

# Alteração mastigatória, ambiente enriquecido e envelhecimento: estudos estereológicos de CA1 do hipocampo de camundongos suíços albinos\*

Masticatory change, enriched environment, and aging: stereological studies of CA1 in the hippocampus of Swiss albino mice

Alteración masticatoria, ambiente enriquecido y envejecimiento: estudios estereológicos de CA1 del hipocampo de ratones albinos suizos

Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes  
*Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção,  
Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil  
Centro Universitário do Estado do Pará, CESUPA, Belém, Pará, Brasil*

Cristovam Wanderley Picanço Diniz  
*Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção,  
Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil*

André Pinheiro Gurgel Felício  
*Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção,  
Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil*

Marcia Consentino Kronka Sosthenes  
*Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção,  
Hospital Universitário João de Barros Barreto, Instituto de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil*

## RESUMO

**OBJETIVOS:** Visando investigar os efeitos da alteração da atividade mastigatória sobre a população celular, avaliaram-se as consequências da dieta farelada sobre a quantidade de astrócitos em CA1 (Corno de Ammon 1) do hipocampo. Além disso, consideraram-se os impactos da dieta e possíveis alterações associadas ao ambiente enriquecido e aos processos neuropatológicos que podem surgir durante o envelhecimento. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Camundongos fêmeas da variedade suíça albina foram divididos em janelas temporais de 6, 12 e 18 meses. Esses animais, distribuídos em grupos, receberam ração peletizada (RP) ou farelada (RF), sendo criados em ambiente enriquecido ou padrão. Completadas as idades, o material encefálico foi processado para imunohistoquímica da proteína ácida fibrilar glial. Com o auxílio do fracionador óptico, quantificaram-se os astrócitos em CA1, destacando-se variações entre as suas camadas. **RESULTADOS:** O ambiente padrão induziu modificações laminares em diferentes modelos em todas as camadas, identificando aumentos e reduções no número de astrócitos (grupos RP, no *Stratum lacunosum-moleculare*; e RF, em todas as camadas). No ambiente enriquecido, notaram-se modificações significativas somente na camada piramidal (entre as idades de 6 e 12 meses e de 6 e 18 meses, com redução no número de astrócitos). **CONCLUSÃO:** As diferenças encontradas seriam dependentes da dieta, da idade e do envelhecimento, sugerindo que a astrocitose em camundongos adultos jovens estaria relacionada a mecanismos neuroprotetores e que a privação mastigatória nessa idade influenciaria negativamente essa ação. Ademais, os astrócitos no envelhecimento estariam envolvidos em processos pró-inflamatórios se associados a uma condição de alteração da mastigação, e o enriquecimento ambiental proveria neuroproteção aos efeitos maléficos do envelhecimento e da privação mastigatória.

**Palavras-chave:** Mastigação; Envelhecimento; Astrócitos; Neurodegeneração.

\* Artigo apresentado no V Congresso HUIBB, promovido pelo Hospital Universitário João de Barros Barreto e Universidade Federal do Pará, realizado de 12 a 14 de agosto de 2015 na Cidade de Belém, Estado do Pará, Brasil. Os Editores agradecem a parceria do HUIBB/UFGA e por terem escolhido a Revista Pan-Amazônica de Saúde para publicação dos excelentes trabalhos apresentados no evento.

### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes  
Hospital Universitário João de Barros Barreto, Laboratório de  
Investigações em Neurodegeneração e Infecção  
Rua dos Mundurucus, 4487. Bairro: Guamá  
CEP: 66073-005 Belém-Pará-Brasil  
Tel.: +55 (91) 3201-6756  
E-mail: faesdam@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

Com a elevação da expectativa de vida, tem-se constatado um aumento significativo da população de idosos, assim como um acréscimo na prevalência de demências e doenças neurodegenerativas<sup>1,2,3</sup>. O aumento dessa parcela da população acima de 65 anos de idade reforça a necessidade de uma compreensão minuciosa a respeito do processo de envelhecimento e de suas alterações e consequências.

Aoki et al<sup>4</sup> afirmaram que a neurogênese que ocorre no giro denteado do hipocampo, uma importante região para a memória e aprendizado em roedores e em humanos, é regulada por alguns fatores, como exposição a um ambiente enriquecido, atividade física, envelhecimento e estresse. A formação hipocampal, que desempenha um papel fundamental na memória espacial, é muito sensível ao processo de envelhecimento, sendo uma das primeiras regiões do cérebro a evidenciar mudanças morfológicas, fisiológicas e neuroquímicas com o avanço da idade. Bases de testes de aprendizagem em ratos sem os dentes molares mostraram que a disfunção oclusal poderia estar envolvida no processo de degeneração associada à demência senil<sup>5</sup>.

Por outro lado, foi descrito que o fluxo sanguíneo cerebral, em várias regiões do cérebro, é afetado pela mastigação, e que os astrócitos podem desenvolver papel chave na regulação desse fluxo<sup>6,7,8,9,10,11,12</sup>. A regulação do fluxo sanguíneo cerebral é feita por meio do cálcio ( $Ca^{2+}$ ) astrocítico responsável por ondas de sinalização que podem induzir tanto a dilatação quanto a constrição das arteríolas por meio de sua concentração<sup>12</sup>. Os astrócitos são células extremamente numerosas, sendo afetados em várias situações neuropatológicas, incluindo o envelhecimento, a neurodegeneração crônica e a infecção. Essas condições adversas comprometeriam igualmente a função sináptica por estarem relacionadas a eventos de plasticidade sináptica por conta da liberação de glutamato em áreas críticas para a consolidação da memória, como nas regiões hipocâmpais de CA1 e CA3 (Corno de Ammon 1 e 3) e no giro denteado<sup>13,14,15</sup>. Por essas razões, é evidente que os astrócitos são imprescindíveis para a função cerebral normal, e, portanto, investigações acerca de possíveis mudanças em seu número, distribuição e forma são essenciais.

Em estudos anteriores, por exemplo, o desempenho no labirinto aquático de Morris diminuiu em camundongos jovens e velhos mantidos em ambiente padrão e privados da atividade mastigatória desde o 21º dia pós-natal, e isso foi associado à astrocitose na camada polimórfica do giro denteado nos indivíduos velhos<sup>16</sup>.

Com relação à estimulação ambiental, em estudo realizado com a mesma variedade aqui proposta (camundongos suíços albinos), concluiu-se que, em longo prazo, o enriquecimento ambiental foi capaz de influenciar no número de astrócitos de diferentes camadas do giro denteado, bem como no desempenho desses animais em testes comportamentais que avaliavam a memória espacial e a memória semelhante à episódica; isso

demonstrou, os efeitos do ambiente e do envelhecimento sobre a plasticidade glial, efeitos esses submetidos também à investigação no trabalho apresentado<sup>17</sup>.

Com base no exposto, o presente trabalho se propôs, com o auxílio de ensaios imunohistoquímicos e com o método do fracionador óptico, a avaliar comparativamente as consequências da dieta farelada e do ambiente sobre a quantidade de astrócitos na região de CA1 do hipocampo e suas laminações.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais do presente trabalho seguiram os princípios recomendados pela publicação *Principles of Laboratory Animal Care* da National Institutes of Health. Para investigar a influência da dieta, do ambiente e da idade, utilizaram-se fêmeas adultas jovens e idosas de camundongos da variedade albina suíça, gentilmente cedidas pelo Instituto Evandro Chagas e alojadas no biotério do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção do Hospital Universitário João de Barros Barreto. Os procedimentos foram examinados e autorizados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal do Pará (CEPAE/UFPA No. B10004-09).

Os animais foram distribuídos para a formação dos grupos de idades de 6 meses (6M), 12 meses (12M) e 18 meses (18M), alojados em condições empobrecidas (ambiente padrão – AP) ou enriquecidas (ambiente enriquecido – AE), sendo alimentados, logo após o desmame, por dois diferentes tipos de ração. O grupo controle recebeu alimentação sob a forma de ração peletizada (PE), e o grupo experimental sofreu restrição mastigatória, sendo oferecida ração farelada e peneirada (PO). Os sujeitos tiveram acesso livre à água e comida, e vale destacar que não havia diferenças nutricionais entre as rações ofertadas. Ainda assim, realizou-se controle de peso quinzenal dos animais. Dessa forma, foram gerados, nessas condições, seis grupos (Quadros 1 e 2).

Ambiente / Janela temporal	Número de animais	
	PE	PO
AP 6M	12	12
AP 12M	12	12
AP 18M	24	18

**Quadro 1** – Número de animais para cada grupo criado em AP, segundo a janela temporal e o tipo de ração ofertada

Ambiente / Janela temporal	Número de animais	
	PE	PO
AE 6M	12	12
AE 12M	12	12
AE 18M	12	12

**Quadro 2** – Número de animais para cada grupo criado em AE, segundo a janela temporal e o tipo de ração ofertada

Os animais do AP foram alojados em gaiolas plásticas de dimensões 32x39x16,5 cm e cobertas por uma grade de metal, abrigando seis camundongos. Os grupos alojados em AE estavam inseridos em um espaço de 50x50x50 cm, com dois andares equipados com pontes de plástico, rodas de correr, brinquedos e túneis feitos de plástico, permitindo o exercício voluntário ao longo de todo o período. O ambiente sofria modificações semanalmente, seja com alteração na posição dos objetos ou mesmo troca desses. Cada gaiola abrigou 12 camundongos. Todas as gaiolas permaneceram em uma sala sob temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e ciclos claro-escuro de 12 h (período claro, 6–18 h; período escuro, 18–6 h).

Ao final de cada janela temporal de observação, os animais receberam dose anestésica letal e foram perfundidos com fixadores aldeídicos depois de prévia remoção do sangue circulante com solução salina. Seus cérebros foram removidos e cortados em vibrátomo, recolhendo-se, de forma ordenada, séries anatômicas sequenciais para imunomarcagem subsequente da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Uma a cada seis secções, com espessura constante de 60  $\mu\text{m}$ , foi selecionada para compor a amostra a ser imunomarcada, empregando-se anticorpo monoclonal para GFAP (*mouse anti-GFAP MAB360*, Chemicon Int., EUA). Utilizou-se também a contracoloração com Cresil violeta a 1% para definir as lâminas de CA1 e estabelecer os limites dos corpos celulares dos astrócitos.

Assim, em sequência, foram realizadas análises estereológicas para a estimativa do número de astrócitos com o programa especializado Stereo Investigator® (MBF Bioscience, Williston, VT, EUA). A distribuição laminar de CA1 foi definida tomando-se como referência a camada piramidal. Essa visualização é justificada pelo "empacotamento" dessas células se comparadas às células piramidais de CA3. Portanto, nota-se em CA1 uma camada piramidal mais estreita, porém mais densa<sup>18,19</sup>. Após a definição do contorno de camada piramidal em CA1, projetavam-se, paralelamente a ela, as outras camadas da região, considerando, ainda, as diferenças morfológicas dos astrócitos entre essas camadas.

O número total de astrócitos foi obtido como uma função da probabilidade estimada com base na espessura das secções, na área da caixa de contagem e na área de interesse amostral. A equação matemática que relaciona essas variáveis entre si e permite estimativa do número total de objetos de interesse é definida por:  $N = \sum Q * 1/ssf * 1/asf * 1/tsf$ .

Nessa equação, N é o número total de astrócitos;  $\sum Q$  é o número de astrócitos identificados pelo experimentador; *ssf* é a fração amostral do número de secções; *asf* é a fração amostral da área amostral; e *tsf* é a fração amostral da espessura da secção. Neste ensaio, adotou-se matriz amostral nos eixos XY de

80x80  $\mu\text{m}$ , zona de guarda de 2  $\mu\text{m}$  e altura da caixa de contagem de 7  $\mu\text{m}$ .

Os grupos foram submetidos a testes de normalidade, para identificação dos possíveis desvios, e a análise estatística paramétrica avaliou o grau de significância dos resultados, empregando-se a análise descritiva (dados quantitativos), de variância (ANOVA) para três critérios, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância para diferenças estatísticas foi definido em  $\alpha < 0,05$ .

## RESULTADOS

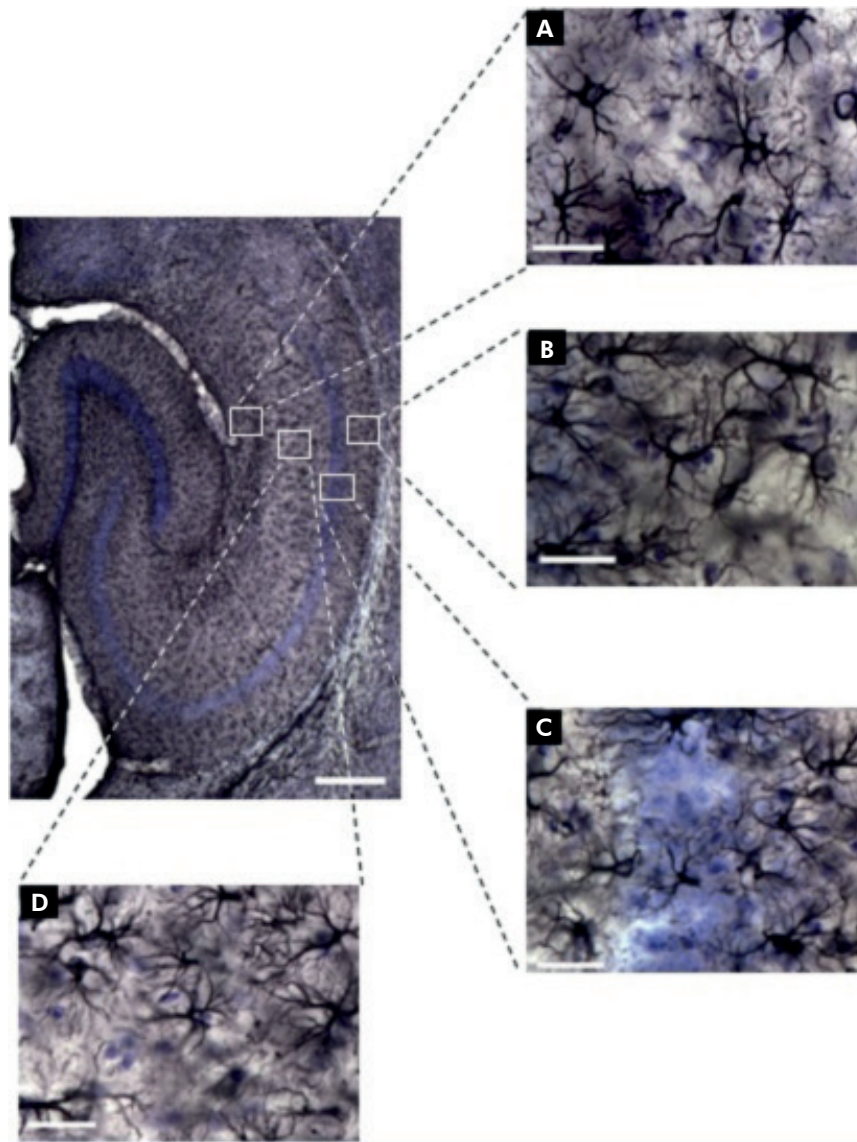
### CA1 E SUAS CAMADAS

Fotomicrografias dos astrócitos estão ilustradas na figura 1. Dentre elas, a de interesse e objeto deste estudo: a região de CA1 do hipocampo e suas laminações (*Stratum lacunosum-moleculare*, *Stratum radiatum*, *Stratum oriens* e *Stratum pyramidale*). Utilizando os princípios do fracionador óptico, aplicados à região de CA1 nas secções imunomarcadas, estimou-se o número total de astrócitos dessa região para todos os grupos formados.

### AMBIENTE PADRÃO: NÚMERO TOTAL DE ASTRÓCITOS E QUANTIFICAÇÕES POR CAMADAS

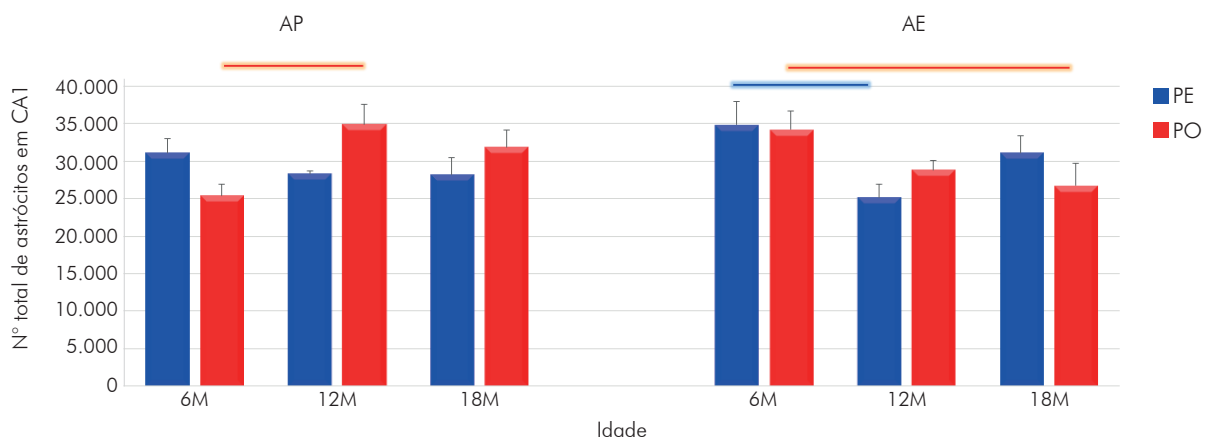
A estimativa do número total de astrócitos em CA1 dos animais que viveram em AP revelou que o envelhecimento impôs ao grupo PE uma redução da população astrocitária. Os grupos de 12M ( $28309 \pm 392,41$ ; média  $\pm$  erro padrão) e de 18M ( $28217 \pm 2198,96$ ) revelaram um número menor de células se comparados ao grupo jovem (6M =  $31143 \pm 1885,53$ ) (Figura 2). Em contrapartida, no grupo PO, evidenciou-se um aumento no número de astrócitos no grupo de 12M em relação ao de 6M (12M =  $34921 \pm 2590,57$  vs. 6M =  $25442 \pm 1572,66$ ), sendo essa diferença significativa ( $p < 0,05$ ). No de 18M, ocorreu discreto declínio ( $31901 \pm 2287,60$ ; não significativa) na quantidade de astrócitos.

Aliado a isso, foram encontradas diferenças importantes entre os dois grupos de dietas aos 12M (PE vs. PO,  $p < 0,05$ ), assim como um efeito do AE sobre os animais que receberam PO ainda jovens (6M: PO AP =  $25442 \pm 1572,66$  vs. PO AE:  $34198 \pm 2449,65$ ), sendo que o AE impôs aumento na quantidade de astrócitos. Sobre isso, da mesma forma que fora visto no AP, houve uma redução na quantidade de astrócitos dos 6M aos 12M no grupo PE (6M =  $34841 \pm 3091,54$  vs. 12M =  $25176 \pm 1770,57$ ), assim como dos 6M aos 18M no grupo PO (6M =  $34198 \pm 2449,65$  vs. 18M =  $26752 \pm 2897,62$ ). Desse modo, os resultados sugerem que tanto a atividade mastigatória quanto o envelhecimento afetam o número de astrócitos em CA1, incluindo a interação entre essas variáveis ( $F_{(2,36)} = 4,22$ ;  $p < 0,022$ ), assim como a interação da idade com o ambiente ( $F_{(2,36)} = 7,24$ ;  $p < 0,022$ ).



**A:** *Stratum lacunosum-moleculare* de CA1; **B:** *Stratum oriens* de CA1; **C:** *Stratum pyramidale* de CA1; **D:** *Stratum radiatum* de CA1. Escalas: baixo aumento = 250  $\mu$ m, grande aumento = 25  $\mu$ m.

**Figura 1** – Fotomicrografias de secção horizontal do hipocampo imunomarcada para GFAP, ilustrando os objetos (astrócitos) e as regiões (camadas) de interesse do camundongo albino suíço. Há diferenças na morfologia dos astrócitos em cada camada



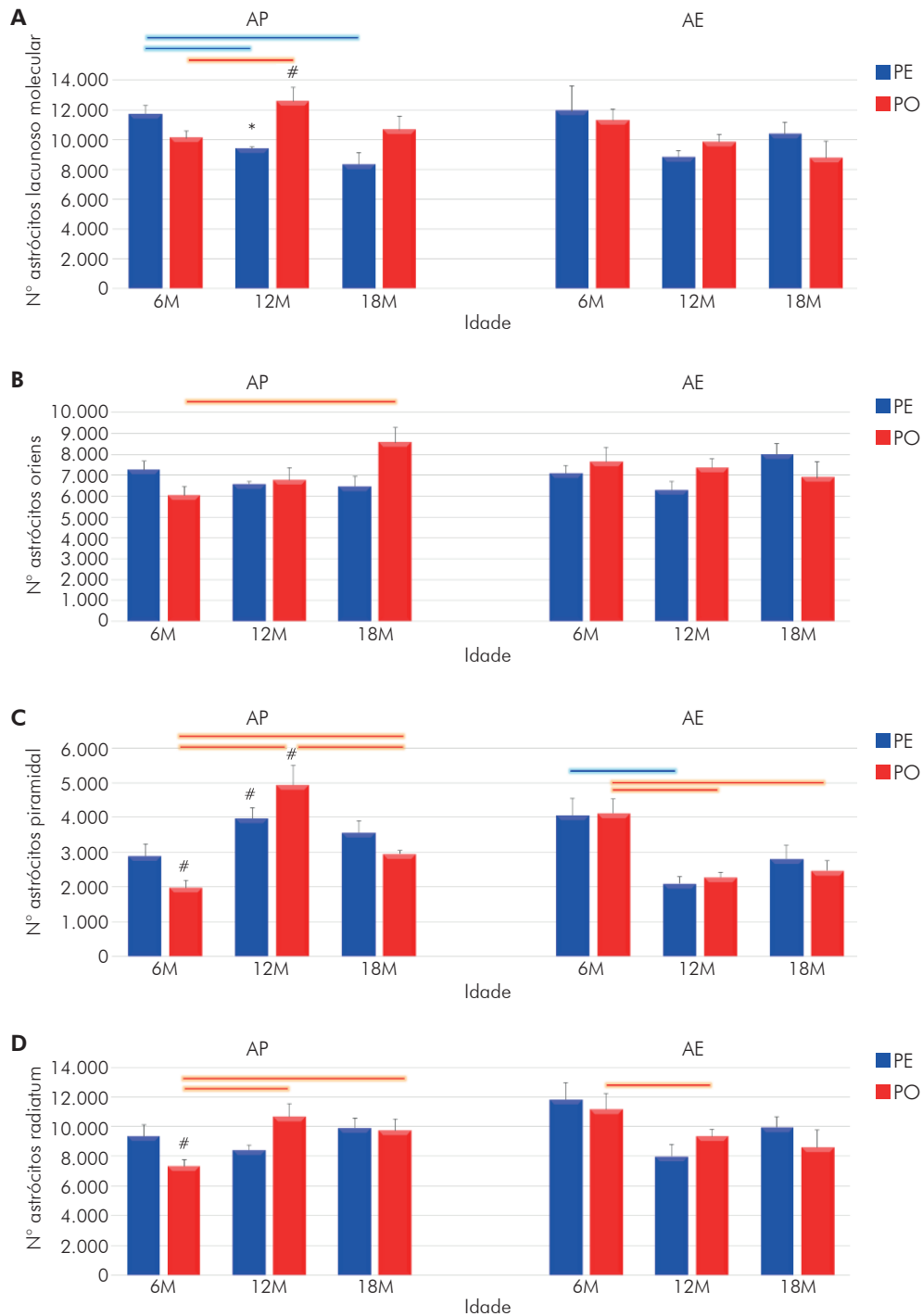
Barras conectoras:  $p < 0,05$ , na cor azul para grupo PE e na cor vermelha para grupo PO, em diferentes idades, mas em mesmo regime de dieta e ambiente.

**Figura 2** – Representação gráfica do número total de astrócitos em CA1 do hipocampo para os animais com 6M, 12M e 18M, criados em AP e AE e alimentados com PE e PO (média do número de astrócitos e erro padrão)

## AP E AE: ESTIMATIVA DA DISTRIBUIÇÃO LAMINAR DE ASTRÓCITOS EM CA1 DO HIPÓCAMPO NAS DIFERENTES JANELAS TEMPORAIS

Identificou-se que o número total de astrócitos de CA1 do hipocampo, para os animais criados nos dois ambientes (AE e AP) e alimentados com PE e PO nas diferentes idades, apresentou, em alguns casos, diferenças estatísticas significantes  $p < 0,05$ .

Quando analisada a distribuição laminar (Figura 3), observa-se que as variáveis estudadas (atividade mastigatória, idade e ambiente) tiveram influência, cada uma, de forma particular: na lacunosomolecular (Figura 3A), idade ( $F_{(2,36)} = 4,00$ ;  $p < 0,027$ ) e sua interação com atividade mastigatória são significantes ( $F_{(2,36)} = 3,45$ ;  $p < 0,042$ ); e, na camada oriens (Figura 3B), é a interação entre as três variáveis que induz às modificações encontradas ( $F_{(2,36)} = 7,24$ ;  $p < 0,002$ ).



**A:** Número de astrócitos na camada lacunosomolecular de CA1; **B:** Número de astrócitos na camada oriens de CA1; **C:** Número de astrócitos na camada piramidal de CA1; **D:** Número de astrócitos na camada radiatum de CA1; \*:  $p < 0,05$  na comparação entre dietas de mesma idade e ambiente; #:  $p < 0,05$  na comparação entre ambientes, com mesma idade e regime de dieta; Barras conectoras:  $p < 0,05$ , na cor azul para grupo PE e, na cor vermelha, para grupo PO, em diferentes idades, mas em mesmo regime de dieta e ambiente.

**Figura 3** – Representação gráfica do número de astrócitos em CA1 do hipocampo e suas laminações para os animais com 6M, 12M e 18M criados em AE e alimentados com PE e PO (média do número de astrócitos e erro padrão)

Nas camadas piramidal e radiatum, o AE foi o elemento importante no processo, pois, na primeira camada, foi visto que somente o ambiente ( $F_{(1,36)} = 4,29$ ;  $p < 0,04$ ) ou a sua associação ao envelhecimento ( $F_{(2,36)} = 33,6$ ;  $p < 0,000001$ ) apresentou diferenças significantes na quantidade de astrócitos (Figura 3C). Essa última associação também foi encontrada na camada radiatum ( $F_{(2,36)} = 8,92$ ;  $p < 0,00071$ ), assim como da idade com a atividade mastigatória ( $F_{(2,36)} = 4,94$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 3D).

#### CONTROLE DE PESO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foi realizado o controle de ganho ponderal dos animais, uma vez que estavam sendo utilizadas rações diferentes (embora possuíssem mesmo valor nutritivo). O controle de peso foi quinzenal e não foram observadas diferenças significativas, comparando-se grupos de dietas diferentes. No quadro 3, apresentam-se a média de peso no dia da perfusão dos animais (final da janela temporal) e os valores estatísticos da comparação entre as dietas.

#### DISCUSSÃO

Os astrócitos de CA1 foram investigados acerca de possíveis mudanças em sua distribuição laminar em correlação às alterações mastigatórias de longo prazo, envelhecimento e enriquecimento ambiental em fêmeas adultas de camundongos suíços albinos de 6M, 12M e 18M. Para quantificar as mudanças, foi aplicado o fracionador óptico, um método estereológico de grande precisão que combina as propriedades do disector óptico e do fracionador, e que tem sido usado em uma variedade de estudos para determinar o número de células em numerosas regiões cerebrais. O fracionador óptico

não é afetado pelas mudanças histológicas, retração ou expansão impostas por possíveis processos patológicos, uma questão de particular importância quando se estuda o envelhecimento e outras doenças que afetam o volume cerebral. Encontrou-se um efeito diferencial do regime mastigatório, do envelhecimento e do enriquecimento ambiental sobre a astrogênese laminar de CA1 nas diferentes idades. Identificou-se, ainda, que as diferenças impostas pela dieta e pela idade foram contrabalançadas pelo enriquecimento ambiental em todos os estratos de CA1, mas não no *Stratum pyramidale* e no *Stratum radiatum*.

Os astrócitos hipocâmpais demonstram ser particularmente sensíveis ao envelhecimento<sup>20,21,22</sup> e ser afetados por desequilíbrios mastigatórios<sup>23,24,25</sup> e mudanças ambientais<sup>26</sup>. Os estudos anteriores empregando GFAP revelaram que a exodontia dos molares acentua a hipertrofia dos astrócitos e sua densidade, e que quanto mais duradoura é a condição sem molar, maiores são esses efeitos<sup>27</sup>. Nenhum dos estudos prévios mediu, entretanto, a influência do enriquecimento ambiental sobre tais mudanças, sendo o presente trabalho a primeira iniciativa nesse sentido. Com base em ensaios estereológicos, documentou-se também, em fêmeas adultas de camundongo suíço albino, aos 6M, 12M e 18M, que a distribuição laminar dos astrócitos de CA1 é especialmente suscetível a seis ou mais meses de privação mastigatória, assim como ao envelhecimento, e que o AE reduz essa suscetibilidade. Assim, o presente trabalho é uma descrição baseada em método estereológico, sem viés de como a distribuição laminar e o número de astrócitos em CA1 mudam com a redução da atividade mastigatória, o envelhecimento e o ambiente.

Ambiente / Janela temporal	Dieta		PE vs. PO	
	PE	PO	Teste t-Student (bicaudal)	p
AP 6M	49,58 ± 3,77	47,80 ± 2,89	$t_{(7)} = -0,3811$	0,7144
AP 12M	85,52 ± 1,49	78,40 ± 3,65	$t_{(8)} = -1,805$	0,1086
AP 18M	76,06 ± 4,35	74,30 ± 3,26	$t_{(8)} = -0,3237$	0,7544
AE 6M	43,58 ± 1,95	48,06 ± 2,31	$t_{(8)} = 1,4826$	0,1764
AE 12M	71,18 ± 3,93	63,12 ± 2,35	$t_{(8)} = -1,7596$	0,1164
AE 18M	66,00 ± 5,15	61,34 ± 3,74	$t_{(8)} = -0,7325$	0,4848

**Quadro 3** – Valores de média de peso e erro padrão para os animais com 6M, 12M e 18M criados em AP e AE alimentados com PE e PO e os valores de significância obtidos no test t-Student e o p-valor na comparação de grupos com mesma idade e ambiente, porém em diferente dieta

Dentre os achados apresentados, está o fato de o número de astrócitos, no *Stratum pyramidale*, aos 18M, em AE no grupo PO, ser reduzido quando comparado aos animais de 6M sob o mesmo regime mastigatório. Embora não se tenha explicação conclusiva para esse fato, sugere-se que, como o fator neurotrófico BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) contribui para a regulação da astrogênese, os níveis reduzidos de BDNF, associados ao envelhecimento e à restrição mastigatória, possam contribuir para o decréscimo no número de astrócitos<sup>28</sup>. Em contraposição, sugere-se também que a astrocitose, observada no *Stratum oriens* aos 18M, não é dependente de BDNF, mas sim parte da resposta inflamatória associada ao processo de envelhecimento<sup>29</sup>. Permanecem por serem investigados, entretanto, os possíveis mecanismos moleculares que tornam a astrogênese laminar diferencialmente sensível à restrição mastigatória ou aos efeitos combinados dos desequilíbrios mastigatórios e do envelhecimento. Nesse sentido, o efeito mais dramático de redução da astrogênese ocorreu no *Stratum pyramidale* de CA1 nos animais de 12M e que se estendeu aos animais de 18M, incluindo todos os regimes de dieta, sobretudo o PO. Em todos os outros estratos de CA1, o AE mostrou redução nas mudanças impostas pelo regime mastigatório, tornando os grupos sob diferentes regimes de dieta indistinguíveis uns dos outros.

Uma intensa imunomarcagem para GFAP, próxima das artérias da fissura hipocampal encontrada no presente trabalho, sugeriu um papel para os astrócitos dessa camada na regulação do fluxo sanguíneo cerebral de CA1 e do giro denteado. Realmente, existe evidência de que os astrócitos estão envolvidos no controle neurovascular<sup>11</sup>. Pelo fato de os astrócitos contribuírem para o fluxo sanguíneo local no hipocampo, documentou-se uma redução da imunomarcagem para GFAP nos animais velhos, independentemente do regime de dieta imposto, sendo possível prever que o fluxo sanguíneo hipocampal pode estar alterado aos 18M. Esse decréscimo na imunomarcagem para GFAP pode ser secundário a uma redução da atividade neural induzida pela idade na via de projeção temporoamônica do camundongo<sup>30,31</sup>. Entretanto, como a atrofia astrocítica nos animais submetidos à PO mostrou-se mais severa do que aquela observada nos animais com PE, uma interpretação alternativa é que o envelhecimento e a PO podem contribuir para o agravamento da redução do fluxo sanguíneo. Como não foi realizada uma correlação entre a densidade dos processos imunomarcados para GFAP e a função astrocítica, essa questão importante permanece por ser investigada.

Considerando-se os animais criados em AE e todas as suas camadas de CA1, não foi encontrada diferença entre os grupos AE/PE vs. AE/PO nas três janelas temporais. Em contraste com esse resultado, os animais do AP mostraram diferenças significativas nessas comparações. Além disso, aos 6M, sobretudo no grupo AE/PO, o que se viu, em todas as camadas,

foi uma quantidade de astrócitos superior ao grupo AP/PO. O enriquecimento ambiental, associado agora ao envelhecimento, não conseguiu deter a redução da quantidade de astrócitos, pois os grupos AE/PO de 12M e 18M não se distinguiram dos grupos AE/PE de 12M e 18M.

Diante desses resultados, sugere-se que a astrocitose aos 6M reuniria maior número de astrócitos com propriedades neuroprotetoras, e a privação mastigatória, nessa idade, impediria que o astrócito ofereça o suporte estrutural necessário aos neurônios para o desempenho das funções cerebrais normais<sup>32</sup>.

Cogita-se também a possibilidade de que a quantidade de astrócitos no envelhecimento esteja relacionada a mecanismos pró-inflamatórios, e, portanto, quando o envelhecimento estiver associado a uma condição de privação mastigatória, a interação redundará em declínio de funções cognitivas. Almeida et al<sup>16</sup>, ao submeterem camundongos velhos de AP a testes de memória espacial, concluíram que os animais não privados da atividade mastigatória apresentaram melhor performance que os privados, e, ao estenderem sua análise para camundongos jovens e adultos, obtiveram os mesmos resultados; Mendes<sup>33</sup> identificou a possibilidade da mastigação imprimir efeito positivo sobre o funcionamento hipocampal, destacando, assim, a importância de adotar medidas que evitem a redução da atividade mastigatória, ou, ainda, de promover a reabilitação da mesma; sendo todas essas alternativas de baixo custo para retardar ou recuperar déficits cognitivos indesejáveis.

Como um todo, os resultados sugerem que um decréscimo na atividade mastigatória e o envelhecimento possam estar interagindo e contribuindo para promover efeitos laminares diferenciais na astrogênese de CA1, e que o AE parece minimizar os efeitos da diferença na atividade mastigatória, que ainda estão sujeitos às influências do envelhecimento.

## CONCLUSÃO

A análise quantitativa estereológica da distribuição laminar dos astrócitos de CA1, empregando o fracionador óptico, revelou que alterações mastigatórias impostas pelo regime PO afetam o número de astrócitos de forma distinta nas diferentes camadas, sugerindo ser esse fato dependente da idade.

Com exceção do *Stratum pyramidale* de CA1, o AE mostra se contrapor às alterações laminares impostas pelo regime de redução mastigatória e envelhecimento a todos os outros estratos.

## APOIO FINANCEIRO

Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA – nº outorga 136/2008) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – nº processo 475677/2008-0).



## Masticatory change, enriched environment, and aging: stereological studies of CA1 in the hippocampus of Swiss albino mice

### ABSTRACT

**OBJECTIVES:** In order to investigate the effects of alteration in masticatory activity on the cell population, the consequences of the mash diet on the amount of astrocytes in CA1 (Ammon's horn 1) of the hippocampus were evaluated. In addition, the impacts of diet and possible changes associated with the enriched environment and neuropathological processes that may appear during aging were considered. **MATERIALS AND METHODS:** Female Swiss albino mice were divided into temporal windows of 6, 12 and 18 months. These animals were distributed in groups and received pelleted (PF) or mash (MF) feed, being raised in an enriched or standard environment. With the mentioned age reached, encephalic material was processed for immunohistochemistry of glial fibrillary acidic protein. With the aid of an optical fractionator, astrocytes were quantified in CA1, with variations among their layers. **RESULTS:** The environmental standard induced laminar changes in different models of all layers, identifying increases and decreases in the number of astrocytes (PF groups, *Stratum lacunosum-moleculare*; and MF, in all layers). In the enriched environment, significant changes were observed only in the pyramidal layer (between the ages of 6 and 12 months and of 6 to 18 months, with reduction in number of astrocytes). **CONCLUSION:** The differences found depend on diet, age and aging, suggesting that astrocytosis in young adult mice would be related to neuroprotective mechanisms and that masticatory deprivation at that age would influence this action negatively. In addition, astrocytes during aging would be involved in pro-inflammatory processes if associated with a condition in chewing alteration and environmental enrichment would provide neuroprotection to the malefic effects of aging and masticatory deprivation.

**Keywords:** Mastication; Aging; Astrocytes; Neurodegeneration.

## Alteración masticatoria, ambiente enriquecido y envejecimiento: estudios estereológicos de CA1 del hipocampo de ratones albinos suizos

### RESUMEN

**OBJETIVOS:** Con el objeto de investigar los efectos de la alteración de la actividad masticatoria sobre la población celular, se evaluaron las consecuencias de la dieta de molido grueso sobre la cantidad de astrocitos en CA1 (Cuerno de Amón 1) del hipocampo. Además, se consideraron los impactos de la dieta y las posibles alteraciones asociadas al ambiente enriquecido y a los procesos neuropatológicos que pueden surgir durante el envejecimiento. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Ratones hembras de la variedad albina suiza se dividieron en ventanas temporales de 6, 12 y 18 meses. Esos animales, distribuidos en grupos, recibieron ración en *pellet* (PE) o molido grueso (MG), siendo criados en ambiente enriquecido o estándar. Completadas las edades, se procesa material encefálico para inmunohistoquímica de la proteína fibrilar ácida de la glia. Con el auxilio del fraccionador óptico, se cuantificaron los astrocitos en CA1, destacándose variaciones entre sus camadas. **RESULTADOS:** El ambiente estándar indujo modificaciones laminares en diferentes modelos en todas las camadas, identificando aumentos y reducciones en el número de astrocitos (grupos PE, en el *Stratum lacunosum-moleculare*; y MG, en todas las camadas). En el ambiente enriquecido, se notaron modificaciones significativas solamente en la camada piramidal (entre las edades de 6 y 12 meses y de 6 y 18 meses, con reducción en el número). **CONCLUSIÓN:** Las diferencias encontradas serían dependientes de la dieta, de la edad y del envejecimiento, sugiriendo que la astrocitosis en ratones adultos jóvenes estaría relacionada a mecanismos neuroprotectores y que la privación masticatoria en esa edad influiría negativamente esa acción. Además, los astrocitos en el envejecimiento estarían involucrados en procesos proinflamatorios cuando asociados a una condición de alteración de la masticación y el enriquecimiento ambiental suministraría neuroprotección a los efectos maléficos del envejecimiento y de la privación masticatoria.

**Palabras clave:** Masticación; Envejecimiento; Astrocitos; Neurodegeneración.



### REFERÊNCIAS

- 1 Fridman C, Gregório SP, Dias Neto E, Ojopi EPB. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. Rev Psiquiatr Clin. 2004;31(1):19-25.
- 2 Lopes MA, Bottino CMC. Prevalência de demência em diversas regiões do mundo: análise dos estudos epidemiológicos em 1994 a 2000. Arq Neuro-Psiquiatr. 2002 mar;60(1):61-9.
- 3 Terasawa H, Hirai T, Ninomiya T, Ikeda Y, Ishijima T, Yajima T, et al. Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats: immunohistochemical and biochemical studies. Neurosci Res. 2002 Aug;43(4):373-9.
- 4 Aoki H, Kimoto K, Hori N, Toyoda M. Cell proliferation in the dentate gyrus of rat hippocampus as inhibited by soft diet feeding. Gerontology. 2005 Nov-Dec;51(6):369-74.



- 5 Watanabe K, Ozono S, Nishiyama K, Saito S, Tonosaki K, Fujita M, et al. The molarless condition in aged SAMP8 mice attenuates hippocampal Fos induction linked to water maze performance. *Behav Brain Res.* 2002 Jan;128(1):19-25.
- 6 Onozuka M, Fujita M, Watanabe K, Hirano Y, Niwa M, Nishiyama K, et al. Mapping brain region activity during chewing: a functional magnetic resonance imaging study. *J Dent Res.* 2002 Nov;81(11):743-6.
- 7 Sesay M, Tanaka A, Ueno Y, Lecaroz P, Beaufort DG. Assessment of regional cerebral blood flow by xenon-enhanced computed tomography during mastication in humans. *Keio J Med.* 2000 Feb;49 Suppl 1:A125-8.
- 8 Hasegawa Y, Ono T, Sakagami J, Hori K, Maeda Y, Hamasaki T, et al. Influence of voluntary control of masticatory side and rhythm on cerebral hemodynamics. *Clin Oral Investig.* 2011 Feb;15(1):113-8.
- 9 Figley CR, Stroman PW. The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals. *Eur J Neurosci.* 2011 Feb;33(4):577-88.
- 10 Lecrux C, Toussay X, Kocharyan A, Fernandes P, Neupane S, Levesque M, et al. Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J Neurosci.* 2011 Jul;31(27):9836-47.
- 11 Kuga N, Sasaki T, Takahara Y, Matsuki N, Ikegaya Y. Large-scale calcium waves traveling through astrocytic networks *in vivo*. *J Neurosci.* 2011 Feb;31(7):2607-14.
- 12 Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. Astrocytic endfoot  $Ca^{2+}$  and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Feb;107(8):3811-6.
- 13 Lee CJ, Mannaioni G, Yuan H, Woo DH, Gingrich MB, Traynelis SF. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J Physiol.* 2007 Jun;581(Pt 3):1057-81.
- 14 Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science.* 2007 Aug;317(5841):1083-6.
- 15 Pollak DD, Herkner K, Hoeger H, Lubec G. Behavioral testing upregulates pCaMKII, BDNF, PSD-95 and egr-1 in hippocampus of FVB/N mice. *Behav Brain Res.* 2005 Aug;163(1):128-35.
- 16 Almeida MNF, Mendes FCCS, Felício APG, Falsoni M, Andrade MLF, Bento-Torres J, et al. Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes. *BMC Neurosci.* 2012 Feb;13:23.
- 17 Diniz DG, Foro CA, Rego CM, Gloria DA, Oliveira FR, Paes JM, et al. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *Eur J Neurosci.* 2010 Aug;32(3):509-19.
- 18 Bruckner G, Grosche J, Hartlage-Rübsamen M, Schmidt S, Schachner M. Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J Chem Neuroanat.* 2003 Aug;26(1):37-50.
- 19 Long JM, Kalehua AN, Muth NJ, Calhoun ME, Jucker M, Hengemihle JM, et al. Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. *Neurobiol Aging.* 1998 Sep-Oct;19(5):497-503.
- 20 Landfield PW, Rose G, Sandles L, Wohlstadter TC, Lynch G. Patterns of astroglial hypertrophy and neuronal degeneration in the hippocampus of ages, memory-deficient rats. *J Gerontol.* 1977 Jan;32(1):3-12.
- 21 Lindsey JD, Landfield PW, Lynch G. Early onset and topographical distribution of hypertrophied astrocytes in hippocampus of aging rats: a quantitative study. *J Gerontol.* 1979;34(5):661-71.
- 22 Wu Y, Zhang AQ, Yew DT. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem Int.* 2005 Jun;46(7):565-74.
- 23 Kato T, Usami T, Noda Y, Hasegawa M, Ueda M, Nabeshima T. The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. *Behav Brain Res.* 1997 Feb;83(1-2):239-42.
- 24 Kubo KY, Iwaku F, Watanabe K, Fujita M, Onozuka M. Molarless-induced changes of spines in hippocampal region of SAMP8 mice. *Brain Res.* 2005 Sep;1057(1-2):191-5.
- 25 Yamamoto T, Hirayama A. Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. *Brain Res.* 2001 Jun;902(2):255-63.
- 26 Viola GG, Rodrigues L, Américo JC, Hansel G, Vargas RS, Biasibetti R, et al. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res.* 2009 Jun;1274:47-54.
- 27 Watanabe K, Tonosaki K, Kawase T, Karasawa N, Nagatsu I, Fujita M, et al. Evidence for involvement of dysfunctional teeth in the senile process in the hippocampus of SAMP8 mice. *Exp Gerontol.* 2001 Feb;36(2):283-95.
- 28 Mao L, Wang JQ. Adult neural stem/progenitor cells in neurodegenerative repair. *Acta Physiol Sinica.* 2003 Jun;55(3):233-44.

- 29 Godbout JP, Johnson RW. Age and neuroinflammation: a lifetime of psychoneuroimmune consequences. *Neurol Clin.* 2006 Aug;24(3):521-38.
- 30 Van Groen T, Miettinen P, Kadish I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus.* 2003;13(1):133-49.
- 31 Bartesaghi R, Gessi T. Activation of perforant path neurons to field CA1 by hippocampal projections. *Hippocampus.* 2003 Jan;13(2):235-49.
- 32 Haynes DE, organizador. *Neurociência fundamental para aplicações básica e clínicas.* 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. 653 p.
- 33 Mendes FCCS. Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. *BMC Neurosci.* 2013 Jun;14:63.

Recebido em / Received / Recibido en: 4/1/2016  
Aceito em / Accepted / Aceptado en: 9/8/2016