaka, 2007). Além disso, CA2 aparenta possuir mecanismo especial de regulação da concentração de cálcio que reduz a plasticidade sináptica (Simons, 2009). Em CA2, alguns dos componentes da matriz extracelular são encontrados em maior abundância do que em CA1 e CA3 (Bruckner et al., 2003) e vários genes são diferencialmente expressos nos neurônios de CA2 (Lein et al., 2005). Se tais características são de fato reproduzidos em CA2 do hipocampo do *Cebus apella* e a maior concentração de glicosaminoglicanos é também um sinal de plasticidade sináptica reduzida (Pizzorusso et al., 2002), proteção contra a extinção de memórias (Gogolla et al., 2009) e resistência à lesão, CA2 deve representar uma região com grande relevância para estabilização de memória.

5.3. Proporções Neurônio/Glia no Hipocampo e Habilidades Cognitivas.

Tendo em vista as diferenças significantes entre a relação neurônio glia no hipocampo do *Cebus apella* e *Macaca mulatta* é interessante comparar as capacidades cognitivas dessas espécies. Para muitos investigadores as notáveis habilidades cognitivas do *Cebus apella* constituem evidência de que a despeito da grande separação filogenética a maioria de seu complexo comportamento é reconhecido nos grandes macaco assim como na sub-família Cercopithecinae que inclui o macaco Rhesus (Visalberghi et al., 1995; Frigaszy et al., 1997). Como exemplo dessa habilidades, tem sido sugerido que o macaco prego desenvolveu todas as características necessárias para o uso de ferramentas durante o comportamento exploratório em busca de comida e que essa habilidade pode ser usada para modelar o aparecimento do desenvolvimento de tecnologia em primatas humanos primitivos (Westergaard and Suomi, 1997; Cleveland et al., 2004; de Resende et al., 2008). De fato o uso de ferramentas, além das habilidades motoras de manipulação associadas, requer intenso interesse em objetos novos e uma tendência natural a explorar novos ambientes (Visalberghi, 1990) e o

reconhecimento da novidade associada à essas tarefas envolve o hipocampo e o giro denteado (Hunsaker et al., 2008; Manns and Eichenbaum, 2009; Rolls, 2010). Para avaliar esses comportamentos baseados no paradigma da novidade um número significativo de tarefas hipocampo-dependentes usando reconhecimento de objetos e memória espacial foram aplicados com sucesso ao *Cebus apella* (Janson, 1998; De Lillo et al., 2007; Poti et al., 2010) e ao *Macaca mulatta* (Bachevalier, 2008; Pascalis et al., 2009; Rolls, 2010), confirmando que ambas as espécies apresentam todos os requisitos necessários para o desenvolvimento do uso de ferramentas mesmo que em diferente extensão e proficiência. É possível que as diferenças anatômicas quantitativas encontradas em (Guerreiro-Diniz et al., 2010; Guerreiro-Diniz, 2010) e no presente trabalho possam contribuir pelo menos em parte para explicar as diferenças nas performances cognitivas encontradas nessas espécies previamente reportadas por outros autores já referidos neste trabalho.

5.4 Limitações Técnicas não Estereológicas

Um dos alvos do presente trabalho foi estimar o número de astrócitos dentro de um determinado volume de tecido equivalente às camadas do hipocampo usando investigação estereológica sem viés. Como em todos os casos onde se utiliza microscopia para realizar tais estimativas, não é possível contar todas as células dentro da região de interesse. Para contornar essa limitação e obter estimativas que se aproximem dos valores reais a partir de frações amostrais mínimas, é necessário a utilização de contagem sistemática e aleatória dos objetos de interesse incluindo a terceira dimensão. 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 and Hof, 2005). Ainda assim, o máximo que se pode pretender com esse procedimento é realizar estimativas que se aproximam ao máximo do valor esperado (Cruz-Orive, 1994; Schmitz, 1998).

Seguindo esses princípios, existem dois métodos estereológicos: o fracionador óptico já descrito e o método que estima o número total de células multiplicando a densidade média de células pelo volume da região de interesse (Schmitz and Hof, 2000). Em estudo recente, entretanto, ficou evidente que as estimativas do número total de objetos de interesse obtidas a partir do fracionador

óptico, são do ponto de vista estatístico e do ponto de vista do esforço empreendido, mais eficientes do que as estimativas a partir da densidade e volume (Schmitz and Hof, 2000) Além disso, avaliou-se igualmente várias maneiras de se estimar o erro em amostras simuladas por computador de modo a encontrar uma maneira de calcular o coeficiente de erro que mais se aproximasse do erro verdadeiro. Comparando o coeficiente de erro verdadeiro para grandes amostras simuladas por computação, com o calculado por diferentes métodos, encontrou-se que o coeficiente de Scheaffer é o que mais se aproxima do erro verdadeiro (Glaser and Wilson, 1998).

Por conta do fato de que o coeficiente de erro de Scheaffer representa a variação devida à incerteza metodológica intrínseca, é esperado e desejável que ele sempre contribua menos para a variação total do que a variação biológica. Isso é alcançado respeitando a relação: $CE^2/CV^2 < 0.5$, onde CE é o coeficiente de erro devido à incerteza metodológica intrínseca e $CV = \text{Desvio Padrão} / \text{Média}$. No presente trabalho a relação CE^2/CV^2 esteve na maioria dos casos abaixo de 0.5, minimizando a probabilidade de erros procedimentais durante as contagens (Slomianka and West, 2005). Nos casos onde isso não foi respeitado $CE^2/CV^2 = 0.59$, a variação introduzida pela metodologia equivaleu a 6% e foi acompanhada igualmente de uma variação biológica pequena, tornando a aplicação da regra sem sentido. A outra maneira que se empregou para se avaliar os erros relacionados à escolha da matriz amostral foi o cálculo da variação biológica definida como: $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (onde CE, coeficiente de erro; CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica) expresso em valor percentual do coeficiente de variação. Considera-se que o coeficiente de erro é adequado sempre que ele contribui menos do que a variação biológica para o coeficiente global de variação.

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

CONCLUSÃO

Eram objetivos do presente trabalho:

- 1) Descrever a distribuição laminar dos astrócitos e das redes perineuronais em CA1, CA2 e CA3 do *Cebus apella*;
- 2) Estimar o número total de astrócitos e das redes perineuronais presentes nas diversas camadas de CA1, CA2 e CA3 utilizando o método do fracionador óptico.

Nossos objetivos foram cumpridos e os dados colhidos introduziram conhecimento novo acerca da estrutura quantitativa do hipocampo do *Cebus apella*. Ainda que baseado em uma pequena amostra (n=4), nossas análises foram suficientes para estimar o número médio de astrócitos e de redes perineuronais e os volumes correspondentes das camadas hipocampais que os contem com coeficientes de variação aceitáveis levando em consideração a variabilidade individual expressa pelo coeficiente de variação biológica. Entretanto, uma vez que no grande grupo de primatas neotropicais este é o primeiro trabalho dedicado a quantificar os astrócitos e as redes perineuronais no hipocampo utilizando método sem viés baseado em estereologia, é imperioso que estudos comparativos envolvendo outras espécies sejam realizados para abordar com maior profundidade as relações anatômicas quantitativas com as habilidades cognitivas.

REFERÊNCIAS

- Allen, N. J. and B. A. Barres. **Neuroscience: Glia - more than just brain glue.** Nature 2009. 457(7230): 675-677.
- Amaral, D. G. **Hippocampal Neuronanatomy.** New York, Oxford University.2007
- Bachevalier, J., Nemanic, S. **Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex.** Hippocampus 2008. 8: 64-80.
- Baig, S., G. K. Wilcock, et al. **Loss of perineuronal net N-acetylgalactosamine in Alzheimer's disease.** Acta Neuropathol 2005. 110(4): 393-401.
- Blumcke, I., P. Egli, et al. **Relationship between astrocytic processes and "perineuronal nets" in rat neocortex.** Glia 1995. 15(2): 131-140.
- Bruckner, G., K. Brauer, et al. **Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain.** Glia 1993. 8(3): 183-200.
- Bruckner, G., J. Grosche, et al. **Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation.** J Chem Neuroanat 2003. 26(1): 37-50.
- Bruckner, G., J. Grosche, et al. **Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R.** J Comp Neurol 2000. 428(4): 616-629.
- Celio, M. R. and I. Blumcke. **Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system.** Brain Res Brain Res Rev 1994. 19(1): 128-145.
- Celio, M. R., R. Spreafico, et al. **Perineuronal nets: past and present.** Trends

- Neurosci 1998. 21(12): 510-515.
- Christensen, J. R., K. B. Larsen, et al. **Neocortical and hippocampal neuron and glial cell numbers in the rhesus monkey.** Anat Rec (Hoboken) 2007. 290(3): 330-340.
- Cleveland, A., A. M. Rocca, et al. **Transport of tools to food sites in tufted capuchin monkeys (Cebus apella).** Anim Cogn 2004. 7(3): 193-198.
- Cruz-Orive, L. M. **Toward a more objective biology.** Neurobiol Aging 1994. 13(3): 377-378, discussion 379-380.
- De Lillo, C., G. Spinozzi, et al. **Pattern recognition in tufted capuchin monkeys (Cebus apella): the role of the spatial organisation of stimulus parts.** Behav Brain Res 2007. 181(1): 96-109.
- de Resende, B. D., E. B. Ottoni, et al. **Ontogeny of manipulative behavior and nut-cracking in young tufted capuchin monkeys (Cebus apella): a perception-action perspective.** Dev Sci 2008. 11(6): 828-840.
- Deepa, S. S., D. Carulli, et al. **Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans.** J Biol Chem 2006. 281(26): 17789-17800.
- Dufour, V., O. Pascalis, et al. **Face processing limitation to own species in primates: a comparative study in brown capuchins, Tonkean macaques and humans.** Behav Processes 2006. 73(1): 107-113.
- Eidelberg, E. and C. A. Saldias. **A stereotaxic atlas for Cebus monkeys.** J Comp Neurol 1960. 115: 103-123.
- Faissner, A., M. Pyka, et al. **Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix.** Brain Res Rev 2010. 63(1-2): 26-38.

- Fiala, J. C. and K. M. Harris. **Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes.** J Am Med Inform Assoc 2001. 8(1): 1-16.
- Fragaszy, D., E. Visalberghi, et al. **Infant tufted capuchin monkeys' behaviour with novel foods: opportunism, not selectivity.** Anim Behav 1997. 53(6): 1337-1343.
- Gallagher, M. and P. R. Rapp. **The use of animal models to study the effects of aging on cognition.** Annu Rev Psychol 1997. 48: 339-370.
- Gardella, D., W. J. Hatton, et al. **Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic- and cryosections.** J Neurosci Methods 2003. 124(1): 45-59.
- Geinisman, Y., L. Detolledo-Morrell, et al. **Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives.** Prog Neurobiol 1995. 45(3): 223-252.
- Giaume, C., A. Koulakoff, et al. **Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions.** Nat Rev Neurosci 2010. 11(2): 87-99.
- Girgis, M. **Histochemical localization of acetylcholinesterase enzyme in the "limbic system" of the brain of the cebus monkey (Cebus apella).** Acta Anat (Basel) 1973. 84(2): 202-223.
- Glaser, E. M. and P. D. Wilson. **The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators.** J Microsc 1998. 192(Pt 2): 163-171.
- Glaser, J. R. and E. M. Glaser. **Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts.** J Chem Neuroanat 2000. 20(1): 115-126.

- Gogolla, N., P. Caroni, et al. **Perineuronal nets protect fear memories from erasure.** Science 2009. 325(5945): 1258-1261.
- Guerreiro-Diniz, C., R. B. de Melo Paz, et al. **Hippocampus and dentate gyrus of the Cebus monkey: architectonic and stereological study.** J Chem Neuroanat 2010. 40(2): 148-159.
- Hagihara, K., R. Miura, et al. **Immunohistochemical evidence for the brevican-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain.** J Comp Neurol 1999. 410(2): 256-264.
- Hartig, W., A. Derouiche, et al. **Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations.** Brain Res 1999. 842(1): 15-29.
- Hockfield, S., R. G. Kalb, et al. **Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1990. 55: 505-514.
- Hockfield, S. and R. D. McKay. **A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system.** Proc Natl Acad Sci U S A 1983. 80(18): 5758-5761.
- Howard, C. a. R., M. **"Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy."**.2005
- Hunsaker, M. R., J. S. Rosenberg, et al. **The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty.** Hippocampus 2008. 18(10): 1064-1073.
- Jabes, A., P. B. Lavenex, et al. **Quantitative analysis of postnatal neurogenesis**

- and neuron number in the macaque monkey dentate gyrus.** Eur J Neurosci 2010. 31(2): 273-285.
- Janson, C. H. **Experimental evidence for spatial memory in foraging wild capuchin monkeys, *Cebus apella*.** Anim Behav 1998. 55(5): 1229-1243.
- Keuker, J. I., P. G. Luiten, et al. **Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys.** Neurobiol Aging 2003. 24(1): 157-165.
- Koppe, G., G. Bruckner, et al. **Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain.** Cell Tissue Res 1997. 288(1): 33-41.
- Kordower, J. H., R. T. Bartus, et al. **Nerve growth factor receptor immunoreactivity in the nonhuman primate (*Cebus apella*): distribution, morphology, and colocalization with cholinergic enzymes.** J Comp Neurol 1988. 277(4): 465-486.
- Kozorovitskiy, Y., C. G. Gross, et al. **Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain.** Proc Natl Acad Sci U S A 2005. 102(48): 17478-17482.
- Kubinova, L. and J. Janacek. **Confocal microscopy and stereology: estimating volume, number, surface area and length by virtual test probes applied to three-dimensional images.** Microsc Res Tech 2001. 53(6): 425-435.
- Lein, E. S., E. M. Callaway, et al. **Redefining the boundaries of the hippocampal CA2 subfield in the mouse using gene expression and 3-dimensional reconstruction.** J Comp Neurol 2005. 485(1): 1-10.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A. **Stereological tools in biomedical research.** An Acad Bras Cienc 2003. 75(4): 469-486.
- Manns, J. R. and H. Eichenbaum. **A cognitive map for object memory in the**

- hippocampus.** Learn Mem 2009. 16(10): 616-624.
- Manocha, S. L., Shantha, T.R. and Bourne, G.H. . **A stereotavic atlas of the brain of the Cebus monkey (*Cebus apella*).** 1968.
- Matthews, R. T., G. M. Kelly, et al. **Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets.** J Neurosci 2002. 22(17): 7536-7547.
- Mayhew, R. T. a. G., H.J. **If you assume, you can make an ass out of u and me: a decade of the dissector for stereological counting of particles in 3D space.** J Anat 1996. 188: 1-15.
- Mufson, E. J., J. M. Conner, et al. **Nerve growth factor-like immunoreactive profiles in the primate basal forebrain and hippocampal formation.** J Comp Neurol 1994. 341(4): 507-519.
- Murray, E. A., T. J. Bussey, et al. **Visual perception and memory: a new view of medial temporal lobe function in primates and rodents.** Annu Rev Neurosci 2007. 30: 99-122.
- Nyengaard, J. R. and H. J. Gundersen. **Direct and efficient stereological estimation of total cell quantities using electron microscopy.** J Microsc 2006. 222(Pt 3): 182-187.
- Pascalis, O., N. M. Hunkin, et al. **Change in background context disrupts performance on visual paired comparison following hippocampal damage.** Neuropsychologia 2009. 47(10): 2107-2113.
- Peterson, D. A. **Quantitative histology using confocal microscopy: implementation of unbiased stereology procedures.** Methods 1999. 18(4): 493-507.
- Pizzorusso, T., P. Medini, et al. **Reactivation of ocular dominance plasticity in the**

- adult visual cortex.** Science 2002. 298(5596): 1248-1251.
- Poti, P., P. Kanngiesser, et al. **Searching in the middle-Capuchins' (Cebus apella) and bonobos' (Pan paniscus) behavior during a spatial search task.** J Exp Psychol Anim Behav Process 2010. 36(1): 92-109.
- Poux, C., P. Chevret, et al. **Arrival and diversification of caviomorph rodents and platyrrhine primates in South America.** Syst Biol 2006. 55(2): 228-244.
- Resende, M. C., M. C. Tavares, et al. **Ontogenetic dissociation between habit learning and recognition memory in capuchin monkeys (Cebus apella).** Neurobiol Learn Mem 2003. 79(1): 19-24.
- Rhodes, K. E. and J. W. Fawcett. **Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS?** J Anat 2004. 204(1): 33-48.
- Rolls, E. T. **A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus.** Behav Brain Res 2010.
- Rosene, D. L. a. V. H., G. W. **The Hippocampal Formation of the Primate Brain: a review of some comparative aspects of cytoarchitecture and Connections.**1987
- Sakurai, O. and T. Kosaka. **Nonprincipal neurons and CA2 pyramidal cells, but not mossy cells are immunoreactive for calcitonin gene-related peptide in the mouse hippocampus.** Brain Res 2007. 1186: 129-143.
- Schmitz, C. **Variation of fractionator estimates and its prediction.** Anat Embryol (Berl) 1998. 198(5): 371-397.
- Schmitz, C. and P. R. Hof. **Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach.** J Chem Neuroanat 2000. 20(1): 93-114.
- Schmitz, C. and P. R. Hof. **Design-based stereology in neuroscience.**

- Neuroscience 2005. 130(4): 813-831.
- Schrago, C. G. and C. A. Russo. **Timing the origin of New World monkeys.** Mol Biol Evol 2003. 20(10): 1620-1625.
- Seress, L., A. I. Gulyas, et al. **Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation.** J Comp Neurol 1993. 337(2): 208-230.
- Shu, S. Y., G. Ju, et al. **The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system.** Neurosci Lett 1988. 85(2): 169-171.
- Simons, S. B., Escobedo, Y., Yasuda, R., Dudek, S.M. **Regional differences in hippocampal calcium handling provide a cellular mechanism for limiting plasticity.** Proc Natl Acad Sci U S A 2009. 106: 14080-14084.
- Slomianka, L. and M. West. **Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats.** Neuroscience 2005. 136: 757–767.
- Slomianka, L. and M. J. West. **Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats.** Neuroscience 2005. 136(3): 757-767.
- Spinozzi, G., T. Lagana, et al. **Hand use by tufted capuchins (Cebus apella) to extract a small food item from a tube: digit movements, hand preference, and performance.** Am J Primatol 2007. 69(3): 336-352.
- Squire, L. R., C. E. Stark, et al. **The medial temporal lobe.** Annu Rev Neurosci 2004. 27: 279-306.
- Sugahara, K., T. Mikami, et al. **Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate.** Curr Opin Struct Biol 2003. 13(5):

612-620.

Swanson, L. W. **The Hippocampus and The Concept of Limbic System**. London, Academic Press. 1983

Tavares, M. C., L. Aguiar, et al. **Effect of practice on hand preference on a color visual discrimination task by capuchin monkeys (Cebus apella)**. *Percept Mot Skills* 2002. 95(3 Pt 2): 1027-1034.

VanMarle, K., J. Aw, et al. **How capuchin monkeys (Cebus apella) quantify objects and substances**. *J Comp Psychol* 2006. 120(4): 416-426.

Visalberghi, E. **Tool use in Cebus**. *Folia Primatol (Basel)* 1990. 54(3-4): 146-154.

Visalberghi, E., D. M. Fragaszy, et al. **Performance in a tool-using task by common chimpanzees (Pan troglodytes), bonobos (Pan paniscus), an orangutan (Pongo pygmaeus), and capuchin monkeys (Cebus apella)**. *J Comp Psychol* 1995. 109(1): 52-60.

Wang, D. D. and A. Bordey. **The astrocyte odyssey**. *Prog Neurobiol* 2008. 86(4): 342-367.

Wegner, F., W. Hartig, et al. **Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex**. *Exp Neurol* 2003. 184(2): 705-714.

Weibel, E. R. **Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods**. *J Microsc* 1989. 155(Pt 3): 393-403.

West, M. J. **Design-based stereological methods for counting neurons**. *Prog Brain Res* 2002. 135: 43-51.

West, M. J., L. Slomianka, et al. **Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the**

- optical fractionator.** Anat Rec 1991. 231(4): 482-497.
- Westergaard, G. C. and S. J. Suomi. **Capuchin monkey (Cebus apella) grips for the use of stone tools.** Am J Phys Anthropol 1997. 103(1): 131-135.
- Yamaguchi, Y. **Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix.** Cell Mol Life Sci 2000. 57(2): 276-289.
- Zaremba, S., A. Guimaraes, et al. **Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301.** Neuron 1989. 2(3): 1207-1219.
- Zhao, M., Y. S. Choi, et al. **Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons.** J Neurosci 2007. 27(44): 12025-12032.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)