



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR

ROBERTA BENTES DE MELO PAZ

**Estudos Estereológicos da Distribuição de Astrócitos e Redes
Perineuronais no Giro Denteado do *Cebus apella*.**

BELÉM-PA
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA BENTES DE MELO PAZ

**Estudos Estereológicos da Distribuição de Astrócitos e Redes
Perineuronais no Giro Denteado do *Cebus apella*.**

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.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Cristovam W. Picanço Diniz

BELÉM-PA

2010

ROBERTA BENTES DE MELO PAZ

**Estudos Estereológicos da Distribuição de Astrócitos e Redes
Perineuronais no Giro Denteado do *Cebus apella*.**

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

Prof. Dra. Lucídia Santiago
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Dedico este trabalho científico aos meus pais e ao meu esposo, pelo incentivo e força, fundamentais durante o período de realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de uma forma direta e indireta tiveram algum papel na elaboração deste trabalho. Gostaria de agradecer a grande oportunidade oferecida pelo Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço-Diniz, bem como aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Neurodegeneração e Infecção, pela troca de experiência e apoio, entre eles Renata Reis, Carlos Santos Filho, Marina Almeida, Lane, João Bento Torres, Roseane Borner, Gisele Alves e, especialmente, Mayra Hamad, grande parceira e amiga durante todas as fases deste trabalho.

Ao meu esposo, Emanuel Paz, que pacientemente soube compreender minha ausência em tantos momentos, me incentivou, e me deu a força necessária para persistir.

Aos meus pais, Luiz e Maria da Conceição, os maiores exemplos de força que alguém poderia ter.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE QUADROS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Giro Denteado	14
1.1.1. Camada granular.....	14
1.1.2. Camada molecular	15
1.1.3. Camada polimórfica	16
1.2. Astrócitos	17
1.3. Redes Perineuronais.....	18
1.4. Estereologia através do Método do Fracionador Óptico	20
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Animais, perfusão e corte.....	25
3.2. Imunohistoquímica e histoquímica.....	25
3.2.1. Imunohistoquímica para marcação de astrócitos	25
3.2.2. Histoquímica para marcação de redes perineuronais	27
3.3. Avaliação estereológica utilizando o método do fracionador óptico	28
4. RESULTADOS	31
4.1. Distribuição de astrócitos no giro denteado do <i>Cebus Apella</i>	32
4.1.1. Análise qualitativa da distribuição de astrócitos	32
4.1.2. Quantificação estereológica de astrócitos do giro denteado do <i>Cebus apella</i>	35
4.2. Distribuição de redes perineuronais no giro denteado do <i>Cebus apella</i>	38
4.2.1. Análise qualitativa da distribuição de redes perineuronais	38

4.2.2.	Quantificação estereológica de redes perineuronais do giro denteado	41
5.	DISCUSSÃO	47
5.1.	Distribuição de astrócitos no Giro Denteado do <i>Cebus apella</i>	47
5.2.	Distribuição de redes perineuronais no Giro Denteado do <i>Cebus apella</i>	48
5.3.	Ambiguidades não Estereológicas nas Estimativas	50
5.4.	Anatomia Funcional do Hipocampo e Distribuição Laminar de Astrócitos e Redes Perineuronais.....	50
6.	CONCLUSÃO	53
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

Investigações anatômicas usando métodos estereológicos para quantificar astrócitos e redes perineuronais no giro denteado de primatas do Novo Mundo não estão disponíveis. O objetivo do presente trabalho é quantificar a distribuição laminar dos astrócitos e das redes perineuronais no giro denteado 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. As secções foram imunoreagidas para a proteína fibrilar ácida glial (GFAP) ou reagidas para detecção histoquímica dos sítios de ligação da lectina *Wisteria floribunda* biotinilada. E contracoradas pelo cresil violeta. Empregamos o método do fracionador óptico para estimar o número de astrócitos e de redes perineuronais do giro denteado do macaco prego. A distribuição laminar dos astrócitos em relação ao volume das camadas revelou um padrão assimétrico de distribuição com os maiores valores daqueles sendo encontrados na camada polimórfica seguida camada molecular interna, enquanto que as estimativas do número de redes perineuronais revelou sua maior concentração na camada granular seguida da camada polimórfica. Nós sugerimos que as camadas de grande atividade sináptica onde o número de neurônios é escasso parece concentrar um maior número de astrócitos enquanto que as camadas ricas em corpos celulares neuronais concentra os números mais altos de redes perineuronais.

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

ABSTRACT

Anatomical stereological investigations of perineuronal nets and astrocytes of the dentate gyrus 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 dentate gyrus 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. 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 dentate gyrus 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 polymorphic layer followed by the internal molecular layer whereas perineuronal nets estimations revealed a higher concentration in the granular followed by the polymorphic layer. We suggest that active synaptic layers of the dentate gyrus where cell bodies are scarce concentrate a higher number of astrocytes whereas neuronal cell bodies dentate layers concentrate perineuronal nets.

Key-words: Astrocytes, perineuronal net, Dentate Gyrus, *Cebus apella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do fracionador óptico	22
Figura 2	Contornos do giro denteado do <i>Cebus apella</i>	31
Figura 3	Secção do hemisfério esquerdo do <i>Cebus apella</i>	32
Figura 4	Astrócitos imunomarcados com GFAP	33
Figura 5	Distribuição de astrócitos nas diferentes camadas do giro denteado...	34
Figura 6	Tipos de redes perineuronais.....	38
Figura 7	Distribuição de redes perineuronais no giro denteado	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Protocolo utilizado para imunohistoquímica para GFAP.....	27
Quadro 2	Protocolo utilizado para contracoloração com cresil violeta	27
Quadro 3	Protocolo utilizado para histoquímica com Lectina wisteria floribunda..	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros experimentais e número de astrócitos estimado para o giro denteado do <i>Cebus apella</i>	36
Tabela 2	Estimativas numéricas da quantidade de astrócitos, espessuras e volumes estimados para o giro denteado do <i>Cebus apella</i>	37
Tabela 3	Parâmetros experimentais e estimativa do número total de redes perineuronais	43
Tabela 4	Estimativas numéricas da quantidade de redes perineuronais	44
Tabela 5	Estimativas numéricas da quantidade de redes perineuronais do tipo 1 e do tipo 2	45

1. INTRODUÇÃO

A formação hipocampal é uma estrutura localizada no lobo temporal medial, no assoalho do ventrículo lateral, que desempenha papel importante no processo de formação e consolidação de memória (Scoville and Milner, 1957; Friedman and Goldman-Rakic, 1988; Zola-Morgan et al., 1992).

O termo formação hipocampal compreende um grupo de regiões citoarquiteticamente diferentes adjacentes: giro denteado, hipocampo propriamente dito (Corno de Amon: CA1, CA2 e CA3), subiculum, presubiculum, parasubiculum, e o córtex entorrinal (Insausti, 1993; El-Falougy and Benuska, 2006; Andersen et al., 2007). Rosene e Van Hoesen (1987) incluem no termo formação hipocampal apenas as regiões allocorticais, ou seja, o hipocampo propriamente dito, o giro denteado (GD) e o subiculum (Rosene and Van Hoesen, 1987).

A formação hipocampal é alongada e seu eixo longitudinal se estende do núcleo septal do prosencéfalo basal rostródorsalmente, acima e atrás do diencéfalo, até o início do lobo temporal caudoventralmente, formando um semicírculo ao redor do tálamo (Duvernoy, 2005).

Existem alguns estudos quantitativos sobre a distribuição de neurônios na formação hipocampal utilizando o macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (Gazzaley et al., 1997; Keuker et al., 2003; Christensen et al., 2007); porém, não foram utilizados marcadores seletivos em estimativas estereológicas. O cenário é mais restrito ainda no que concerne a estimativas estereológicas do número de células da glia e das redes perineuronais e até o momento, há apenas duas publicações utilizando estereologia em primatas do Novo Mundo estimando o número de neurônios do giro denteado no *Calitrix jachus* (Kozorovitskiy et al., 2005) e no *Cebus apella* (Diniz et al., 2010). Dessa forma é relevante empreender esforço para estimar número de células da formação hipocampal em macacos do Novo Mundo sendo este o primeiro trabalho a estimar o número de astrócitos e de redes perineuronais no giro denteado do *Cebus apella* empregando marcadores seletivos.

1.1. Giro Denteado

O giro denteado (GD) é uma região allocortical, sendo composta por três camadas: granular, molecular e polimórfica. É separado pela fissura hipocampal das áreas CA1, CA2 e parte de CA3 do hipocampo propriamente dito, e separado dorsalmente das fibras da fímbria pela fissura fimbriodenteada (Rosene and Van Hoesen, 1987).

De acordo com Seress (2007), o GD apresenta diferenças entre espécies, como: citoarquitetura geral, número de células, anatomia das células principais, neurônios da circuitaria local, conteúdo neuroquímico dos neurônios, aferências e eferências (Seress, 2007).

As principais aferências do GD são oriundas do córtex entorrinal, através da via perfurante, fazendo sinapses com os dendritos das células granulares situados na camada molecular do giro denteado (Ramón y Cajal, apud (Amaral et al., 2007).

1.1.1. Camada granular

A camada de células principais do GD é a camada granular, na qual primariamente estão os corpos das células granulares densamente justapostos, formando uma camada compacta de fácil distinção, que é subdividida nas lâminas suprapiramidal (acima de CA3, entre CA3 e CA1, separada pela fissura hipocampal), infrapiramidal (abaixo de CA3, oposta à anterior) e crista (ápice que conecta as duas lâminas) (Amaral et al., 2007).

No GD humano e do macaco, a camada granular apresenta várias convoluções profundas; além disso, as camadas granular e molecular possuem variações substanciais em sua espessura, havendo variação no comprimento dos dendritos apicais das células granulares conforme a localização (Seress, 2007).

As células granulares têm soma elíptico e sua árvore de dendritos apicais espinhosos em forma de cone invade a camada molecular, em direção à sua porção superficial, sendo que a maioria dos topos distais acaba na fissura hipocampal ou na superfície ventricular (Andersen et al., 2007).

Os neurônios granulares são os únicos neurônios do GD que inervam outra área hipocampal. Através de sua superfície basal, eles emitem axônios não mielinizados que atravessam a camada polimórfica e cursam pelo stratum lucidum de CA3, inervando os dendritos proximais dos neurônios piramidais de CA3 através de terminais sinápticos gigantes pertencentes as fibras musgosas (Andersen et al., 2007; Leranth and Hajszan, 2007). Além dos neurônios piramidais de CA3, as fibras musgosas inervam as células musgosas da camada polimórfica do GD através de sinapses “en passant” formadas por seus grandes botões pré-sinápticos. Adicionalmente, os axônios das fibras musgosas emitem colaterais que se ramificam intensamente e formam muitas sinapses com células da camada polimórfica do GD (Amaral et al., 2007).

Junto à superfície profunda da camada granular, no limite entre as camadas granular e polimórfica, encontram-se as células piramidais em cesta. Estes interneurônios possuem soma em formato de pirâmide e seus axônios formam plexos pericelulares que envolvem e inervam os corpos das células granulares. Seu único dendrito principal apical é desprovido de espinhos e se projeta para a camada molecular, onde se ramifica; além deste, emite vários dendritos basais principais que se ramificam e se estendem para a camada polimórfica (Andersen et al., 2007).

Os terminais do plexo em cesta, que é denso e limitado à camada granular, são GABAérgicos e formam sinapses simétricas e inibitórias com as células granulares, principalmente em seu soma e eixo proximal do dendrito apical (Amaral et al., 2007).

1.1.2. Camada molecular

A camada molecular possui poucas células e é ocupada principalmente pelos dendritos das células granulares, em cesta e polimórficas, pelas fibras da via perforante e de inputs extrínsecos diversos, além de interneurônios (Amaral et al., 2007; Andersen et al., 2007). Profundamente na camada molecular, encontram-se as células MOPP (molecular layer perforant path-associated cell, ou, célula da camada molecular associada à via perforante), com soma triangular ou multipolar, que origina um axônio que produz um plexo terminal substancial basicamente limitado aos 2/3 externos da molecular; possui dendritos sem espinhos que permanecem, geralmente, na camada molecular (Andersen et al., 2007).

Imediatamente adjacente ou dentro da porção superficial da camada granular, estão as células axo-axônicas, cujos axônios adentram a camada granular, onde colateralizam abundantemente e formam sinapses simétricas com os segmentos iniciais dos axônios das células granulares; são imunorreativos para marcadores de neurônios GABAérgicos e seus dendritos permanecem na camada molecular (Andersen et al., 2007).

1.1.3. Camada polimórfica

A camada polimórfica ou hilo do GD está confinada subjacente à camada granular, possuindo vários tipos celulares; o mais importante é a célula musgosa, que possui soma grande e triangular ou multipolar, originando três ou mais dendritos de grosso calibre, que se ramificam e se estendem por longas distâncias dentro da camada polimórfica, podendo eventualmente atravessar a camada granular e atingir a molecular (Amaral et al., 2007).

Os dendritos proximais das células musgosas são encobertos de espinhos grandes, densos e complexos (thorny excrescences), que são sítios de terminação das fibras musgosas; os dendritos distais possuem espinhos pedunculados típicos em menor densidade. Os axônios das células musgosas, que são imunorreativas para glutamato, projetam para o terço interno da camada molecular do GD ipsilateral e contralateral, fazendo sinapses assimétricas com os dendritos das células granulares. Assim, as células musgosas aparentam ser a principal fonte de projeções excitatórias associacionais/comissurais para o GD (Andersen et al., 2007).

Também estão presentes na camada polimórfica, as células HIPP (hilar perforant path-associated cell), cujos axônios inervam os dendritos das células granulares, através de sinapses simétricas provavelmente inibitórias. Além dessas, encontram-se as células hilares comissurais de associação conhecidas pela sigla HICAP (do inglês hilar comissural-associational pathway-related cells), cujos axônios atravessam a camada granular e se ramificam abundantemente no terço interno da camada molecular (Andersen et al., 2007).

1.2. Astrócitos

Astrócitos são células gliais especializadas, presentes em todo o SNC, exercendo várias funções essenciais complexas no SNC saudável; no SNC lesionado, atuam através de resposta conhecida como astrogliose reativa, patognomônica em lesões estruturais (Sofroniew and Vinters, 2010).

Uma das funções astrocitárias conhecidas há mais tempo é o suprimento de substratos de energia para neurônios; para isso, os astrócitos ocupam posições estratégicas entre os neurônios e capilares sanguíneos, tendo papel fundamental na relação entre atividade neuronal e consumo cerebral de glicose (Magistretti, 2006). Atuam no fornecimento de substratos metabólicos para neurônios glutamatérgicos quando a atividade neuronal indica aumento na demanda energética; tal mecanismo envolve a recaptação de glutamato acoplado ao Na^+ pelos astrócitos, ativação da ATPase Na^+/K^+ , com conseqüente captação de glicose do sangue e glicólise, resultando na liberação astrocitária de lactato, suprimindo a demanda energética neuronal (Magistretti, 2006).

Exercem, também, influência na excitabilidade neuronal e transmissão sináptica através da liberação de moléculas neuroativas, como glutamato, que é essencial no controle da função neuronal, D-serina e ATP (Halassa et al., 2007; Lee and Haydon, 2007). Além disso, realizam recaptação do glutamato, para conter os níveis do neurotransmissor (Lee and Haydon, 2007).

Os astrócitos também secretam fatores solúveis como trombospondinas e colesterol, que influenciam a formação de espinhos e maturação sináptica (Ullian et al., 2004; Christopherson et al., 2005).

No hipocampo, mais de 50% das sinapses excitatórias são associadas, em graus variados, com processos astrocitários; um único astrócito pode estar relacionado a aproximadamente 100.000 contatos sinápticos, sugerindo sua participação na dinâmica das sinapses e das redes neuronais (Ventura and Harris, 1999; Bushong et al., 2002).

Ao investigar a dinâmica envolvendo os processos astrocíticos e espinhas dendríticas, observou-se que, dentro de minutos, ocorre extensão e retração dos processos astrocitários próximo às espinhas dendríticas, confirmando-se que as membranas astrocitárias estão associadas intimamente com estes, com os quais parecem entrar em contato (Haber et al., 2006).

Os astrócitos podem ser divididos em dois subgrupos: astrócitos protoplasmáticos ou fibrosos. Os astrócitos protoplasmáticos estão presentes em toda a substância cinzenta, possuem vários ramos proximais, que originam muitos processos ramificados distribuídos uniformemente em forma globoide. O tipo fibroso é encontrado na substância branca e possui muitos processos longos com aparência de fibra. Ambos os tipos contactam vasos sanguíneos e formam junções em fenda (do inglês gap junctions) entre processos distais de astrócitos vizinhos; enquanto os prolongamentos do subtipo protoplasmático envolvem sinapses, os do tipo fibroso contatam nodos de Ranvier (Sofroniew and Vinters, 2010).

Dada a influência dos astrócitos no SNC saudável e patológico, é de extrema importância o conhecimento da sua distribuição no SNC e no caso de animais utilizados em ensaios comportamentais envolvendo aprendizado e memória, no hipocampo e no giro denteado. Este trabalho é pioneiro na caracterização da distribuição laminar e quantificação de astrócitos do giro denteado de um primata do Novo Mundo, o *Cebus apella*, e será importante fonte de informação para estudos futuros relacionados a anatomia quantitativa do giro denteado de primatas neotropicals.

1.3. Redes Perineuronais

Rede perineuronal (RP) é o nome dado à uma especialização da matriz extracelular que envolve algumas populações neuronais no sistema nervoso central (SNC); possui em sua composição uma mistura extremamente complexa de proteoglicanos, tenascina, fibronectina e hialuronan, que podem estar dispersos na neurópila ou formar estruturas bem organizadas envolvendo corpos neuronais, dendritos e segmentos axonais (Deepa et al., 2006).

A matriz extracelular se localiza no SNC predominantemente nos espaços intercelulares, entre as células da glia e neurônios, podendo-se identificar histologicamente três tipos de matriz extracelular: (1) matriz difusa, dispersa em todo o SNC, (2) moléculas de matriz associadas à superfície celular e (3) matriz organizada em densas redes perineuronais, envolvendo alguns neurônios nos locais de contato sináptico (Deepa et al., 2006).

As RPs estão presentes em virtualmente todo o SNC; porém, estão distribuídas desigualmente, circundando apenas subtipos neuronais. Há três tipos

neurônais indicados na marcação por *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) e coincidentemente as redes perineuronais são classificadas em três tipos distintos, de acordo com suas características morfológicas. As redes do tipo 1 tem contorno nítido e são associadas com neurônios não piramidais, as células em cesta; tem aparência de uma treliça ao redor do corpo celular, parte proximal dos dendritos e no segmento inicial dos axônios. As redes do tipo 2 envolvem células piramidais, possuem estrutura delicada e marcação fraca. As redes do tipo 3 não possuem contorno morfológico claro, são mais densas, difusas ao redor do soma neuronal e dendritos proximais e altamente marcadas com *Wisteria floribunda*, têm aparência de malha de algodão (Wegner et al., 2003).

A matriz extracelular, além de coordenar funções celulares, como proliferação, migração e diferenciação morfológica e bioquímica, no sistema nervoso, também coordena a sinaptogênese e a atividade sináptica, interferindo na plasticidade sináptica através de interações com moléculas de reconhecimento de superfície celular, receptores ionotrópicos e metabotrópicos e canais iônicos (Dityatev and Schachner, 2003).

As redes perineuronais isolam e estabilizam as sinapses existentes e previnem a formação de novos contatos sinápticos (Yamaguchi, 2000).

O proteoglicano sulfato de condroitina (PSC) é um componente importante das redes perineuronais, envolvendo sinapses perisomáticas, estabilizando ou proibindo nova formação de sinapse; diferentes PSCs parecem estar envolvidos em estágios distintos da potenciação de longa duração (LTP) (Dityatev and Schachner, 2003).

As RPs têm característica aniônica, participando da manutenção da homeostase iônica local no ambiente neuronal; os PSCs teriam função protetora contra o estresse oxidativo induzido pelos íons metálicos Al, Fe, Cu e Zn. As RPs também desempenhariam função protetora contra ambientes excitotóxicos (Karetko and Skangiel-Kramska, 2009).

Os neurônios e as células da glia são responsáveis pela produção dos componentes das RPs; os neurônios produzem os proteoglicanos fosfacan, brevican e neurocan, enquanto a glia produz tenascina, versican, hialuronan e neurocan, que é produzido principalmente por astrócitos reativos (Matsui et al., 2002; Seidenbecher et al., 2002; Jones et al., 2003; Hayashi et al., 2005)

A distribuição das RPs no giro denteado de primatas do novo mundo ainda não foi descrita, é inédita portanto a quantificação estereológica de RPs no GD do *Cebus apella*, um primata neotropical usado amplamente em ensaios cognitivos de aprendizado e memória. Para quantificar nossos achados adotamos método sem viés denominado fracionador óptico baseado em princípios estereológicos.

1.4. Estereologia através do Método do Fracionador Óptico

O cérebro possui estrutura complexa e dinâmica, o conhecimento de sua morfologia e aspectos quantitativos é extremamente importante para a compreensão de processos normais e patológicos. Na medida em que os primatas são utilizados como modelos experimentais em diversos estudos comportamentais na tentativa de se conhecer mais sobre o SNC, sua circuitaria e suas repostas a lesões, é importante o conhecimento quantitativo sem viés das populações celulares.

O termo estereologia foi originalmente criado para definir uma técnica de análise de estruturas que fornece interpretação tridimensional baseada em observações de secções bidimensionais, permitindo amostragem precisa, livre de viés decorrente de diferenças na forma, tamanho e orientação dos objetos (Weibel, 1981); Sterio, 1984 apud (Jinno and Kosaka, 2006).

Entretanto, atualmente, com o uso da estereologia baseada em design, muitos métodos usam secções tridimensionais. Na estereologia baseada em design, as sondas e os esquemas de amostragem são definidos antecipadamente, não importando o tamanho, forma, orientação espacial, e distribuição espacial das células de interesse, eliminando fontes potenciais de erro sistemático (West, 2002).

O método do fracionador óptico representa uma combinação de um esquema de amostra fracionada com a sonda tri-dimensional, o dissector óptico (Howard e Reed, 2005; (Keuker et al., 2001). Com o fracionador, é feita a contagem de células encontradas em dissectores ópticos que foram amostrados sistematicamente em secções seriais (Glaser and Wilson, 1998).

Com o método do fracionador óptico, é realizada a contagem de células de uma fração conhecida da região de interesse, com uma amostra aleatória sistemática e uniforme (SURS, systematic and uniform random sample) (Christensen et al., 2007). O fracionador óptico não requer delimitações rigorosas da área de

interesse e não é afetado pela retração ou expansão do tecido, eliminando importantes fontes de viés (Howard and Reed, 1998).

É realizada uma amostragem sistemática das secções seriais que contém a população celular de interesse; seleciona-se aleatoriamente uma secção inicial e se procede à contagem nesta e nas secções subseqüentes com um intervalo predefinido entre as mesmas. A contagem é feita em amostra sistemática com dissectores ópticos de tamanho pré-fixado, espaçados sistematicamente na região de interesse, que pode ser delimitada com objetivas de baixo aumento (West e Gundersen, 1990, apud (Glaser and Wilson, 1998).

Se houver manipulação arbitrária para que o tamanho de uma amostra se torne constante, a estimativa estereológica não é livre de viés, devendo sempre ser enfatizada a amostragem randômica uniforme (Yang et al., 2000).

O método é considerado apropriado para a quantificação de secções imunomarcadas, pois geralmente utiliza para contagem secções espessas tridimensionais (Jinno and Kosaka, 2006). A utilização de marcação seletiva aumenta a acurácia da estimativa, visto que, no fracionador óptico, uma das fontes de erro se encontra na possibilidade identificação ambígua do objeto de interesse.

A contagem é efetivada conforme três frações de amostragem: (1) a proporção entre as secções da amostra e as secções que contém a região de interesse, ou ssf (section sample fraction); (2) a fração conhecida da espessura da secção, ou tsf (thickness sample fraction) e (3) a fração conhecida da área seccional utilizada na contagem, entre as secções da amostra, ou asf (area sample fraction). A fração da área de amostragem (asf) é o quociente da área da caixa de contagem do dissector óptico [$a(\text{caixa})$] pela área da grade [$A(\text{passo } x, y)$]. A fração da espessura da amostragem (tsf) é determinada pela razão da altura do dissector óptico (h) pela espessura medida da secção (t) (figura 2) (Keuker et al., 2001).

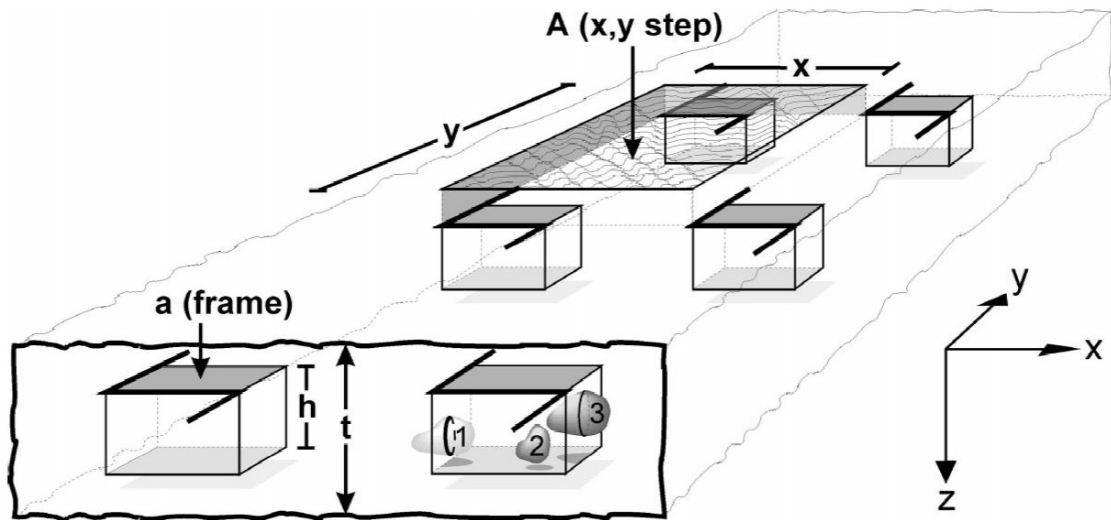


Figura 1: Representação esquemática de uma secção com os itens de contagem do dissecador óptico. O plano x, y é o plano seccional, longitudinal; o eixo z é o plano transversal da secção. A superfície de corte grossieiro acima [A (passo x, y)] representa a área de um quadrante da matriz, no qual o dissecador óptico imaginário se posiciona no canto inferior esquerdo e é movido para o próximo a cada caixa de contagem (local de amostragem). São demonstrados o asf [asf = a(caixa) / A(passo x, y)] e o tsf (tsf = h / t). As linhas mais escuras das caixas de contagem são as linhas de exclusão. h, altura do dissecador óptico; t, espessura da secção; a(frame), área da caixa de contagem do dissecador óptico (Keuker et al., 2001).

O número total estimado do objeto de interesse (N) de uma estrutura cerebral é obtido pela multiplicação dos inversos das três frações de amostragem descritas acima (ssf, asf e tsf) pelo número total de partículas contadas ($\sum Q$) na região de interesse, conforme fórmula abaixo (Keuker et al., 2001).

$$N = \sum Q^{-} \cdot \frac{1}{ssf} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{tsf}$$

Onde,

N – número total de objetos de interesse

$\sum Q$ – número de partículas contadas

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

asf – “area sampling fraction” = área da caixa de contagem / área matriz (x,y), ou asf = a(caixa) / A(passo x, y)

tsf – “tissue sampling fraction” = altura da caixa de contagem / espessura da secção, ou tsf = h / t.

A espessura local da secção (t) deve ser conhecida em uma fração suficientemente grande dos locais de amostragem caso ocorra deformação

homogênea não-uniforme do tecido na direção do eixo Z (Dorph-Petersen et al., 2001). Neste trabalho, a espessura local da secção foi medida em todas as caixas de contagem.

É necessária a aplicação de algumas regras de contagem para evitar vieses na quantificação de partículas 3-D. Para que cada objeto de interesse seja contado apenas uma vez e com a mesma probabilidade na área tridimensional, apesar de diferenças de formato e tamanho, há dois planos de exclusão e dois planos de inclusão (Tomori et al., 2001).

A caixa de contagem constitui duas das três dimensões do dissector óptico (planos x e y). Utilizando objetivas de grande abertura numérica, move-se o plano focal através da secção no eixo Z em distâncias conhecidas, do topo até a base da espessura da secção, dissecando a amostra opticamente. Devem ser contadas apenas as partículas que estejam em foco dentro da sonda 3-D, podendo tocar os planos de inclusão, e que não sejam intersectadas pelos planos de exclusão (Tomori et al., 2001; Christensen et al., 2007). Na figura 1, acima, deveriam então ser contados apenas os objetos 2 e 3, já que o objeto 1 cruza o plano de exclusão à direita.

O método do fracionador óptico foi utilizado neste trabalho para a quantificação de astrócitos e de redes perineuronais presentes no giro denteado do *Cebus apella*, marcados seletivamente por imunohistoquímica para proteína ácida fibrilar glial e por histoquímica para lectina *Wisteria floribunda*, respectivamente; de modo que não houve ambiguidade na identificação dos objetos de interesse, por estarem seletivamente marcados, nem na delimitação das camadas do GD, já que as secções foram contracoradas com a técnica de Nissl.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Proporcionar novas informações a respeito do giro denteado do *Cebus apella*, para fornecer base de conhecimento para estudos futuros utilizando a espécie como modelo em ensaios comportamentais envolvendo tarefas dependentes do giro denteado e do hipocampo.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar a distribuição de astrócitos e redes perineuronais nas camadas do giro denteado do *Cebus apella*;
- 2) Quantificar os astrócitos e redes perineuronais presentes nas camadas do GD utilizando estereologia com o método do fracionador óptico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais, perfusão e corte

A amostra compreendeu 04 (quatro) macacos prego adultos (*Cebus apella*), cedidos pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), alojados no biotério do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, e alimentados com dieta à base de frutas e legumes. Nenhum deles apresentava transtornos neurológicos observáveis.

Os animais foram profundamente anestesiados com cetamina e xilazina (30 mg/kg e 0,8 mg/kg, respectivamente) e, em seguida, perfundidos transcordialmente com solução salina heparinizada 0,9% por 10 minutos, seguida por 4 a 6 litros de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2 a 7,4); após craniotomia, os encéfalos foram armazenados em paraformaldeído 2% para pós-fixação e, de 24 a 48 horas após a perfusão, os hemisférios esquerdos foram seccionados a 70 µm de espessura no plano coronal, utilizando vibrátomo (Microm®, HM 650 V).

3.2. Imunohistoquímica e histoquímica

Realizou-se imunohistoquímica para GFAP (iniciais das palavras inglesas Glial fibrillary acidic protein) com anticorpo dirigido contra a proteína ácida fibrilar glial para marcação de astrócitos e histoquímica com lectina *Wisteria floribunda* (LWF) para marcação de redes perineuronais. Para cada imunohistoquímica e histoquímica, foi utilizada uma amostra de 1:10, com intervalo de 700 µm (10 secções) entre sucessivas secções.

3.2.1. Imunohistoquímica para marcação de astrócitos

A imunohistoquímica para GFAP (Glial fibrillary acidic protein) foi realizada para marcar astrócitos, utilizando como anticorpo primário Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (Clone GA5, Chemicon/Millipore), diluído em salina tamponada em fosfato 0,1 M (PBS) na razão de 1:800. Como anticorpo secundário, foi utilizado Biotinilated Anti-mouse IgG / Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc. Burlingame), na

concentração de 4 µl/ml de anticorpo secundário em salina tamponada em fosfato (PBS) 0,1 M pH 7,2-7,4.

As secções foram pré-tratadas por 60 minutos em solução de ácido bórico 0,2M pH 9,0 a 70°C, e mantidas imersas em agitação constante por 12 horas em tampão Tris-EDTA; após esse período, lavou-se as secções com salina tamponada em fosfato empregando o detergente Triton a 5% (PBST 5%) para aumentar a permeabilidade do tecido; seguiu-se imersão de 10 minutos em solução de metanol adicionada de peróxido de hidrogênio a 1%. Após lavagem em PBS, pH 7.2-7.4, incubou-se no anticorpo primário contra GFAP, com os cortes permanecendo em agitação constante por 72 horas. Após a retirada do anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS e incubados no anticorpo secundário biotilado por 12 horas.

Posteriormente, as secções foram lavadas novamente com PBS e incubadas em complexo avidina-biotina (ABC, Avidin-Biotin Complex, Vector Laboratories) por 1 hora; após lavagem com tampão fosfato 0,1 M pH 7,2-7,4 (PB), as secções foram imersas por 5 minutos em tampão acetato 0,1 M. A revelação foi efetivada com solução GND, de Diaminobenzidina/Níquel A preparação da solução de GND é feita como segue: 1) Prepara-se solução de 5 mg/ml de sulfato de níquel diluído em tampão acetato 0,2M, pH 6,0. 2) em solução de 1,2 mg/ml de DAB diluída em água destilada. 3) Adiciona-se a solução 1 à solução 2 e acrescenta-se a essa mistura 2 mg/ml de α -d-Glucose e 0.8 mg/ml de cloreto de amônia. 4) Com os cortes já incubados por 3 minutos adiciona-se a mistura 1mg/50ml da mistura de Glucose Oxidase para produção de oxigênio nascente dando origem ao processo de peroxidação e precipitação do cromógeno. Interrompe-se a reação após 20 minutos com tampão fosfato a 0,1 M (as etapas resumidas do protocolo estão presentes no quadro 1).

Quadro 1: Protocolo utilizado para imunohistoquímica para GFAP (Glial fibrillary acidic protein).

Soluções	Nº de	Tempo
Acido Bórico 0,2M (70 °C pH 9)	1	1 h
TRIS EDTA	1	12 h
PBS-T a 5%	3	5 min
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	10 min
PBS	3	2 min
Anticorpo primário	1	72 h
PBS	3	2 min
ABC	1	1 h
PB 0,1 M	3	2 min
Tampão acetato 0,1 M	1	5 min
GND	1	5 min
Adiciona-se Glucose oxidase à solução GND	1	15 min
PB 0,1M	3	5 min

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e contracoradas com a técnica de Nissl (quadro 2) para melhor delimitação das camadas do GD. Após a diafanização/desidratação em séries alcoólicas e xileno, as lâminas foram cobertas com Entellan (Merck) e lamínula.

Quadro 2: Protocolo utilizado 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 marcação de redes perineuronais

Histoquímica com lectina *Wisteria floribunda* (LWF) foi realizada para marcar os terminais de açúcar (glicosaminoglicanos) ligados aos proteoglicanos das redes perineuronais; utilizou-se a lectina da *Wisteria floribunda* biotinilada (Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA), na concentração de 4,5 µl/ml de LWF em tampão Tris 0,1 M pH 7,4 com 1% de triton.

As secções foram lavadas com tampão Tris 0,1 M pH 7,4 mais 5% de Triton, seguiu-se imersão de 10 minutos em solução de metanol mais 1% de peróxido de hidrogênio. Após nova lavagem em Tris Triton 5%, incubou-se em lectina *Wisteria floribunda* Biotinilada, onde os cortes permaneceram em agitação constante por 12 horas; posteriormente, as secções foram lavadas com Tris 0,1 M e incubadas no ABC por 1 hora; após lavagem com tampão Tris 0,1 M pH 7,4, as secções foram imersas por 5 minutos em tampão acetato. A revelação foi efetivada com solução de Diaminobenzidina/Níquel do mesmo modo descrito acima para imunohistoquímica para GFAP. O protocolo aplicado está apresentado no quadro 3. Após a histoquímica com lectina *Wisteria floribunda*, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e contracoradas com a técnica de Nissl.

Quadro 3: Protocolo utilizado para histoquímica com lectina *Wisteria floribunda* para marcação de redes perineuronais.

Soluções	Nº de Lavagens	Tempo
TRIS + Triton a 5%	3	5 min
Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂) + Metanol	1	20 min
TRIS + Triton a 5%	2	5 min
TRIS + Triton a 5%	1	20 min
Lectina <i>Wisteria floribunda</i> Biotinilada	1	12 h
TRIS 0,1 M pH 7,4	3	2 min
ABC	1	1 h
TRIS 0,1 M	3	2 min
Tampão acetato 0,1 M	1	5 min (máx.)
GND	1	5 min
Adiciona-se Glucose oxidase à solução GND	1	15 min
TRIS 0,1 M	3	5 min

3.3. Avaliação estereológica utilizando o método do fracionador óptico

Para estimar o número total unilateral de astrócitos e redes perineuronais do giro denteado, utilizou-se o programa de computador Stereoinvestigator 7 (MicroBrightField, Williston, VT, US); todas as mensurações foram efetuadas com o microscópio óptico NIKON Optiphot 2 (Nikon Inc, Japan), cujos movimentos nos eixos X, Y e Z foram controlados pelo programa através de platina e conversores análogo-digitais (MAC200, Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA).

Utilizou-se estereologia com o método do fracionador óptico para a contagem de astrócitos e de redes perineuronais; tal método permitiu obter estimativas próximas dos valores reais sem viés, através de coleta sistemática e aleatória de dados incluindo a terceira dimensão. O método foi escolhido devido à impossibilidade de se contar todos os objetos de interesse contidos em toda a área do giro denteado.

As áreas de interesse foram delimitadas com objetiva de magnificação de 3.2x, utilizando objetiva de 10x para confirmação, tal procedimento foi facilitado pela contracoloração das secções com a técnica de Nissl, evitando ambiguidade na delimitação das camadas do GD. Foi utilizada 1 a cada 10 secções para a contagem ($ssf = 1/10$).

Após definição dos limites das áreas de interesse, indicou-se para o programa as dimensões da caixa de contagem (largura e comprimento, eixos x e y), o espaçamento entre elas (grade), a altura do dissector óptico (h, no eixo z), a zona de guarda, preenchendo protocolo do programa, que exibe visualização prévia da disposição das caixas de contagem dentro da área de interesse. O programa controla os movimentos da platina do microscópio e por consequência da lâmina de microscopia sob observação. Após a contagem se encerrar em uma caixa o programa desloca automaticamente o campo de visada para a nova caixa da matriz e assim subsequentemente até o experimentador completar a contagem de todas as caixas da grade.

Após finalizadas as contagens o programa gera uma série de dados estatísticos e faz a estimativa total do número de objetos de interesse para a secção com o respectivo coeficiente de erro.

Todas as contagens propriamente ditas foram feitas com objetiva de 60x de magnificação de imersão em óleo, com abertura numérica de 1.4 (NIKON, NA=1.4). A espessura local da secção foi medida a cada caixa de contagem.

Para a contagem de astrócitos, utilizou-se zona de guarda de 1 μm e altura do dissector de 8 μm , o tamanho das caixas de contagem e da grade variaram conforme a área de interesse, sendo de 215 x 110 μm para a camada granular, 300 x 150 μm para a polimórfica, 255 x 130 μm para a molecular interna, e 145 x 75 μm para a molecular externa, como indicado na tabela 1.

Para a quantificação das redes perineuronais, utilizou-se zona de guarda de 2 μm e altura do dissector de 10 μm , o tamanho das caixas de contagem para

todas as camadas do giro denteado foi de 155 x 115 μm , não sendo usado espaçamento entre as caixas com intuito de obter números totais a partir de toda a área bidimensional das secções, diminuindo o coeficiente de erro (tabela 2). Foram utilizados três tipos de marcadores durante as contagens, para obter estimativas dos três tipos de redes perineuronais.

4. RESULTADOS

O giro denteado do *Cebus apella* apresenta variações ao longo do eixo rostrocaudal. Rostralmente, apresenta-se pequeno e arredondado, com as camadas granular e molecular em formato da letra “U”; logo após, se torna mais alongado e adquire o formato da letra “V”; a medida em que se aproxima a porção mais caudal, o GD se torna mais alongado e apresenta, cada vez mais, convoluções profundas. Além dessas convoluções, as camadas não possuem espessura uniforme, apresentam variações significativas em sua espessura em todo o eixo rostrocaudal (figura 2).

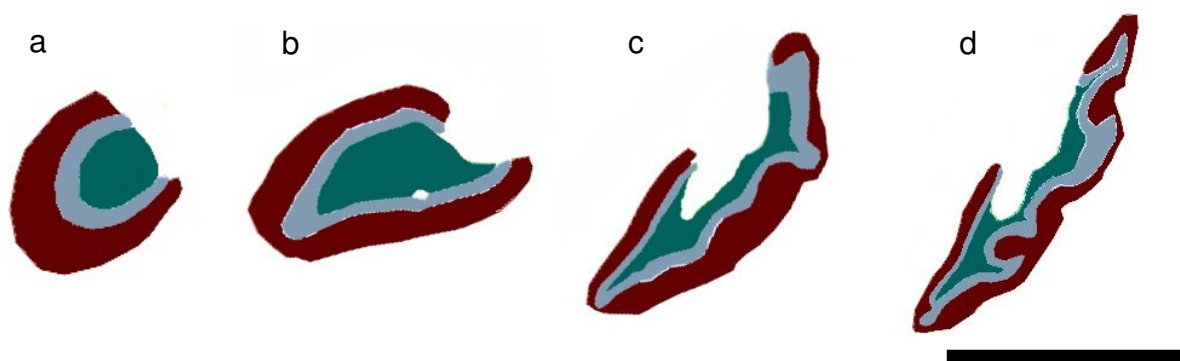


Figura 2: Contornos do giro denteado do *Cebus apella* feitos durante os procedimentos de contagem de redes perineuronais. Observa-se em “a” o contorno da secção mais rostral, e em “d” a secção mais caudal, mostrando acentuada variação no formato, orientação e tamanho do GD. Escala: 5 mm.

Na figura 3, observa-se o giro denteado e a formação hipocampal e sua localização em relação a outras estruturas encefálicas, como o ventrículo lateral e o córtex entorrinal.



Figura 3: Secção do hemisfério esquerdo do *Cebus apella* marcado por histoquímica para revelação dos sítios de ligação da lectina *Wisteria floribunda*, contracorada com a técnica de Nissl; pode ser visto o giro denteado e a formação hipocampal no assoalho do ventrículo lateral e próximo ao córtex entorrinal. Legendas: Put: putâmen; GL: geniculado lateral; Tha: tálamo. Escala: 5 mm.

4.1. Distribuição de astrócitos no giro denteado do *Cebus Apella*.

4.1.1. Análise qualitativa da distribuição de astrócitos

Com a imunomarcagem seletiva, os astrócitos do GD foram facilmente identificados durante as contagens; na figura 4, pode-se observar astrócitos imunomarcados com GFAP, em imagem obtida com objetiva planapocromática de 60x, que foi utilizada durante as contagens. A contracoloração com a técnica de

Nissl eliminou possíveis dúvidas quanto aos limites entre a camada granular com a polimórfica e a molecular.

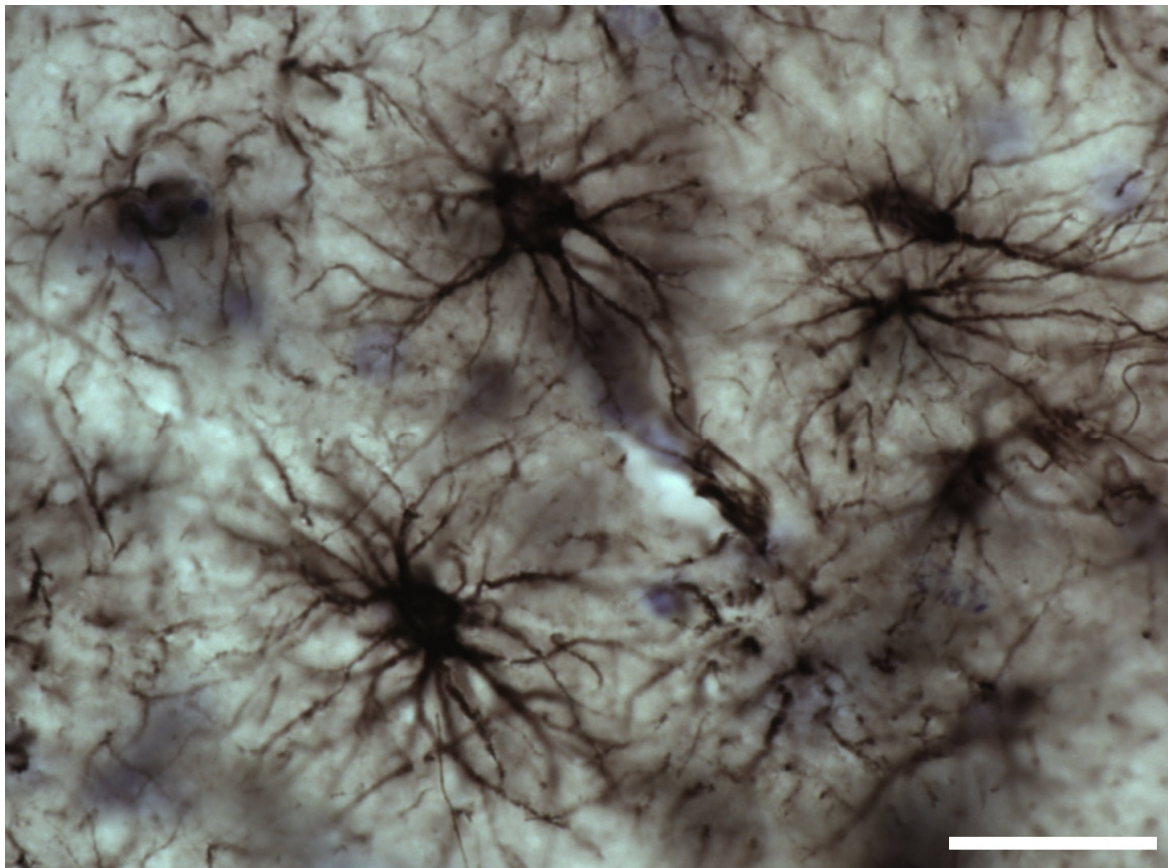


Figura 4: Astrócitos imunomarcados com GFAP, presentes no GD do *Cebus apella*. Escala = 25 μ m.

A figura 5 mostra a distribuição desigual de astrócitos entre as camadas do GD, com maior quantidade de astrócitos na camada polimórfica, seguido pela camada molecular interna e pela camada granular; na parte externa da camada molecular foram observados principalmente prolongamentos astrocitários, com número de astrócitos muito menor que nas demais áreas.

Foi possível diferenciar a camada molecular em duas, molecular interna e externa, devido à evidente diferença quanto à quantidade de astrócitos, que é muito maior na porção interna da camada molecular, enquanto na porção externa são observados principalmente prolongamentos astrocitários (figura 5, d).

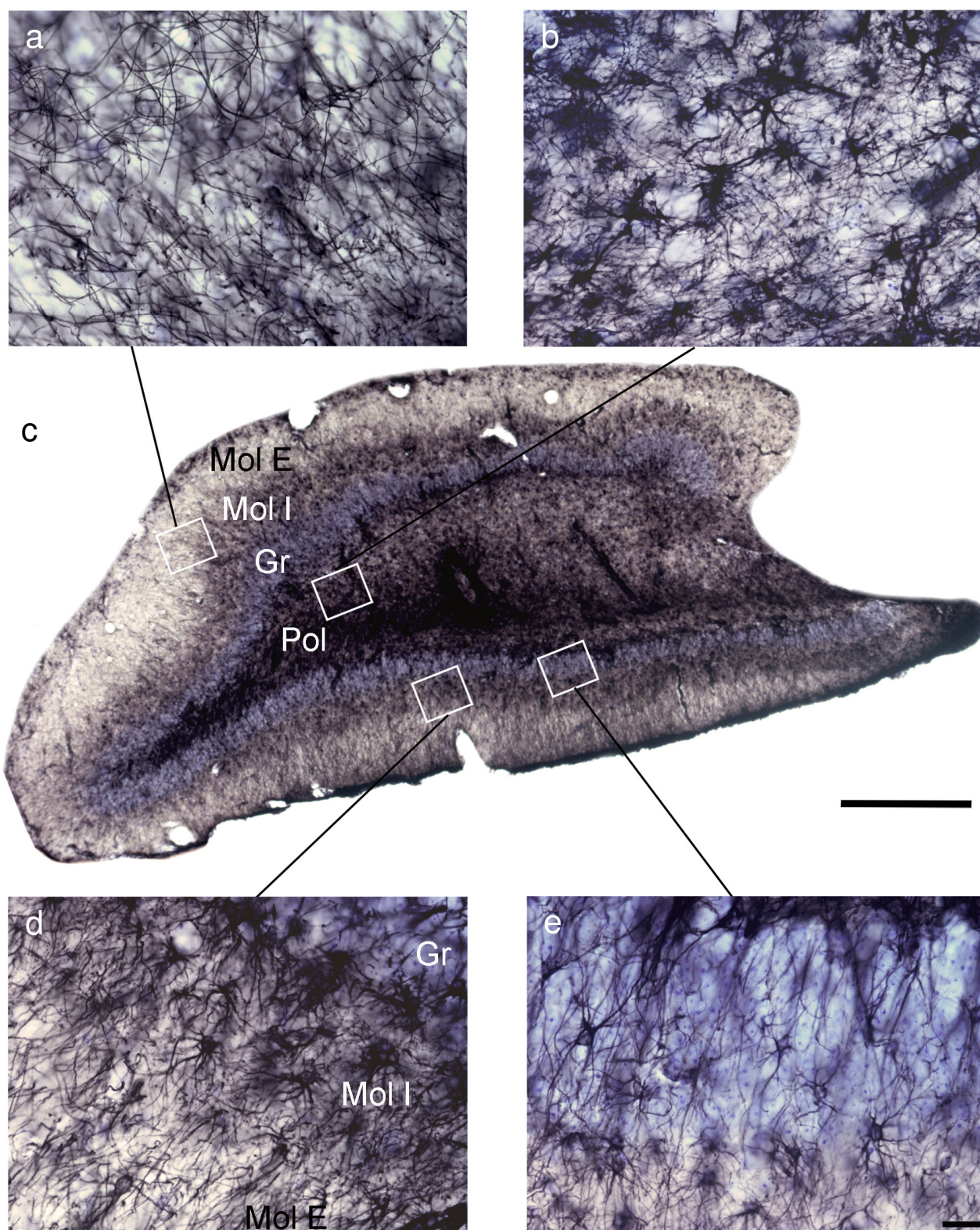


Figura 5: Distribuição de astrócitos nas diferentes camadas do giro dentado do *Cebus apella*. A fotografia central mostra uma secção coronal do GD em nível rostral. As fotos em destaque mostram em a: camada molecular externa; b: camada polimórfica; d: molecular interna (entre as camadas granular e molecular externa); e: camada granular. Escalas: grande aumento (a, b, c, d): 25 μm ; foto central em baixo aumento (c): 250 μm .

4.1.2. Quantificação estereológica de astrócitos do giro denteado do *Cebus apella*.

Os astrócitos do GD dos quatro animais foram marcados seletivamente por imunohistoquímica para GFAP. A contagem de astrócitos foi realizada utilizando zona de guarda de 1 μm e altura do dissector de 8 μm , caixas de contagem de 145 x 75 μm , o espaçamento entre as caixas (tamanho da grade) variou conforme a área de interesse, 215 x 110 μm para a camada granular, 300 x 150 μm para a polimórfica, 255 x 130 μm para a molecular interna, e 145 x 75 μm para a molecular externa, obtendo assim de 0,46, 0,24, 0,33 e 1, respectivamente. Foram contadas uma a cada 10 secções (ssf=0,1), sendo contadas 15 secções nos animais 2 e 4 e 16 secções nos animais 3 e 5.

Após o processamento dos tecidos, a espessura das secções, que era de 70 μm , passou a ser de $21,76 \pm 1,91 \mu\text{m}$ na camada granular (tsf = $0,37 \pm 0,03$), $22,02 \pm 1,87 \mu\text{m}$ na polimórfica (tsf = $0,37 \pm 0,03$), $22,02 \pm 2,11 \mu\text{m}$ na molecular interna (tsf = $0,37 \pm 0,03$), e $22,13 \pm 2,1 \mu\text{m}$ na molecular externa (tsf = $0,37 \pm 0,03$), conforme mensuração durante as contagens.

Verificou-se maior quantidade de astrócitos na camada polimórfica ($N = 381.137,025 \pm 34.780,27$; CE Scheaffer = 0,03655), que apresentou volume médio de $7,21 \pm 1,72 \text{ mm}^3$ (CE = 0,05), seguido pela camada molecular interna ($N = 181.991,475 \pm 32.558,68$; CE Scheaffer = 0,03579), com volume de $5,5 \pm 1,4 \text{ mm}^3$ (CE = 0,0325), e pela camada granular ($N = 109.106,985 \pm 8.311,05$; CE Scheaffer = 0,0305), cujo volume encontrado foi de $3,5 \pm 0,88 \text{ mm}^3$ (CE = 0,04); na parte externa da camada molecular foram observados principalmente prolongamentos astrocitários, com menor número de astrócitos ($N = 48.378,42 \pm 4.484,9$; CE Scheaffer = 0,0253), em um volume de $6,86 \pm 1,77 \text{ mm}^3$ (CE = 0,0375).

Tabela 1: Parâmetros experimentais e número de astrócitos estimado para o giro denteado do *Cebus apella*

Sujeitos	a(caixa) (μm^2)	A(x,y) (μm^2)	asf	tsf	ssf	No. de caixas de contagem	No. de secções	ΣQ^+
Granular								
MP2	145 x 75	215 x 110	0,46	$0,363 \pm 0,03$	0,1	499	15	1810
MP3	145 x 75	215 x 110	0,46	$0,338 \pm 0,037$	0,1	800	16	1630
MP4	145 x 75	215 x 110	0,46	$0,375 \pm 0,033$	0,1	528	15	1687
MP5	145 x 75	215 x 110	0,46	$0,416 \pm 0,033$	0,1	669	16	2285
Polimórfica								
MP2	145 x 75	300 x 150	0,24	$0,365 \pm 0,099$	0,1	296	15	3028
MP3	145 x 75	300 x 150	0,24	$0,339 \pm 0,041$	0,1	495	16	3311
MP4	145 x 75	300 x 150	0,24	$0,361 \pm 0,032$	0,1	320	15	3007
MP5	145 x 75	300 x 150	0,24	$0,413 \pm 0,024$	0,1	399	16	3950
Molecular Interna								
MP2	145 x 75	255 x 130	0,33	$0,359 \pm 0,027$	0,1	441	15	2145
MP3	145 x 75	255 x 130	0,33	$0,332 \pm 0,039$	0,1	721	16	2188
MP4	145 x 75	255 x 130	0,33	$0,368 \pm 0,035$	0,1	463	15	1607
MP5	145 x 75	255 x 130	0,33	$0,417 \pm 0,031$	0,1	606	16	2724
Molecular Externa								
MP2	145 x 75	145 x 75	1	$0,360 \pm 0,023$	0,1	1450	15	1515
MP3	145 x 75	145 x 75	1	$0,332 \pm 0,039$	0,1	2551	16	1647
MP4	145 x 75	145 x 75	1	$0,361 \pm 0,042$	0,1	1816	15	1810
MP5	145 x 75	145 x 75	1	$0,416 \pm 0,036$	0,1	2022	16	1982

a(caixa), área da caixa de contagem; A(X,Y), dimensões de 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; ΣQ^+ , somatório de marcadores contados.

Tabela 2: Estimativas numéricas da quantidade de astrócitos, espessuras e volumes estimados.

Sujeitos	Espessura (μm)	Volume (mm^3)	CE	N	CE (Scheaffer)
Granular					
MP2	$22,21 \pm 1,74$	2,54	0,05	109.661,5	0,03
MP3	$23,98 \pm 2,75$	4,58	0,03	107.414,1	0,024
MP4	$21,5 \pm 1,92$	3,11	0,04	99.591,54	0,036
MP5	$19,35 \pm 1,38$	3,76	0,04	119.760,8	0,031
Média	$21,76 \pm 1,91$	3,5	0,04	109.106,98	0,03
SD		0,88		8.311,05	
CV ²		0,063		0,006	
CE ²		0,0016		0,0009	
CE ² /CV ²		0,025		0,16	
CVB ²		0,061		0,005	
CVB ² (%CV ²)		97,46		83,95	
Polimórfica					
MP2	$22,30 \pm 1,84$	5,37	0,05	348.646,1	0,042
MP3	$23,96 \pm 2,98$	9,25	0,05	420.985,7	0,03
MP4	$22,34 \pm 2,04$	6,28	0,04	355.568	0,037
MP5	$19,46 \pm 1,13$	7,94	0,06	399.348,3	0,036
Média	$22,02 \pm 1,87$	7,21	0,05	381.137,02	0,036
SD		1,73		34.780,27	
CV ²		0,06		0,008	
CE ²		0,002		0,0013	
CE ² /CV ²		0,04		0,16	
CVB ²		0,05		0,007	
CVB ² (%CV ²)		95,63		83,95	
Molecular Interna					
MP2	$22,42 \pm 1,63$	4,08	0,04	183.659,6	0,036
MP3	$24,41 \pm 2,94$	7,13	0,02	207.187,7	0,031
MP4	$21,95 \pm 2,23$	4,59	0,03	135.531,1	0,044
MP5	$19,29 \pm 1,34$	6,27	0,04	201.587,5	0,031
Média	$22,02 \pm 2,11$	5,51	0,03	181.991,47	0,036
SD		1,428		32558,68	
CV ²		0,067		0,03	
CE ²		0,001		0,001	
CE ² /CV ²		0,016		0,04	
CVB ²		0,06		0,03	
CVB ² (%CV ²)		98,42		95,99	
Molecular Externa					
MP2	$22,28 \pm 1,407$	4,52	0,04	42.187,05	0,029
MP3	$24,44 \pm 2,956$	8,82	0,03	50.742,73	0,02
MP4	$22,47 \pm 2,720$	7,14	0,04	52.424,66	0,029
MP5	$19,33 \pm 1,471$	6,97	0,04	48.159,23	0,023
Média	$22,13 \pm 2,1$	6,865	0,03	48.378,42	0,025
SD		1,77		4.484,9	
CV ²		0,067		0,008	
CE ²		0,0014		0,0006	
CE ² /CV ²		0,021		0,075	
CVB ²		0,065		0,008	
CVB ² (%CV ²)		97,89		92,53	

CVB² = CV² – CE² (CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). N: números médios dos grupos; SD, desvio padrão.

4.2. Distribuição de redes perineuronais no giro denteado do *Cebus apella*

4.2.1. Análise qualitativa da distribuição de redes perineuronais

Após histoquímica para lectina *Wisteria floribunda*, obteve-se marcação das redes perineuronais, permitindo a diferenciação dos três tipos de redes, como pode ser observado na figura 6.

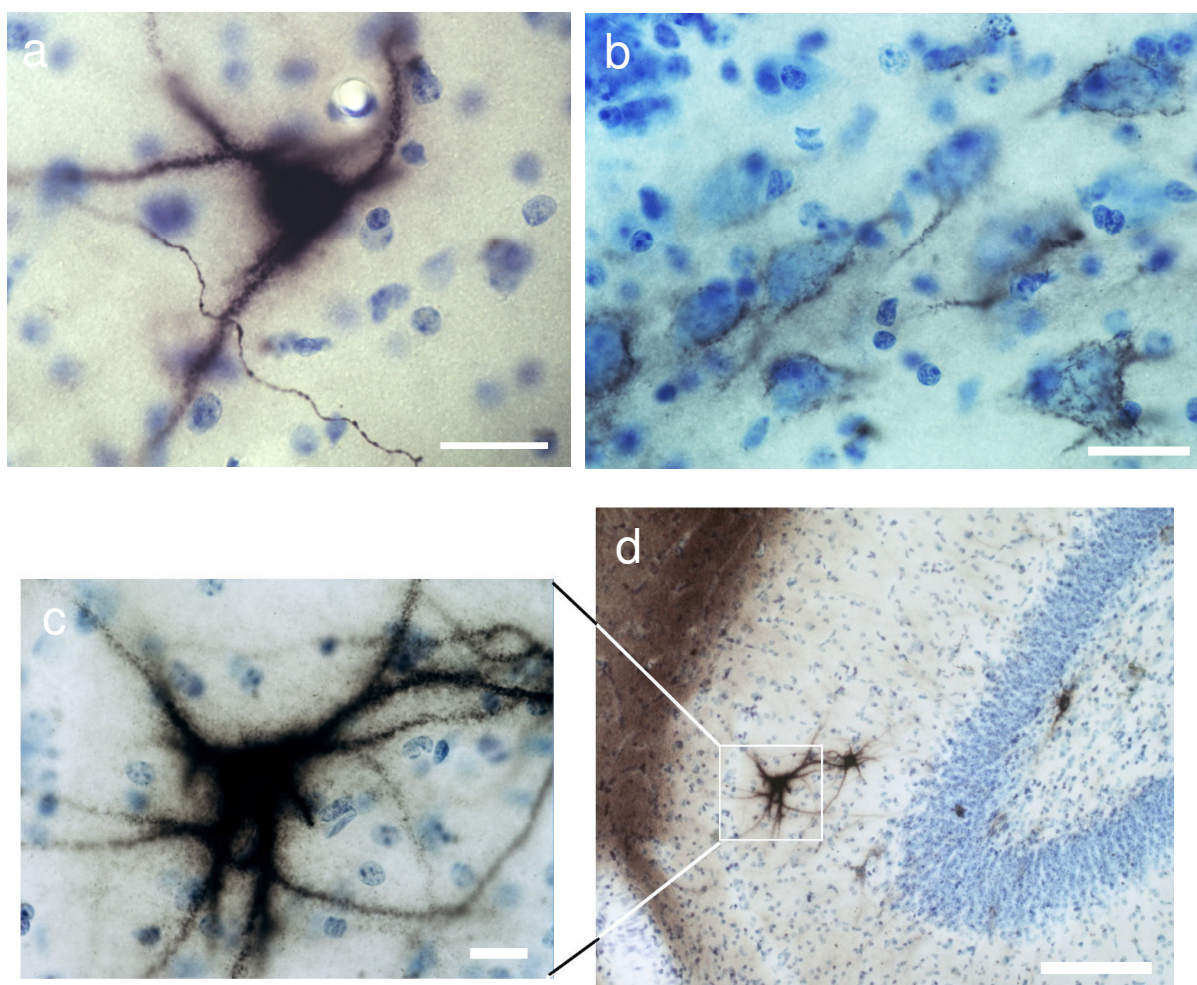


Figura 6: Tipos de redes perineuronais. Em “a” observamos a rede do tipo 1, envolvendo todo o soma neuronal, ramificações primárias e secundárias dos dendritos; em “b”, RP tipo 2, bastante delgada envolvendo, além do soma, apenas segmento inicial axonal e do dendrito principal; em “c” e “d” rede tipo 3 (em grande e baixo aumento, respectivamente), bastante espessa e difusa (escalas: 25 μm).

Verificou-se no GD do *Cebus apella* a presença principalmente de redes perineuronais do tipo 2, com número muito menor de redes do tipo 1; as RPs do tipo 3 foram raramente observadas.

A quantidade de RPs varia ao longo do eixo rostrocaudal; as redes estão em maior quantidade nos níveis mais rostrais e se tornam mais escassas à medida em que se aproxima do pólo caudal.

As redes perineuronais do GD dos animais analisados se localizam principalmente na camada granular, seguida pela polimórfica e são raras na camada molecular. Quanto às RPs presentes na polimórfica, observou-se tendência a localização próxima a zona subgranular.

A distribuição de redes perineuronais nos níveis rostral, intermédio e caudal do giro denteado pode ser vista na figura 7.

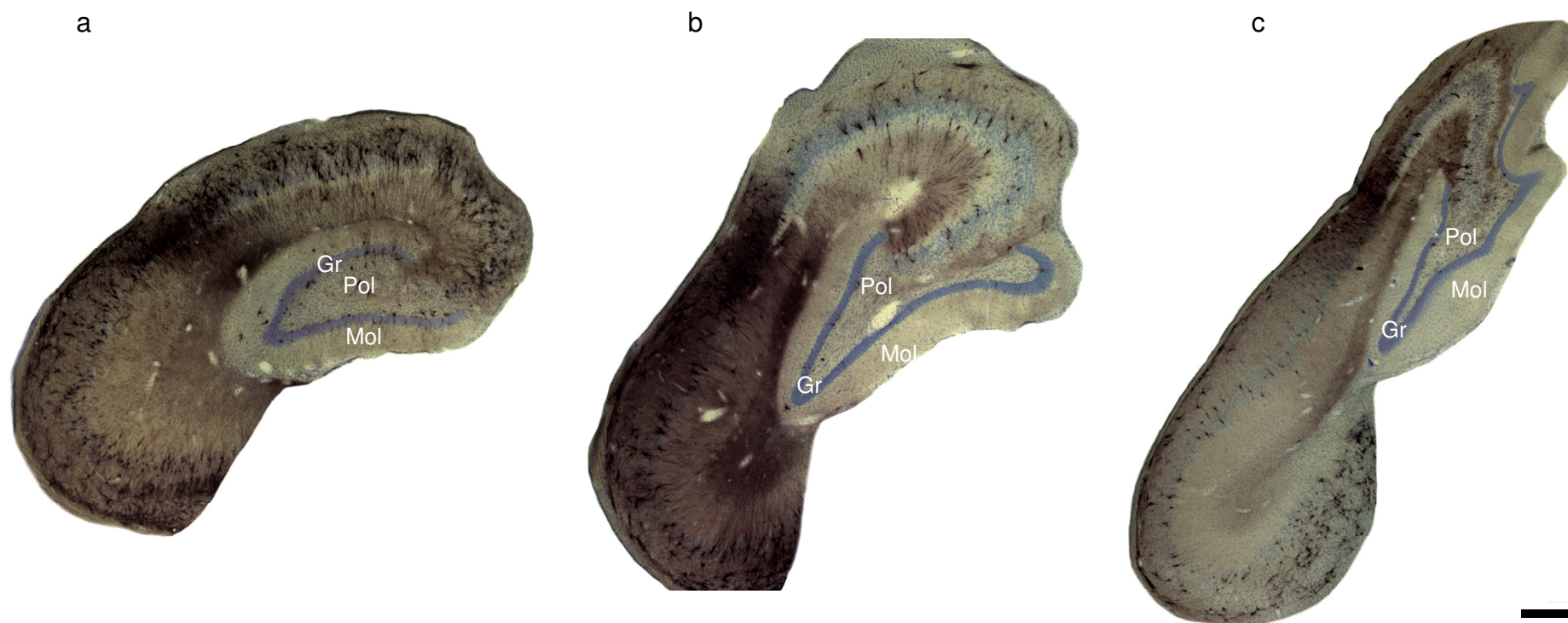


Figura 7: Distribuição de redes perineuronais nos níveis rostral (a), intermédio (b) e caudal (c) do giro denteado, observa-se que a quantidade de RPs é maior rostralmente e que, em todos os níveis, é bem inferior à apresentada pelo corno de Amon (escala: 500 μ m).

4.2.2. Quantificação estereológica de redes perineuronais do giro denteado do *Cebus apella*

A contagem de redes perineuronais foi realizada utilizando zona de guarda de 2 μm e altura do dissector de 10 μm , o tamanho das caixas de contagem para todas as camadas do giro denteado foi de 155 x 115 μm , bem como o tamanho da grade, não sendo usado espaçamento entre as caixas; logo, obteve-se $\text{asf} = 1$ para todas as camadas do giro denteado. Assim como para a estimativa do número de astrócitos, foram contadas uma a cada 10 secções ($\text{ssf}=0,1$), sendo contadas 16 secções no animal 1, 17 secções no 2 e 18 nos animais 3 e 5.

Após o processamento dos tecidos, a espessura das secções, que era de 70 μm , passou a ser em média de $17,93 \pm 1,03 \mu\text{m}$ na camada granular ($\text{tsf} = 0,567 \pm 0,032$), $17,45 \pm 0,85 \mu\text{m}$ na polimórfica ($\text{tsf} = 0,584 \pm 0,027$), e $17,87 \pm 1,01 \mu\text{m}$ na molecular ($\text{tsf} = 0,573 \pm 0,028$), conforme mensurado durante as contagens (tabela 3).

Durante os procedimentos de contagem, marcou-se os objetos de interesse com três tipos de marcadores diferentes para identificar separadamente os três tipos de redes perineuronais. Em todas as camadas foi encontrado maior número de redes tipo 2, número bem menor de redes tipo 1 e raríssimas redes tipo 3.

Na camada granular, que apresentou volume de $6,54 \pm 1,3 \text{ mm}^3$, o número estimado de RPs tipo 2 foi de $10.667,36 \pm 976,16$ (CE Scheaffer = 0,04), enquanto que o número estimado para o tipo 1 foi de apenas $236,59 \pm 102,95$ (CE Scheaffer = 0,25), nas secções contadas não foi encontrada nenhuma rede do tipo 3.

A camada polimórfica apresentou $6.835,055 \pm 1.463,888$ (CE Scheaffer = 0,06) redes tipo 2, e $265,1 \pm 53,13$ (CE Scheaffer = 0,24) redes tipo 1; quanto às redes tipo 3, o número estimado foi de $13,2 \pm 17$ (CE Scheaffer = 0,78), não possuindo validade estatística. O volume estimado foi de $8,96 \pm 2,3 \text{ mm}^3$.

O número estimado de redes tipo 2 na molecular foi de $1.592,72 \pm 346,7$ (CE Scheaffer = 0,10); quanto às redes tipo 1, foi de $247,59 \pm 61,73$ (CE Scheaffer =

0,25); as redes tipo 3 foram extremamente escassas, $10,1 \pm 11,7$ (CE Scheaffer = 0,9), não sendo significativo estatisticamente. O volume obtido foi $16 \pm 3,3 \text{ mm}^3$.

Tabela 3: Parâmetros experimentais e estimativa do número total de redes perineuronais do giro denteado do hemisfério esquerdo do *Cebus apella* utilizando o método do fracionador óptico.

Sujeitos	a(caixa) (μm ²)	A(x,y) (μm ²)	asf	tsf	ssf	No. de caixas de contagem	No. de secções	ΣQ ⁺	
								T1	T2
Granular									
MP1	155 x 115	155 x 115	1	0,533 ± 0,048	0,1	1132	16	8	523
MP2	155 x 115	155 x 115	1	0,571 ± 0,083	0,1	1353	17	20	554
MP3	155 x 115	155 x 115	1	0,609 ± 0,049	0,1	1641	18	17	668
MP5	155 x 115	155 x 115	1	0,554 ± 0,073	0,1	1332	18	8	616
Polimórfica									
MP1	155 x 115	155 x 115	1	0,610 ± 0,092	0,1	1045	16	12	365
MP2	155 x 115	155 x 115	1	0,578 ± 0,085	0,1	1378	17	19	470
MP3	155 x 115	155 x 115	1	0,602 ± 0,053	0,1	1578	18	14	433
MP5	155 x 115	155 x 115	1	0,549 ± 0,073	0,1	1032	18	14	261
Molecular									
MP1	155 x 115	155 x 115	1	0,579 ± 0,098	0,1	1874	16	10	83
MP2	155 x 115	155 x 115	1	0,587 ± 0,079	0,1	2126	17	13	63
MP3	155 x 115	155 x 115	1	0,595 ± 0,055	0,1	2794	18	19	96
MP5	155 x 115	155 x 115	1	0,533 ± 0,084	0,1	2317	18	11	93

a(caixa), área da caixa de contagem; A(X,Y), dimensões de 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; ΣQ^+ , somatório de marcadores contados.

Tabela 4: Estimativas numéricas da quantidade de redes perineuronais (total dos 3 tipos), espessuras e volumes estimados para o giro denteado do *Cebus apella*.

Sujeitos	Espessura (μm)	Volume (mm ²)	CE	N	CE (Scheaffer)
Redes Perineuronais					
Granular					
MP1	18,918 ± 1,66	5,09	0,03	9957,52	0,03
MP2	17,883 ± 2,54	6,25	0,03	10199,63	0,04
MP3	16,524 ± 1,41	8,26	0,03	11685,71	0,04
MP5	18,384 ± 2,60	6,56	0,03	11772,92	0,04
Média	17,93	6,54	0,03	10903,945	0,04
SD	1,03	1,31		958,83	0,005
CV ²		0,04		0,008	
CE ²		0,0009		0,0015	
CE ² /CV ²		0,022		0,196	
CVB ²		0,039		0,006	
CVB ² (%CV ²)		97,75		80,42	
Polimórfica					
MP1	16,812 ± 2,92	7,2	0,04	6869,86	0,06
MP2	17,689 ± 2,65	9,97	0,05	8780,66	0,06
MP3	16,755 ± 1,63	11,71	0,03	7615,38	0,05
MP5	18,549 ± 2,71	6,95	0,03	5187,6	0,06
Média	17,45	8,96	0,04	7113,375	0,06
SD	0,847	2,29		1505,52	0,007
CV ²		0,065		0,045	
CE ²		0,0014		0,0033	
CE ² /CV ²		0,022		0,075	
CVB ²		0,064		0,041	
CVB ² (%CV ²)		97,85		92,55	
Molecular					
MP1	17,874 ± 3,62	13,04	0,02	1854,83	0,1
MP2	17,367 ± 2,42	14,42	0,02	1333,43	0,1
MP3	16,956 ± 1,72	20,49	0,02	2043,72	0,09
MP5	19,274 ± 3,30	16,18	0,02	2169,66	0,09
Média	17,87	16,03	0,02	1850,41	0,097
SD	1,01	3,235		368,14	0,009
CV ²		0,04		0,04	
CE ²		0,0004		0,0095	
CE ² /CV ²		0,0098		0,24	
CVB ²		0,04		0,03	
CVB ² (%CV ²)		99,02		75,99	

CVB² = CV² – CE² (CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica).
N: números médios dos grupos; SD, desvio padrão.

Tabela 5: Estimativas numéricas da quantidade de redes perineuronais do tipo 1 e do tipo 2 no giro denteado.

Sujeitos	ΣQ	N	CE (Scheaffer)	ΣQ	N	CE (Scheaffer)
GRANULAR						
	Tipo 1			Tipo 2		
MP1	8	150,02	0,3	523	9807,5	0,034
MP2	20	355,39	0,199	554	9844,24	0,038
MP3	17	290,01	0,2	668	11395,7	0,039
MP5	8	150,93	0,3	616	11621,99	0,045
Média	13,25	236,59	0,25	590,25	10667,36	0,039
SD	6,18	102,95	0,06	64,66	976,16	0,004
CV ²		0,19			0,008	
CE ²		0,06			0,0015	
CE ² /CV ²		0,34			0,18	
CVB ²		0,125			0,007	
CVB ² (%CV ²)		66,155			81,54	
POLIMÓRFICA						
	Tipo 1			Tipo 2		
MP1	12	218,67	0,26	365	6651,19	0,059
MP2	19	339,78	0,22	470	8405,12	0,067
MP3	14	237,98	0,26	433	7360,4	0,048
MP5	14	264,1	0,24	261	4923,51	0,06
Média	14,75	265,13	0,24	382,25	6835,055	0,06
SD	2,99	53,13	0,02	91,79	1463,89	0,008
CV ²		0,04			0,04	
CE ²		0,06			0,003	
CE ² /CV ²		1,49			0,08	
CVB ²		-0,02			0,04	
CVB ² (%CV ²)		-48,65			92,39	
MOLECULAR						
	Tipo 1			Tipo 2		
MP1	10	197,32	0,28	83	1637,78	0,1
MP2	13	228,09	0,25	63	1105,35	0,12
MP3	19	337,66	0,2	96	1706,06	0,096
MP5	11	227,3	0,27	93	1921,7	0,096
Média	13,25	247,5925	0,25	83,75	1592,7	0,1
SD	4,03	61,72955	0,03	14,9	346,7	0,01
CV ²		0,06			0,05	
CE ²		0,06			0,01	
CE ² /CV ²		1,04			0,23	
CVB ²		-0,002			0,04	
CVB ² (%CV ²)		-3,91			77,25	

ΣQ , somatório de marcadores contados; N, número total estimado. $CVB^2 = CV^2 - CE^2$ (CV coeficiente de variação; CVB, coeficiente de variação biológica). N: números médios dos grupos; SD, desvio padrão.

Note que os valores negativos da variação biológica revelam que o coeficiente de variação individual é menor do que o erro intrínseco à metodologia.

No caso específico da tabela 5, enquanto o primeiro representa 2.4% da variação total o último representa 3%. Nestes casos a regra geral $CE/CV < 0.5$ não faz sentido e não deve ser levada em consideração (Slomianka and West, 2005).

5. DISCUSSÃO

O GD do *Cebus apella* apresenta estrutura geral semelhante ao descrito na literatura para o humano e macaco Rhesus, quanto às convoluções profundas e variações na espessura das camadas granular e molecular (Seress, 2007).

5.1. Distribuição de astrócitos no Giro Denteado do *Cebus apella*

Entre as camadas do GD, a polimórfica foi a que apresentou maior quantidade de astrócitos ($N = 381.137,025 \pm 34.780,27$, em volume de $7,21 \pm 1,72 \text{ mm}^3$), seguido pela camada molecular interna ($N = 181.991,475 \pm 32.558,68$; com volume de $5,5 \pm 1,4 \text{ mm}^3$), e pela camada granular ($N = 109.106,985 \pm 8.311,05$, cujo volume encontrado foi de $3,5 \pm 0,88 \text{ mm}^3$); a parte externa da camada molecular apresentou menor número de astrócitos ($N = 48.378,42 \pm 4.484,9$; volume: $6,86 \pm 1,77 \text{ mm}^3$).

Nota-se que, apesar do volume da camada molecular externa ser equivalente ao da polimórfica, o número estimado de astrócitos na molecular externa correspondeu a aproximadamente apenas 12,7 % do total de astrócitos estimado para a camada polimórfica. A camada granular apresentou número de astrócitos equivalente à metade do apresentado pela polimórfica, visto que possui metade do volume e número estimado próximo de 1/4 do total de astrócitos da polimórfica. A molecular interna, apesar de possuir menor volume que a molecular externa, apresentou número de astrócitos aproximadamente 4,5 vezes maior (tabela 1, em resultados).

As fibras musgosas oriundas da camada granular inervam na camada polimórfica (através de colaterais): os dendritos proximais das células musgosas, os dendritos basais das células piramidais em cesta, bem como outras células (Amaral et al., 2007). Entre outras funções, os astrócitos atuam na transmissão e maturação sináptica, através da liberação de moléculas neuroativas e da recaptação de glutamato (Halassa et al., 2007; Lee and Haydon, 2007). Sendo assim, na camada polimórfica ocorre grande número de sinapses, o que pode ser responsável pela quantidade elevada de astrócitos nessa região.

Observou-se certa tendência a maior acúmulo de astrócitos na zona subgranular, que pode corresponder à localização das células piramidais em cesta e suas sinapses com os dendritos basais das células granulares.

A camada molecular interna apresentou número muito maior de astrócitos que a molecular externa, isto pode estar relacionado ao fato de que a porção interna da molecular do GD recebe aferências ipsilaterais e contralaterais das células musgosas, que inervam dendritos das células granulares, além de interneurônios, e parecem ser a principal fonte de projeções excitatórias associacionais/comissurais para o GD (Andersen et al., 2007; Leranth and Hajszan, 2007). Adicionalmente, a molecular interna recebe projeções supramiliares, que inervam os dendritos proximais das células granulares (Andersen et al., 2007). A grande quantidade de conexões nos segmentos proximais dos dendritos das células granulares condiz com a quantidade de astrócitos na camada molecular interna.

Além disso, a lâmina suprapiramidal da camada molecular externa, apresentou maior quantidade de astrócitos que a lâmina infrapiramidal; a lâmina suprapiramidal da molecular está mais próxima da entrada das fibras da via perfurante, que correspondem à principal aferência do GD (Amaral et al., 2007). De fato a via perfurante reúne as projeções do córtex entorrinal que terminam no *subiculum*, no giro denteado e nos campos CA1, CA2 e CA3 do hipocampo. Em concordância a injeção de neurotraçador anterógrado (aminoácido 3H) no córtex entorrinal demonstrou que todas as regiões daquele projetam para os dois terços externos da camada molecular do giro denteado e para a maior parte da extensão radial do *stratum lacunosum-moleculare* de CA3 e CA2. As células localizadas mais lateralmente no córtex entorrinal projetam para porções caudais do giro denteado, enquanto que as células localizadas mais medialmente projetam para porções rostrais do giro denteado (Witter et al., 1989; Witter and Amaral, 1991).

5.2. Distribuição de redes perineuronais no Giro Denteado do *Cebus apella*

Durante a análise qualitativa e as contagens, pôde-se observar uma variação ao longo do eixo rostrocaudal na quantidade de redes perineuronais, que estão em maior quantidade nos níveis mais rostrais e se tornam mais escassas à medida em que se aproxima do pólo caudal; além disso, observa-se quantidade

muito menor de redes perineuronais no GD do que na camada piramidal do Corno de Amon em todos os níveis, que pode ser claramente percebida mesmo em baixo aumento, conforme ilustrado na figura 4, em resultados.

No giro denteado, de modo geral, há presença de um número muito maior de redes perineuronais do tipo 2 em relação aos demais tipos. Na camada granular, 97,8% das RPs encontradas foram do tipo 2 e 2,17% do tipo 1, não foram encontradas redes tipo 3. De acordo com as estimativas, 96,09% das RPs da camada polimórfica é do tipo 2, enquanto 3,73% é do tipo 1, e 0,185% é do tipo 3. Quanto à camada molecular, 86,07% das redes são do tipo 2, enquanto 13,4% são do tipo 1, e 0,5% são do tipo 3. Observa-se que a camada com maior proporção de redes do tipo 1 é a camada molecular.

É importante salientar que a camada granular possui maior número de RPs tipo 2 que as demais camadas, apesar de ter volume menor. Quanto às redes do tipo 1, as três camadas apresentaram número estimado equivalente, apesar da diferença de volume; assim, da mesma forma, a camada granular possui maior densidade de RPs tipo 1, pois possui menor volume que as demais áreas, apesar da camada molecular possuir proporção um pouco maior de redes tipo 1 em relação à granular e à polimórfica.

Considerando o número total de redes perineuronais estimado, somando-se os três tipos de redes, e os volumes das áreas, a camada granular possui maior número de RPs ($10903,94 \pm 958,83$, em um volume de $6,5 \pm 1,3 \text{ mm}^3$); em seguida, a camada polimórfica (com total estimado em $7113,37 \pm 1505,52$, volume = $9 \pm 2,3 \text{ mm}^3$), enquanto na molecular há número bem mais restrito de RPs ($1850,41 \pm 368,14$, em um volume de $16 \pm 3,2 \text{ mm}^3$).

Não foi encontrada assim nenhuma correlação simples entre os volumes planimétricos das camadas do giro denteado e as estimativas do número de redes perineuronais. De fato, a região da camada granular com valores intermediários de volume reuniu a maior concentração de sítios de ligação da lectina *Wisteria floribunda*.

No momento é difícil comparar nossas estimativas do número de redes perineuronais com outras espécies de primatas pela completa inexistência de estudos estereológicos no giro denteado em macacos do Velho ou do Novo Mundo. A distribuição das redes no giro denteado em comparação com outros mamíferos

placentários parece sugerir padrão de distribuição altamente conservado entre as diferentes ordens. De fato em todas as espécies placentárias de mamíferos até então investigadas a maioria das redes do giro denteado são fracamente coradas e estão associadas com a camada granular (Bruckner et al., 2003; Bruckner et al., 2006; Morawski et al., 2010). No giro denteado do rato em particular distingue-se um padrão laminar na camada molecular onde a camada molecular externa é mais intensamente marcada do que a interna. A zona subgranular em particular apresenta intensa marcação contornando o hilo (Derouiche et al., 1996).

5.3 Ambiguidades não Estereológicas nas Estimativas

Entretanto em estudos estereológicos é preciso considerar que a variação nos procedimentos histológicos, ambigüidade na definição dos objetos e nos limites das áreas de interesse, e até mesmo as expectativas do experimentador introduzem vieses que alteram os parâmetros metodológicos possibilitando estimativas incorretas. No presente trabalho escolhemos o fracionador óptico como método estereológico que é imune em grande extensão às alterações induzidas pelos procedimentos de fixação (West, 2002). Além disso empregamos marcadores seletivos para os objetos de interesse, tendo o cuidado de contrapor as secções imuno ou histoquimicamente marcadas com o cresil violeta para remover as ambigüidades na definição das camadas. Além disso mantivemos o mesmo protocolo de contagem para o mesmo marcador em todos os animais facilitando a comparação entre os resultados. Na média encontramos resultados similares entre os animais objeto das estimativas, sugerindo que nossos métodos foram reproduzidos de forma sistemática nos indivíduos analisados indicando que o erro metodológico foi mantido em níveis aceitáveis.

5.4. Anatomia Funcional do Hipocampo e Distribuição Laminar de Astrócitos e Redes Perineuronais.

O hipocampo desempenha papel fundamental na memória espacial em vertebrados separados por grandes distâncias filogenéticas, indicando que a

informação espacial é uma atribuição hipocampal conservada há muitos milhões de anos. Espécies representativas de quatro classes de vertebrados incluindo peixes ósseos, répteis, pássaros e mamíferos, revelam evidências de que sua capacidade de lembrar a posição de objetos no espaço depende da integridade hipocampal (para revisão, ver (Corkin et al., 1997; Rodriguez et al., 2002; Broglio et al., 2005). Em humanos, o lobo temporal medial, quando danificado, freqüentemente prejudica a memória espacial e de objetos (Corkin et al., 1997; Squire et al., 2004; Bayley et al., 2005; Magloczky and Freund, 2005). Em primatas não humanos, particularmente no macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), técnicas de registro eletrofisiológico associado à estudos comportamentais em animais acordados, revelaram que existem todas as representações de espaço e forma no hipocampo, requeridas para tais funções: foram encontrados neurônios que respondem diferentemente a diferentes objetos, neurônios que respondem diferentemente a diferentes posições do mesmo objeto e neurônios que respondem diferentemente à combinações diferentes de objeto e local (Rolls et al., 2005). Esses resultados mostram que existem representações separadas e combinadas de objetos e do espaço no hipocampo de primatas, provendo avanço importante na compreensão das bases neurais hipocampais subjacentes a um sistema de memória episódica. Nos primatas do Novo Mundo e em particular no *Cebus apella* estudos comportamentais dedicados a investigação do uso de ferramentas revelaram notáveis habilidades cognitivas comparáveis aos dos cercopitecinos e grandes primatas (Visalberghi et al., 1995; Visalberghi, 1997). De fato o emprego de tarefas comportamentais hipocampo e giro denteado-dependentes em indivíduos dessa espécie (Janson, 1998; De Lillo et al., 2007; Poti et al., 2010), revelaram resultados nos testes de memória espacial e reconhecimento de objeto semelhantes aos do *Macaca mulatta* (Rolls et al., 2005; Bachevalier and Nemanic, 2008; Pascalis et al., 2009) ainda que com diferentes performances.

Muito recentemente, tem sido demonstrado de forma direta a participação da matriz extracelular e dos astrócitos nos fenômenos de plasticidade sináptica incluindo os eventos de potenciação e depressão de longo-prazo (Schwarzacher et al., 2006; Jourdain et al., 2007). Nesses estudos os autores demonstram que nas regiões de terminação via perfurante em particular, os astrócitos parecem contribuir diretamente para a produção de elementos da matriz e para a modulação da atividade sináptica relacionada. É razoável sugerir portanto a partir dos dados do presente trabalho que pode haver correlação estreita entre a presença de projeções

astrocíticas nas zonas de sinapses ativas com o aumento do número de astrócitos equivalentes nas camadas que as originaram.

Nós sugerimos igualmente que a diferença na relação neurônio/glia no hipocampo e giro denteado do *Macaca mulatta* e do *Cebus apella* pode responder pelo menos em parte pelas diferentes performances cognitivas hipocampo e giro denteado dependentes dessas espécies.

6. CONCLUSÃO

Os objetivos propostos de quantificar utilizando estereologia e caracterizar a distribuição de astrócitos e redes perineuronais das diferentes camadas do giro denteado do *Cebus apella* foram alcançados. Os resultados obtidos nas estimativas foram, em média, similares entre os animais objeto do estudo, indicando que o erro metodológico foi mantido em níveis aceitáveis.

A distribuição de astrócitos encontrada foi desigual entre as camadas do GD, com maior quantidade na camada polimórfica, seguida pela camada molecular interna e pela granular. Quanto às redes perineuronais, observou-se maior quantidade na camada granular, seguida pela polimórfica; as RPs são raras na camada molecular do GD.

A morfologia dos astrócitos no *Cebus apella* parece similar a de humanos, mas é bastante diferente da de roedores, assim como seu número e distribuição. As implicações funcionais dessas diferenças permanecem por serem investigadas.

Este é o primeiro trabalho a estimar o número de astrócitos e redes perineuronais de primatas não humanos utilizando marcadores seletivos e estereologia com o método do fracionador óptico; assim, será de grande relevância para comparação com estudos futuros envolvendo estimativas numéricas e ensaios comportamentais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, D. G., H. E. Scharfman, et al. (2007). **The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies)**. Prog Brain Res 163: 3-22.
- Andersen, P., R. Morris, et al. **The Hippocampus Book**. The Hippocampus Book. O. U. Press. New York.2007.
- Bachevalier, J. and S. Nemanic (2008). **Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex**. Hippocampus 18(1): 64-80.
- Bayley, P. J., J. J. Gold, et al. (2005). **The neuroanatomy of remote memory**. Neuron 46(5): 799-810.
- Broglio, C., A. Gomez, et al. (2005). **Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish**. Brain Res Bull 66(4-6): 277-281.
- Bruckner, G., J. Grosche, et al. (2003). **Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation**. J Chem Neuroanat 26(1): 37-50.
- Bruckner, G., S. Pavlica, et al. (2006). **Organization of brain extracellular matrix in the Chilean fat-tailed mouse opossum *Thylamys elegans* (Waterhouse, 1839)**. J Chem Neuroanat 32(2-4): 143-158.
- Bushong, E. A., M. E. Martone, et al. (2002). **Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains**. J Neurosci 22(1): 183-192.
- Christensen, J. R., K. B. Larsen, et al. (2007). **Neocortical and hippocampal neuron and glial cell numbers in the rhesus monkey**. Anat Rec (Hoboken) 290(3): 330-340.
- Christopherson, K. S., E. M. Ullian, et al. (2005). **Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis**. Cell 120(3): 421-433.
- Corkin, S., D. G. Amaral, et al. (1997). **H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging**. J Neurosci 17(10): 3964-3979.

- De Lillo, C., G. Spinozzi, et al. (2007). **Pattern recognition in tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*): the role of the spatial organisation of stimulus parts.** Behav Brain Res 181(1): 96-109.
- Deepa, S. S., D. Carulli, et al. (2006). **Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans.** J Biol Chem 281(26): 17789-17800.
- Derouiche, A., W. Hartig, et al. (1996). **Spatial relationship of lectin-labelled extracellular matrix and glutamine synthetase-immunoreactive astrocytes in rat cortical forebrain regions.** J Anat 189 (Pt 2): 363-372.
- Diniz, C. G., R. B. de Melo Paz, et al. (2010). **Hippocampus and dentate gyrus of the *Cebus* monkey: Architectonic and stereological study.** J Chem Neuroanat.
- Dityatev, A. and M. Schachner (2003). **Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity.** Nat Rev Neurosci 4(6): 456-468.
- Dorph-Petersen, K. A., J. R. Nyengaard, et al. (2001). **Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size.** J Microsc 204(Pt 3): 232-246.
- Duvernoy, H. M. **The Human Hippocampus.** New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.2005.
- El-Falougy, H. and J. Benuska (2006). **History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation.** Bratisl Lek Listy 107(4): 103-106.
- Friedman, H. R. and P. S. Goldman-Rakic (1988). **Activation of the hippocampus and dentate gyrus by working-memory: a 2-deoxyglucose study of behaving rhesus monkeys.** J Neurosci 8(12): 4693-4706.
- Gazzaley, A. H., M. M. Thakker, et al. (1997). **Preserved number of entorhinal cortex layer II neurons in aged macaque monkeys.** Neurobiol Aging 18(5): 549-553.
- Glaser, E. M. and P. D. Wilson (1998). **The coefficient of error of optical fractionator population size estimates: a computer simulation comparing three estimators.** J Microsc 192(Pt 2): 163-171.
- Haber, M., L. Zhou, et al. (2006). **Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses.** J Neurosci 26(35): 8881-8891.

- Halassa, M. M., T. Fellin, et al. (2007). **Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte**. *J Neurosci* 27(24): 6473-6477.
- Hayashi, N., S. Miyata, et al. (2005). **Neuronal expression of the chondroitin sulfate proteoglycans receptor-type protein-tyrosine phosphatase beta and phosphacan**. *Neuroscience* 131(2): 331-348.
- Howard, V. and M. G. Reed **Unbiased stereology : three-dimensional measurement in microscopy**. New York, Springer.1998.
- Insausti, R. (1993). **Comparative anatomy of the entorhinal cortex and hippocampus in mammals**. *Hippocampus* 3 Spec No: 19-26.
- Janson, C. H. (1998). **Experimental evidence for spatial memory in foraging wild capuchin monkeys, Cebus apella**. *Anim Behav* 55(5): 1229-1243.
- Jinno, S. and T. Kosaka (2006). **Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology**. *Neurosci Res* 56(3): 229-245.
- Jones, L. L., D. Sajed, et al. (2003). **Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition**. *J Neurosci* 23(28): 9276-9288.
- Jourdain, P., L. H. Bergersen, et al. (2007). **Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength**. *Nat Neurosci* 10(3): 331-339.
- Karetko, M. and J. Skangiel-Kramska (2009). **Diverse functions of perineuronal nets**. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 69(4): 564-577.
- Keuker, J. I., P. G. Luiten, et al. (2003). **Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys**. *Neurobiol Aging* 24(1): 157-165.
- Keuker, J. I., G. K. Vollmann-Honsdorf, et al. (2001). **How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews**. *Brain Res Brain Res Protoc* 7(3): 211-221.
- Kozorovitskiy, Y., C. G. Gross, et al. (2005). **Experience induces structural and biochemical changes in the adult primate brain**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(48): 17478-17482.
- Lee, S. Y. and P. G. Haydon (2007). **Astrocytic glutamate targets NMDA receptors**. *J Physiol* 581(Pt 3): 887-888.
- Leranth, C. and T. Hajszan (2007). **Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus**. *Prog Brain Res* 163: 63-84.

- Magistretti, P. J. (2006). **Neuron-glia metabolic coupling and plasticity**. J Exp Biol 209(Pt 12): 2304-2311.
- Magloczky, Z. and T. F. Freund (2005). **Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus**. Trends Neurosci 28(6): 334-340.
- Matsui, M., T. Imamura, et al. (2002). **Transient global amnesia: increased signal intensity in the right hippocampus on diffusion-weighted magnetic resonance imaging**. Neuroradiology 44(3): 235-238.
- Morawski, M., G. Bruckner, et al. (2010). **Aggrecan-based extracellular matrix shows unique cortical features and conserved subcortical principles of mammalian brain organization in the Madagascan lesser hedgehog tenrec (*Echinops telfairi* Martin, 1838)**. Neuroscience 165(3): 831-849.
- Pascalis, O., N. M. Hunkin, et al. (2009). **Change in background context disrupts performance on visual paired comparison following hippocampal damage**. Neuropsychologia 47(10): 2107-2113.
- Poti, P., P. Kanngiesser, et al. (2010). **Searching in the middle-Capuchins' (*Cebus apella*) and bonobos' (*Pan paniscus*) behavior during a spatial search task**. J Exp Psychol Anim Behav Process 36(1): 92-109.
- Rodriguez, F., J. C. Lopez, et al. (2002). **Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes**. J Neurosci 22(7): 2894-2903.
- Rolls, E. T., J. Xiang, et al. (2005). **Object, space, and object-space representations in the primate hippocampus**. J Neurophysiol 94(1): 833-844.
- Rosene, D. L. and G. W. Van Hoesen (1987). **The Hippocampal Formation of the Primate Brain: a review of some comparative aspects of cytoarchitecture and connections**.
- Schwarzacher, S. W., M. Vuksic, et al. (2006). **Neuronal hyperactivity induces astrocytic expression of neurocan in the adult rat hippocampus**. Glia 53(7): 704-714.
- Scoville, W. B. and B. Milner (1957). **Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions**. J Neurol Neurosurg Psychiatry 20(1): 11-21.
- Seidenbecher, C. I., K. H. Smalla, et al. (2002). **Brevican isoforms associate with neural membranes**. J Neurochem 83(3): 738-746.

- Seress, L. (2007). **Comparative anatomy of the hippocampal dentate gyrus in adult and developing rodents, non-human primates and humans.** Prog Brain Res 163: 23-41.
- Slomianka, L. and M. J. West (2005). **Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats.** Neuroscience 136(3): 757-767.
- Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). **Astrocytes: biology and pathology.** Acta Neuropathol 119(1): 7-35.
- Squire, L. R., C. E. Stark, et al. (2004). **The medial temporal lobe.** Annu Rev Neurosci 27: 279-306.
- Tomori, Z., I. Krekule, et al. (2001). **Disector Program for Unbiased Estimation of Particle Number, Numerical Density And Mean Volume.** Image Anal Stereol.
- Ullian, E. M., K. S. Christopherson, et al. (2004). **Role for glia in synaptogenesis.** Glia 47(3): 209-216.
- Ventura, R. and K. M. Harris (1999). **Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes.** J Neurosci 19(16): 6897-6906.
- Visalberghi, E. (1997). **Success and Understanding in Cognitive Tasks: A Comparison Between Cebus apella and Pan troglodytes.** International Journal of Primatology.
- Visalberghi, E., D. M. Frigaszy, et al. (1995). **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 109(1): 52-60.
- Wegner, F., W. Hartig, et al. (2003). **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 184(2): 705-714.
- Weibel, E. R. (1981). **Stereological methods in cell biology: where are we--where are we going?** J Histochem Cytochem 29(9): 1043-1052.
- West, M. J. (2002). **Design-based stereological methods for counting neurons.** Prog Brain Res 135: 43-51.

- Witter, M. P. and D. G. Amaral (1991). **Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex.** J Comp Neurol 307(3): 437-459.
- Witter, M. P., G. W. Van Hoesen, et al. (1989). **Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey.** J Neurosci 9(1): 216-228.
- Yamaguchi, Y. (2000). **Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix.** Cell Mol Life Sci 57(2): 276-289.
- Yang, Z., R. Zhang, et al. (2000). **Caveat on the Error Analysis for Stereological Estimates.** Image Anal Stereol.
- Zola-Morgan, S., L. R. Squire, et al. (1992). **Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus.** J Neurosci 12(7): 2582-2596.

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](#)