

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SHIRLEY JAQUELINE SZRIBER

**Balanço dos receptores mineralocorticoides e glicocorticoides no giro  
denteado do hipocampo de cães idosos**

---

Pirassununga – SP

2018

SHIRLEY JAQUELINE SZRIBER

**Balanço dos receptores mineralocorticoides e glicocorticoides no giro  
denteado do hipocampo de cães idosos**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência animal

Orientadora: Profa. Dra. Deise Carla Almeida Leite Dellova

---

Pirassununga - SP

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SS998b Szriber, Shirley Jaqueline  
Balanço dos receptores mineralocorticoides e glicocorticoides no giro denteado do hipocampo de cães idosos / Shirley Jaqueline Szriber ; orientadora Deise Carla Almeida Dellova. -- Pirassununga, 2018.  
59 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. envelhecimento. 2. caninos. 3. SNC. 4. MR e GR. 5. degeneração neuronal. I. Dellova, Deise Carla Almeida, orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome:** Shirley Jaqueline Szriber

**Título:** Balanço dos receptores mineralocorticoides e glicocorticoides no giro denteado do hipocampo de cães idosos

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Data de aprovação: 04/01/2018.

### Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele dos Santos Martins

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Munhoz Demarchi

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas I - USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Rubens Antonio Carneiro

Instituição: Escola de Veterinária - UFMG

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, por toda a educação, dedicação e apoio que sempre me deram, os quais foram essenciais para todo o meu caminho acadêmico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Profª Drª. Deise Carla Almeida Leite Dellova, por ter acreditado em mim e nesse projeto. E, ainda, por ter sido mais do que a minha orientadora de projetos científicos, mas uma conselheira profissional e exemplo de dedicação e eficiência, nos últimos 7 anos.

À Profª Drª Carolina Demarchi Munhoz, do ICBI-USP, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e tornar possível a execução desta pesquisa. Agradeço, também, por toda a disposição e colaboração.

Aos colegas de laboratório Dr. Nilton Barreto dos Santos e Ms. Leonardo Santana, ambos do ICBI-USP, pelos ensinamentos, discussões e toda colaboração para essa pesquisa. E, também, aos técnicos de laboratório do ICBI-USP, pela assistência na metodologia desenvolvida nesse trabalho.

À Profª Drª Sílvia Regina Ricci Lucas, diretora do hospital veterinário da FMVZ-USP e ao Prof Dr. Ricardo De Francisco Strefezzi, da FZEA-USP, pela ajuda com a obtenção das amostras de hipocampo.

À patologista Luciana Torres, ao técnico Edson Luis de Souza e aos residentes do departamento de patologia da FMVZ-USP: Vivian Rispoli, Diogo Tosi, Celina Seiko e Alessandra Loureiro, pela coleta das amostras de hipocampo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos usufruída por um período de doze meses e às agências de fomento FAPESP e CNPq, pelo auxílio financeiro para obtenção do material de consumo utilizado nesse projeto.

Aos meus pais, meu irmão e minha vó Rosa por todo apoio e suporte, sempre.

## RESUMO

SZRIBER, S. J. **Balanço dos receptores mineralocorticoides e glicocorticoides no giro denteado do hipocampo de cães idosos.** 2018. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Os receptores para mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR) representam importantes sítios de ligação para os glicocorticoides. Enquanto a ativação crônica e excessiva de GR leva à atrofia do hipocampo, a ativação do MR é neuroprotetora. Considerando as alterações no giro denteado (GD), decorrentes do envelhecimento, e a possível participação do MR e GR neste processo, o objetivo deste trabalho foi correlacionar o desbalanço de tais receptores com a degeneração neuronal nesta região do hipocampo de cães idosos. Para isso, utilizaram-se cortes histológicos do hipocampo de 6 cadáveres caninos jovens/adultos (até 8 anos de idade) e 12 idosos (idade igual ou superior a 10 anos), de ambos os sexos e de qualquer raça, os quais foram submetidos à: coloração de Nissl, para a identificação de células nervosas; imuno-histoquímica, para o estudo da expressão do MR e GR; e marcação fluorescente (fluoro-jade B), para detecção de neurônios em degeneração. A camada polimórfica do GD de cães idosos apresentou redução (em 16%) na contagem de neurônios e maior número de neurônios em degeneração. Em conjunto com estas alterações celulares, a menor marcação/expressão do MR e a menor relação MR:GR foram correlacionadas com a degeneração neuronal na camada polimórfica do GD de cães idosos. Além disso, cadelas idosas apresentaram menor densidade celular na camada granular, quando comparadas aos machos idosos, sugerindo uma ação diferencial dos esteroides sexuais nas alterações do GD. Os resultados indicam que o desbalanço na relação MR:GR pode interferir na sobrevivência neuronal no GD de cães idosos.

**Palavras-chave:** envelhecimento; caninos; SNC; MR e GR; degeneração neuronal.

## ABSTRACT

SZRIBER, S. J. **Balance of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the dentate gyrus of the hippocampus of aged dogs.** 2018. 59 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors bind the glucocorticoid hormones. The chronic and excessive GR activation leads to hippocampus atrophy. By contrast, MR activation is neuroprotective. Considering the aging changes in the dentate gyrus (DG) and the possible participation of MR and GR in this process, the objective of this study was to correlate the unbalance of these receptors with the neuronal degeneration in this hippocampal region of aged dogs. For that purpose, cadaveric histologic sections of hippocampus of 6 young/adult dogs (until 8 years old) and 12 aged dogs (more than 10 years old), of both sex and any breed, were included. The Nissl staining and immunohistochemistry were performed to identify nerve cells and to study the MR and GR expression, respectively. Moreover, fluorescent labeling (fluoro-Jade B) was used to detect degenerating neurons. The polymorphic layer of the DG of aged dogs showed reduction (of 16%) on the neurons counting and more degenerating neurons. Together with this cells changes, the less MR expression and MR:GR relation were correlated with the neuronal degeneration in the polymorphic layer of DG of aged dogs. Besides that, aged females presented lower cell density in the granular layer, when compared to aged males, suggesting a differential sex steroid action on changes in the DG. Our results indicate that unbalance on the MR:GR relation may interfere with neuronal survival in the DG of aged dogs.

**Keywords:** aging; dogs; CNS; MR and GR; neuronal degeneration.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquematização dos mecanismos genômicos e não genômicos dos glicocorticoides (GCs) em neurônios via GR e MR.....	15
Figura 2 – excitação do hipocampo pela ação não-genômica do glicocorticoide (GC). .....	17
Figura 3 – Esquema do plano sagital do hipocampo.....	18
Figura 4 – Camadas do giro denteado (GD) e conexões com corno ammonis 3 (CA3). .....	19
Figura 5 – Controle do hipocampo sobre o eixo Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal.....	20
Figura 6 – Delineamento experimental do projeto.....	27
Figura 7 – Corte sagital do giro denteado de cão.....	33
Figura 8 – Densidade de células nervosas na camada granular do giro denteado.....	34
Figura 9 – Contagem de neurônios na camada polimórfica do giro denteado.....	35
Figura 10 – Identificação de células nervosas no giro denteado de cães. .....	36
Figura 11 – Marcação para MR em neurônios da camada polimórfica do giro denteado .....	37
Figura 12 – Marcação para GR em neurônios da camada polimórfica do giro denteado .....	37
Figura 13– Relação MR:GR em neurônios da camada polimórfica do giro denteado..	38
Figura 14 – Marcação para MR no giro denteado.....	39
Figura 15 – Marcação para GR no giro denteado.....	39
Figura 16 – Contagem de neurônios fluoro-Jade B positivos na camada polimórfica do giro denteado.....	40
Figura 17 – Marcação com fluoro-jade B no giro denteado.....	41
Figura 18 – Densidade de células nervosas na camada granular de machos e fêmeas idosos.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos cães jovens e adultos.....	32
Tabela 2 – Dados dos cães idosos.....	33
Tabela 3 – Identificação das células no giro denteado. Densidade e contagem celular nos grupos JAd e Id .....	35
Tabela 4 – Marcação para os receptores MR e GR e relação MR:GR nos grupos JAd e Id .....	38
Tabela 5 – Marcação com fluoro-jade B para neurônios em degeneração nos grupos JAd e Id .....	40
Tabela 6 – Correlação linear (coeficiente de Pearson) entre os parâmetros avaliados. ....	42
Tabela 7 – Comparação entre machos e fêmeas idosos para os parâmetros avaliados. ....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
Ampa	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
CA1	cornu ammonis 1
CNS	<i>central nervous system</i>
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
ERK1/2	quinase regulada por sinal extracelular
ERO	espécies reativas de oxigênio
GCs	glicocorticoides
GD	giro denteado
GR	receptores para glicocorticoides
HHS	eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal
HREs	elementos responsivos ao hormônio
Id	idosos
IgG	imunoglobulina G
JAd	jovens/adultos
KPBS	solução salina de fosfato de potássio tamponada
LTP	<i>long term potentiation</i>
MR	receptor para mineralocorticoides
NMDA	N-metil-D-aspartato
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PVN	núcleo paraventricular
SNC	sistema nervoso central

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 MR e GR .....	14
2.2 Ações do MR e GR no hipocampo.....	16
2.3 Controle do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal pelo hipocampo .....	19
2.4 Efeitos da exposição crônica aos GCs sobre o hipocampo .....	21
2.5 Alterações neurológicas de envelhecimento em humano e cães .....	22
2.5.1 Perda neuronal no hipocampo de idosos.....	22
2.6 Exposição crônica aos GCs e alterações neuropatológicas do envelhecimento .....	23
2.7 Balanço MR:GR no SNC.....	24
<b>3 OBJETIVO</b> .....	26
<b>4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	27
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
5.1 Amostras de hipocampo e considerações éticas .....	28
5.1.1 Grupos experimentais.....	28
5.2 Processamento das amostras.....	28
5.3 Região do hipocampo avaliada.....	29
5.4 Coloração de Nissl para identificação de células nervosas .....	29
5.5 Marcação para MR e GR por imuno-histoquímica .....	30
5.6 Marcação de células em degeneração com fluoro-Jade B .....	31
5.7 Forma de análise dos resultados.....	31
<b>6 RESULTADOS</b> .....	32
6.1 Caracterização dos grupos experimentais .....	32
6.2 Região avaliada no giro denteado (GD).....	33
6.3 Identificação de células nervosas pela coloração de Nissl .....	34
6.3.1 Densidade de células nervosas na camada granular do GD .....	34
6.3.2 Contagem de neurônios na camada polimórfica do GD .....	34
6.4 Marcação para MR e GR em neurônios da camada polimórfica do GD por imuno- histoquímica.....	36
6.5 Identificação de neurônios em degeneração na camada polimórfica do GD pela coloração fluoro-Jade B .....	39
6.6 Correlações .....	41

6.7 Comparação dos parâmetros avaliados no grupo Id, de acordo com o sexo.....	42
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos dos glicocorticoides (GCs), como o cortisol (em humanos) e a corticosterona (em roedores), são mediados pelos receptores para mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR). No sistema nervoso central, estes receptores são expressos de forma significativa no hipocampo, onde participam da modulação de processos cognitivos, como a memória e o aprendizado (DE KLOET, 2014).

Enquanto a ativação excessiva do GR, causada pela exposição crônica a elevadas concentrações de GCs, gera efeitos negativos sobre as funções do hipocampo, o MR, predominantemente ocupado sob concentrações basais dos GCs, parece auxiliar em processos cognitivos e neuroprotetores, por meio de mecanismos neurogênicos e antiapoptóticos (DE KLOET; JOËLS; HOLLSBOER, 2005; GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014).

O balanço entre a expressão do MR e do GR, em áreas cerebrais, tem relação com o declínio cognitivo (representado pela diminuição da capacidade de percepção, memorização e aprendizado) e a neurodegeneração (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014; DE KLOET, 2014).

Elevados níveis de GCs estão relacionados com efeitos deletérios estruturais e cognitivos sobre o hipocampo. Tais efeitos podem justificar alterações encontradas no processo de envelhecimento do sistema nervoso, uma vez que altas concentrações circulantes desses esteroides foram relatadas em humanos e animais idosos, com aparente disfunção de memória e diminuição do volume do hipocampo (MIZOGUCHI et al., 2009).

O avanço na medicina veterinária teve impacto positivo sobre o aumento da longevidade da população canina (O'NEILL, et al., 2013), conseqüentemente, o número de atendimentos de cães com disfunção cognitiva é crescente (SALVIN, et al., 2010). O envelhecimento do sistema nervoso central (SNC) do cão está associado ao declínio cognitivo e alterações neuropatológicas, semelhantes às encontradas em pacientes com Alzheimer, uma doença degenerativa caracterizada pelo declínio cognitivo progressivo em seres humanos. Devido às similaridades das lesões, a espécie canina parece ser um bom modelo animal para o estudo do envelhecimento humano e de tal doença (DAVIS; HEAD, 2014; SIWAK-TAPP et al., 2008; OSELLA et al., 2007; ANDRADE-NETO, 2015).

Considerando o aumento da expectativa de vida canina (O'NEILL et al., 2013) e os processos neurodegenerativos associados ao envelhecimento (MELIS et al., 2013), torna-se necessário o estudo dos mecanismos envolvidos nas alterações neuropatológicas encontradas em cães idosos, de diferentes raças, e que fazem parte da rotina clínica. Dessa forma, seria possível entender as condições em que o SNC dessa espécie está submetido, com o avançar da idade.

Entre as alterações neuropatológicas do envelhecimento, está a variação na expressão do MR e GR no GD do hipocampo. Nenhum estudo anterior demonstrou a influência da relação MR:GR sobre a neurodegeneração do GD de cães idosos provenientes da rotina clínica. Assim, esse estudo torna-se relevante para o entendimento dos efeitos dos glicocorticoides sobre a sobrevivência neuronal do GD de cães idosos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MR e GR

O MR e o GR pertencem à superfamília dos receptores esteroidais (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014) e estão envolvidos nas respostas celulares dos GCs (DE KLOET, 2014). Os GCs são importantes para diversas funções celulares, sendo liberados em condições basais, como ao longo dos ciclos circadianos e ultradianos, e em situações de estresse (JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012).

Os receptores MR e GR são altamente homólogos (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014) e apesar de o cortisol ser o ligante primário do GR, a sua afinidade pelo MR pode ser até 10 vezes maior do que pelo GR (BELLAVANCE; RIVEST, 2014). Assim, enquanto o MR é ocupado de forma intensa por concentrações basais de GCs, o GR é ativado por altas concentrações hormonais, o que ocorre durante os picos circadianos/ultradianos e em situações de estresse moderado a intenso (DE KLOET et al., 2014; VYAS et al., 2016).

Ao serem ativados pelos GCs, o MR e o GR podem mediar efeitos genômicos (lentos) e não genômicos (rápidos) (Figura 1).

Os efeitos genômicos dependem de receptores localizados no citoplasma celular, na forma de complexos multiproteicos, associados principalmente às proteínas de choque térmico (Hsp) (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; BARRETO-CHAVES et al., 2012). Após a ligação do MR e GR com os GCs, ocorre a dissociação do complexo multiproteico, e os receptores associados ao ligante são direcionados do citoplasma para o núcleo, onde passam a regular a transcrição gênica, pela ligação com a região promotora dos genes responsivos aos GCs, ou também interagem com fatores de transcrição, passando a facilitar ou reprimir a transcrição gênica (DATSON et al., 2008, OAKLEY; CIDLOWSKY, 2013; JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012).

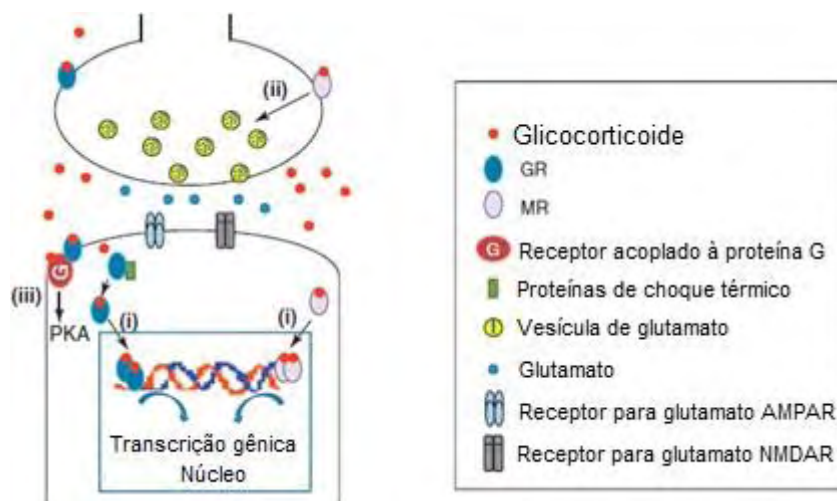
Nos neurônios do hipocampo, a ação nuclear do GR promove, ainda, o aumento da inserção de receptores de glutamato (principal neurotransmissor excitatório do SNC) do tipo Ampa (alfa-amino-3-hidroxila-5-metil-4-isoxazol-propionato) em locais sinápticos, que servem para intensificar a transmissão sináptica e promover consolidação da memória (CONBOY; SANDI, 2010).



Em neurônios do hipocampo, os efeitos não genômicos (independentes da transcrição gênica) podem ser mediados pela ligação dos GCs com receptores MR e GR presentes na membrana citoplasmática pré e pós-sináptica, o que tem como consequência a ativação de proteínas quinases A e C (PKA e PKC). No mecanismo de ativação de proteínas quinases também pode haver a participação de receptores ligados à proteína G (DE KLOET, 2014; JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012; SANDI, 2011; OLIJSLAGERS et al., 2008; TASKER; DI; MALCHER-LOPES, 2006; FUNDER, 2001).

Efeitos rápidos e não genômicos associados ao MR e GR de membrana ativam vias de sinalização celular que também modulam a transcrição gênica. Portanto, os efeitos genômicos e não genômicos, desencadeados pelo MR e GR, são necessários para a resposta integrada ao estresse, em diferentes regiões do SNC (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014). Uma esquematização destes efeitos dos GCs em uma célula neuronal é apresentada na Figura 1.

Figura 1 – Esquematização dos mecanismos genômicos e não genômicos dos glicocorticoides (GCs) em neurônios via GR e MR



Ao se ligarem aos GCs, os receptores para GCs (GR) e mineralocorticoides (MR) se dissociam das proteínas de choque térmico. Depois, os receptores se translocam para o núcleo e regulam a transcrição gênica de várias proteínas. O MR de membrana foi descrito pré-sinápticamente e também participa do aumento de liberação do glutamato. O GR de membrana está ligado à proteína G e sua ativação resulta em aumento da sinalização de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e consequente aumento da atividade da proteína quinase A (PKA). Fonte: SANDI, C. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 4, p. 165-176, 2011.

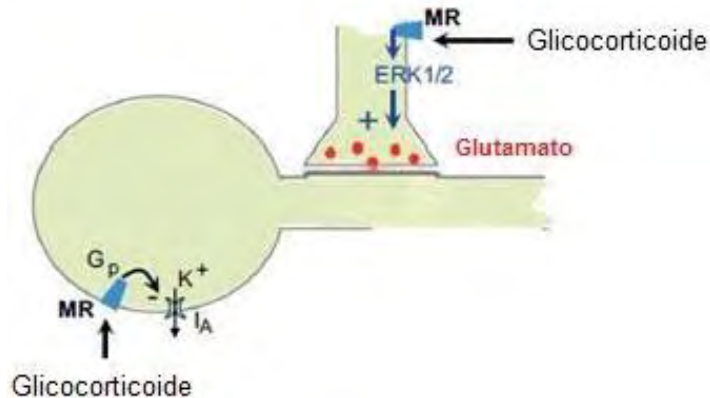
Devido à homologia que apresentam, MR e GR compartilham os mesmos elementos responsivos ao hormônio (HREs) no DNA e, além dos homodímeros, formam heterodímeros, antes de se ligarem ao HRE. Homodímeros de MR e GR apresentam eficiências transcricionais diferentes entre si e quando comparados aos heterodímeros, o que justifica os distintos efeitos do cortisol. Ou seja, há o predomínio de homodímeros de MR mediante concentrações baixas de cortisol, enquanto que, os heterodímeros e homodímeros de GR predominam em altas concentrações deste hormônio (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014).

## **2.2 Ações do MR e GR no hipocampo**

Junto com outras regiões do sistema límbico (córtex pré-frontal e amígdala), o hipocampo é responsável pelo processo de avaliação de eventos físicos ou psicológicos, que podem atuar como possíveis estressores. Quando estes eventos não correspondem a uma situação conhecida, ocorre uma resposta de estresse, com um aumento na excitação e estado de alerta, a partir dessas regiões límbicas (DE KLOET, 2014; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005).

A avaliação de um evento, assim como a recuperação de uma informação armazenada, é iniciada pela rápida excitação da região límbica, após a ativação do MR de membrana. Este efeito rápido do MR deve-se à liberação pré-sináptica de glutamato, o que leva a uma corrente pós-sináptica excitatória (OLIJSLAGERS et al., 2008; KARST et al., 2005) e aos efeitos pós-sinápticos na condutância dos canais de potássio (Figura 2) (OLIJSLAGERS et al., 2008).

Figura 2 – Excitação do hipocampo pela ação não genômica do glicocorticoide (GC)

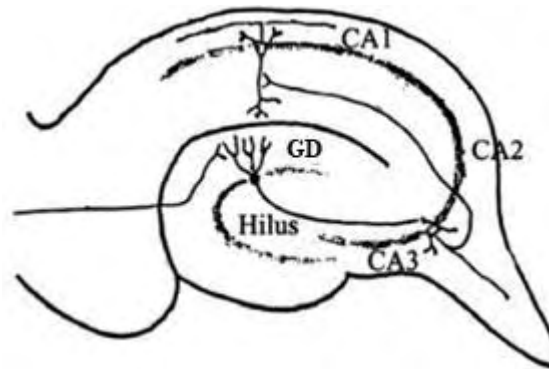


No hipocampo, o GC se liga ao MR pré-sináptico e causa um rápido aumento na liberação de glutamato, via sinalização da ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular). O GC também pode se ligar ao MR pós-sináptico, o qual está acoplado à canais de potássio ligados à proteína G. Fonte: JOELS, M.; SARABDJITSINGH, R. A.; KARST, H. Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 4, p. 901-938, 2012.

Após a ativação dos receptores de glutamato tipo Ampa e NMDA (N-metil-D-aspartato), inclusive com a participação do GR, ocorre um influxo de cálcio e ativação de uma cascata bioquímica de quinases, com consequente sinalização nuclear, transcrição gênica e síntese proteica, que resultam em modificações estruturais nas sinapses (forma e quantidade de espinhos dendríticos), cruciais para a formação da memória (SANDI, 2011).

O hipocampo é subdividido em regiões, denominadas: corno ammonis (CA1, CA2, CA3 e CA4), giro denteado (GD) e subículo. A região interna do GD corresponde ao hilus (TAUPIN, 2007) (Figura 3). O MR e GR estão co-expressos em quase todas as sub-regiões hipocampais (PATEL et al., 2000) e atuam conjuntamente em processos de avaliação de uma nova situação e na retenção das informações adquiridas (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005).

Figura 3 – Esquema do plano sagital do hipocampo

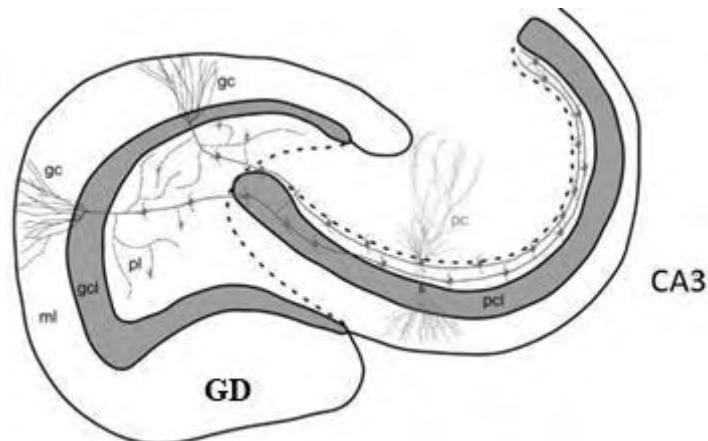


Identificação das sub-regiões do hipocampo: corno amonis 1, 2 e 3 (CA1, CA2 e CA3), giro denteado (GD) e sua região hilar (hilus). Fonte: adaptado de TAUPIN, P. **The Hippocampus: neurotransmission and plasticity in the nervous system**. Nova York: Nova Science Publishers, Nova York, 2007.

O GD do hipocampo tem importante envolvimento em processos de memória, por meio do sistema de conexões GD-CA3 (MCEWEN, 2004; MCAVOY; SAHAY, 2017). O processo de memória nesse sistema envolve a transmissão da informação oriunda do córtex entorrinal para o GD e CA3, e essas sub-regiões do hipocampo são reciprocamente conectadas (LISMAN, 1999) (Figura 4). Os mecanismos de formação de memória utilizados por esse sistema são os mesmos que parecem estar afetados nos déficits relacionados ao envelhecimento (MCAVOY; SAHAY, 2017).

O GD é composto por 3 camadas: a camada molecular, granular e polimórfica, as quais interagem funcionalmente entre si (Figura 4). A camada molecular é ocupada principalmente por dendritos de células granulares e células da camada polimórfica, assim como axônios do córtex entorrinal. A camada granular é formada por células fortemente compactadas e unidas, as quais são resultados de processos de *turnover* gerado pela neurogênese do GD. Por fim, a camada polimórfica, localizada dentro do hilus, apresenta uma variedade de neurônios diferentes, incluindo interneurônios inibitórios (AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007; TAUPIN, 2007).

Figura 4 – Camadas do giro denteado (GD) e conexões com corno amonís 3 (CA3)



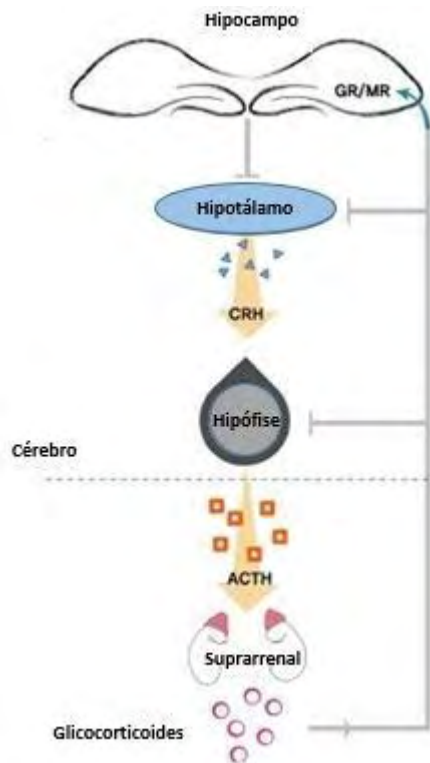
ml= camada molecular; gc= camada granular; pl= camada polimórfica. Fonte: adaptado de AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Progress in brain research**, v. 163, p. 3-790, 2007.

### 2.3 Controle do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal pelo hipocampo

Além das funções de memória e aprendizado, o hipocampo também está envolvido no controle do eixo Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal (HHS) (LUCASSEN et al., 2006; HERMAN et al., 2005) (Figura 5). O HHS é responsável pela regulação da concentração de GCs na corrente sanguínea. A liberação dos GCs pela suprarrenal ocorre após ação estimulatória do hipotálamo sobre a adenohipófise e da adenohipófise sobre o córtex da suprarrenal. Os hormônios envolvidos nestas duas estimulações são o hormônio liberador de corticotrofina (CRH- *corticotropin releasing hormone*) e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH- *adrenocorticotropic hormone*), respectivamente (HERMAN et al., 2005).

A regulação do HHS pelos GCs inclui mecanismos de retroalimentação, que envolvem as suprarrenais, o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo e estruturas límbicas, como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (HILL et al., 2011)

Figura 5 – Controle do hipocampo sobre o eixo Hipotálamo-Hipófise-Suprarrenal



O estresse estimula a liberação de glicocorticoides, os quais exercem um mecanismo de retroalimentação sobre o hipocampo, hipotálamo e hipófise (ou pituitária). Fonte: adaptado de SASWATI P. et al. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 7, n. 43, 2015.

O envolvimento do hipocampo no controle do eixo HHS parece ser de extrema importância, uma vez que lesões nessa estrutura interferem na retroalimentação do eixo HHS e promovem a elevação de CRH, ACTH e cortisol (HERMAN et al., 2005).

A retroalimentação depende do MR e GR presentes nas regiões regulatórias do eixo HHS. Enquanto o GR está envolvido no término da resposta ao estresse, o MR parece ser responsável pelo controle basal do eixo HHS (HERMAN et al., 2003; DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, 2005). O MR está, ainda, envolvido no processo de ambientação, no qual há uma diminuição da resposta ao estresse, quando este aparece na mesma forma (homotípico) e repetidamente (COLLE et al., 2000).

O hipocampo parece regular a liberação de GCs por uma via neuronal inibitória, em que suas terminações nervosas participam de sinapses glutamatérgicas em regiões intermediárias, e dessas regiões saem projeções nervosas GABAérgicas inibitórias (provenientes das seguintes regiões: núcleo estriado, região peri-PVN,

região ventrolateral da área medial pré-óptica, região ventrolateral do núcleo hipotalâmico dorsomedial) para o PVN, prevenindo a liberação do CRH (HERMAN et al., 2003). Como consequência, haverá uma diminuição dos GCs circulantes. (HERMAN et al., 2005).

Evidências do envolvimento do hipocampo no controle dos GCs circulantes podem ser demonstradas, também, pela relação dos elevados níveis de cortisol em idosos com: 1) disfunções neuronais hipocampais, 2) a menor expressão de receptores esteroides nesta região e 3) as respostas prolongadas ao estresse. Estas relações levaram à hipótese da cascata dos GCS, a qual sugere um ciclo vicioso entre os efeitos lesivos dos GCs sobre o hipocampo e a falha na regulação do eixo HHS (SAPOLSKY et al., 1986a; SECKL; OLSSON, 1995; ELGH et al., 2006).

## **2.4 Efeitos da exposição crônica aos GCs sobre o hipocampo**

A exposição crônica aos GCs causa efeitos deletérios, tanto sobre a função cognitiva desempenhada, quanto sobre a estrutura desta região (LEE et al., 2002; SOUSA et al., 2008; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; KIM; DIAMOND, 2002). O excesso de GCs pode reduzir a capacidade de aprendizado e memória, ao prejudicar a *Long Term Potentiation* (LTP; responsável pela manutenção da excitação nas sinapses que resultam na formação da memória) (JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012; JOELS; KRUGERS, 2007; SOUSA et al., 2008) e a plasticidade sináptica, e ainda promover a atrofia da árvore dendrítica (JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012; SOUSA et al., 2008; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; WIEGERT et al., 2005).

Os altos níveis de GCs podem causar danos irreversíveis, como a perda neuronal, devido às alterações no metabolismo energético, citotoxicidade (relacionada ao acúmulo de glutamato na fenda sináptica), elevação do cálcio citosólico neuronal e ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LEE et al., 2002). O excesso de glutamato ocorre devido à redução de captação deste neurotransmissor na fenda sináptica. Tal efeito pode ser causado, pelo menos parcialmente, pelo déficit energético neuronal causado pelos GCs. Como resultado da alta quantidade de glutamato extracelular, ocorre a ligação com os seus receptores do tipo NMDA e uma grande mobilização de cálcio extracelular para o interior da célula. Consequentemente, acontece uma superatividade de enzimas cálcio-

dependentes, as quais podem causar degradação do citoesqueleto e gerar ERO, levando a morte neuronal (YANG; HUANG; HSU, 2005; SAPOLSKY, 1986b; LEE et al., 2002).

O aumento do cálcio intracelular também pode ser ocasionado pela inibição da transcrição e da atividade da cálcio-ATPase (responsáveis pelo efluxo desse íon), devido aos efeitos dos GCs (BHARGAVA et al., 2000).

## **2.5 Alterações neurológicas do envelhecimento em humano e cães**

O processo de envelhecimento é acompanhado de uma deterioração da homeostase e função tecidual e varia entre diferentes indivíduos e órgãos (MELIS et al., 2013). O SNC é altamente vulnerável a este processo, devido a sua grande necessidade de oxigênio e a sua baixa capacidade antioxidante (DROR et al., 2014). O *status* antioxidante é um fator de grande relevância para a resposta tecidual mediante o processo de envelhecimento (COTMAN et al., 2002; SOHAL et al., 2002; TAPP et al., 2003).

Assim como os humanos, os caninos apresentam um declínio cognitivo associado ao envelhecimento, representado pela menor capacidade de aprendizado e memória (YOUSSEF et al., 2016). Esse déficit pode ser ocasionado por alterações moleculares e estruturais no SNC de idosos, como a perda neuronal (que pode resultar na atrofia cerebral) (SIWAK-TAPP et al., 2008; PUGLIESE et al., 2007; ROFINA et al., 2006).

No atendimento veterinário, os cães idosos (com ou sem manifestações clínicas relacionadas à disfunção cognitiva) apresentam uma grande variedade racial e também no peso corporal (incluindo cães de pequeno, médio e grande portes). No entanto, estudos de Rofina et al. (2006) e Yu et al. (2011) não evidenciaram a influência do padrão racial sobre as alterações cerebrais observadas nos cães idosos. Considerando a idade dos cães, as alterações estruturais hipocâmpais (como a perda neuronal, lesões vasculares e deposição beta amiloide) foram evidenciadas principalmente em animais com mais de 10 anos (SCHMIDT et al., 2015; YU et al., 2011).

### **2.5.1 Perda neuronal no hipocampo de idosos**



A atrofia cerebral, que ocorre em indivíduos idosos ou com doenças neurodegenerativas, pode ser uma consequência da perda de neurônios ou da alteração da densidade desse tipo celular (YOUSSEF et al., 2016). A redução de volume, em certas regiões cerebrais, é fortemente correlacionada ao declínio cognitivo (ROFINA et al., 2006).

Entre os mecanismos da perda neuronal, o processo apoptótico parece apresentar grande relevância. No estudo de Kiatipattanasakul et al. (1996), foi demonstrado que o declínio da função cognitiva em caninos idosos está correlacionado com o número de células em apoptose (células TUNEL-positivas).

A morte de neurônios causada por ERO está relacionada com o dano a proteínas, lipídios e nucleotídeos (HEAD, 2013). O estresse oxidativo, que ocorre em idosos, é resultado da maior produção de ERO pela mitocôndria (SHIGENAGA et al., 1994; HEAD et al., 2009), associada à menor capacidade antioxidante (HEAD et al., 2002; KIATIPATTANASAKUL et al., 1997).

O hipocampo é uma região que sofre grande perda neuronal com o processo de envelhecimento. No GD de cães idosos foi demonstrada uma perda de 30% de neurônios, a qual foi relacionada com redução de habilidade cognitiva (SIWAK-TAPP et al., 2008). A redução do volume hipocampal pode ser ainda exacerbada pela redução da neurogênese nesta região (YOUSSEF et al., 2016).

## **2.6 Exposição crônica aos GCs e alterações neuropatológicas do envelhecimento**

As alterações patológicas encontradas no SNC de indivíduos idosos podem ser, em parte, devido aos efeitos dos GCs. Alterações na concentração dos GCs foram relatadas em humanos e animais idosos (MIZOGUCHI et al., 2009), sendo correlacionadas com disfunções de memória e diminuição do volume do hipocampo. Aparentemente, tais complicações estão mais relacionadas à ação hormonal do que a idade do indivíduo; de maneira que animais (roedores e macacos) de meia idade, expostos a altas concentrações de GCs, por longos períodos, desenvolveram disfunções de memória e atrofia de hipocampo, similares às observadas em animais mais velhos. Inversamente, quando os animais de meia idade se apresentam com baixos níveis de GCs, tais alterações podem ser evitadas na velhice (LUIPIEN et al., 2009)

Os GCs podem, ainda, contribuir para disfunções neurológicas presentes em doenças neurodegenerativas. Já foi demonstrado que a concentração de cortisol é mais elevada em indivíduos com Alzheimer, quando comparados a indivíduos hígidos (MURIALDO et al., 2000), e que tal condição está correlacionada com a severidade da doença (GIUBILEI et al., 2001).

Na espécie canina também foi demonstrada a relação dos níveis de GCs e perda neuronal no hipocampo. Nas células do hipocampo de cães submetidos ao estresse crônico (por meio de estimulação elétrica e contenção) e que, conseqüentemente, apresentaram elevações na concentração sérica de cortisol, observou-se o aumento da apoptose, em relação à situação controle (ausência de estresse) (LUO et al., 2015).

A influência dos GCs sobre o envelhecimento cerebral também pode estar relacionada à redução da atividade de enzimas antioxidantes e conseqüente aumento de ERO, induzidos por esses esteroides (MCINTOSH, 1998).

## **2.7 Balanço MR:GR no SNC**

Os níveis circulantes dos GCs determinam a ocupação do MR e GR e podem causar efeitos opostos na função cognitiva. Enquanto a ativação do MR aumenta em processos relacionados à memória, o estresse associado à ativação do GR pode comprometer esta função (DE KLOET, 2014; KIM; DIAMOND, 2002; FERGUSON; SAPOLSKY, 2007). Tal fato pode estar relacionado ao aumento e diminuição do potencial de longa duração (citado no item 2.4), causado por níveis basais (via MR) ou muito elevados (via GR) de GCs (JOELS; SARABDJITSINGH; KARST, 2012). O GR pode, ainda, prejudicar a plasticidade sináptica, por mecanismos que envolvem o receptor de glutamato do tipo NMDA (explicação no item 2.4) (WIEGERT et al., 2005).

No estudo de Brinks et al. (2007), ratos adrenalectomizados e suplementados com baixas doses de corticosterona (ativando primariamente o MR), foram rápidos aprendizes e mais exploradores em relação ao seu grupo controle; enquanto que no grupo tratado com alta dose de corticosterona (ativando mais o GR) observou-se o déficit de aprendizado (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014).

A ativação de MR e GR também causa efeitos contrários na estrutura hipocampal. Foi demonstrado que, enquanto a ativação crônica e excessiva de GR

leva à atrofia do hipocampo, a ativação do MR é antiapoptótica e importante para a neurogênese (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014).

Devido aos diferentes efeitos que o MR e o GR apresentam, é importante que haja um equilíbrio na expressão e ativação desses receptores. Evidenciou-se que a razão entre a expressão do MR e do GR, em áreas cerebrais, tem relação com o declínio cognitivo (representado pela diminuição da capacidade de percepção, memorização e aprendizado) em humanos (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014).

Possivelmente, uma alteração na expressão do MR e GR, alterando a relação (balanço) entre esses receptores pode levar ao comprometimento da resposta ao estresse, e, conseqüentemente, à desregulação do eixo HHS e maior susceptibilidade à neurodegeneração (DE KLOET, 2014).

No hipocampo de cães idosos saudáveis, Choi et al. (2008) observaram um desbalanço na relação MR:GR, devido à diminuição na expressão do MR. Considerando a importância do GR e MR sobre a função cognitiva e a suposta correlação entre os GCs e processos degenerativos, a hipótese deste estudo é que o desbalanço entre tais receptores (baixa relação MR:GR) pode ser, em parte, responsável pelas alterações encontradas no cérebro de caninos idosos.

### 3 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi determinar a expressão dos receptores MR e GR, a relação MR:GR e a degeneração neuronal no giro denteado (GD) de cães, procurando estudar o efeito do envelhecimento sobre estes parâmetros e a perda de células nervosas, além das diferenças entre machos e fêmeas idosos.

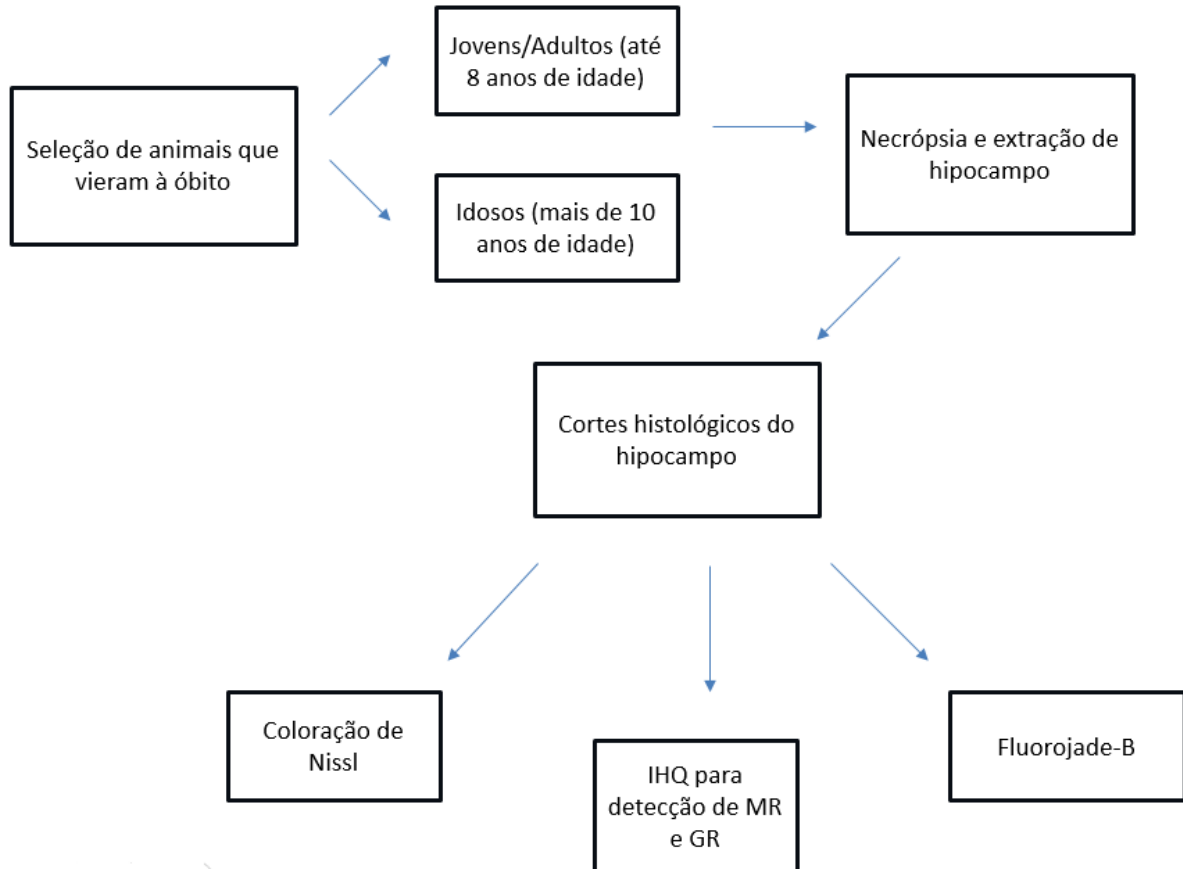
A partir da obtenção do hipocampo de cadáveres de cães jovens/adultos e idosos, de ambos os sexos, foram elaboradas as seguintes estratégias:

- a) quantificar as células nervosas nas camadas granular e polimórfica do GD;
- b) avaliar a imunomarcagem para MR e GR, para depois determinar a relação MR:GR na camada polimórfica;
- c) determinar a degeneração neuronal com uso de marcação fluorescente (fluoro-jade B) na camada polimórfica e
- d) correlacionar a expressão dos receptores MR e GR com a degeneração neuronal na camada polimórfica.

#### 4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi realizado de acordo com o organograma apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Delineamento experimental do projeto.



IHQ= Imunohistoquímica. MR = receptor de mineralocorticoide. GR = receptor de glicocorticoide

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Amostras de hipocampo e considerações éticas

As amostras de hipocampo foram obtidas a partir de cadáveres de cães, submetidos à necropsia no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ- USP).

As informações sobre os cães (raça, sexo, idade, peso corporal e diagnóstico presuntivo) foram coletadas da ficha de necropsia, sempre que possível.

Não foram incluídas nesse estudo amostras de cães que tenham vindo a óbito em decorrência de alterações metabólicas, como: encefalopatia renal ou hepática, e cetoacidose diabética; doenças infecciosas, como: cinomose, parvovirose, toxoplasmose, erliquiose e encefalites bacterianas ou traumatismo craniano, que poderiam interferir na função intracraniana do sistema nervoso central (BAGLEY, 2005).

Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (protocolo CEUA: 2784290317).

#### 5.1.1 Grupos experimentais

As amostras de hipocampo foram distribuídas em dois grupos experimentais:

- **grupo JAd**: composto por amostras de hipocampo de cães, de ambos os sexos, com até 8 anos (jovens e adultos);
- **grupo Id**: composto por amostras de hipocampo de cães, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 10 anos (idosos).

### 5.2 Processamento das amostras

Os hipocampos extraídos foram fixados em solução de formol 10%, por 24 horas, e depois armazenados em solução de sacarose 30%. Em seguida, foram cortados com uso de um criostato semi-automático Leica® (modelo 1850 UV) para obtenção de cortes histológicos com 40 µm de espessura, os quais foram conservados em uma solução anti-congelamento (tampão fosfato de sódio 0,4 M, sacarose 15% e etilenoglicol 30%, diluídos em água destilada) e armazenados à -20°C até a realização das análises histoquímicas.

### 5.3 Região do hipocampo avaliada

Devido à importância da região e também visando a padronização das análises histoquímicas, optou-se pela avaliação do giro denteado (GD) nas amostras de hipocampo dos cães.

### 5.4 Coloração de Nissl para identificação de células nervosas

Após montagem e secagem das lâminas, essas ficaram embebidas em etanol 70%, durante 24 horas. Em seguida, as lâminas foram submetidas às seguintes etapas: 1) desidratação, com imersão consecutiva em etanol 95% e xilol 98,5% e 2) hidratação, com imersão em xilol 98,5%, seguida de concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70% e 50%). Na sequência, as lâminas foram lavadas com água destilada, incubadas em solução de tionina 0,25%, por 25 segundos, e lavadas, novamente, com água destilada. Posteriormente, realizou-se outra etapa de desidratação, com imersão sequencial em: etanol 50%, 70% e 95%; etanol 95% acrescido de ácido acético 1%; etanol 95% e 100%; xilol 98,5%. Por fim, as lâminas foram seladas com o meio sintético DPX (Sigma-Aldrich®) e sobrepostas com lamínulas.

A identificação celular nas camadas granular e polimórfica do GD foi determinada a partir de imagens obtidas pela câmera Nikon Digital Sight®, acoplada ao microscópio óptico Nikon Eclipse E600® (20X), e visualizadas pelo *software* de Imagem *NIS-Elements Advanced Research 2.30* (Nikon Instruments Inc). Para cada análise, foram avaliados 6 cortes representativos do hipocampo.

Na camada granular, devido à sobreposição de neurônios e células da glia, realizou-se uma análise de densidade celular, em 5 campos consecutivos (1,85 x 105 pixels), com auxílio do *software* Image J®. Na camada polimórfica, os neurônios foram contados manualmente, em 2 campos consecutivos (1,02 x 104 pixels), com auxílio do *software* Image J®.

## 5.5 Marcação para MR e GR por imuno-histoquímica

A marcação para MR e GR no GD foi realizada por meio da técnica de imuno-histoquímica e método *free-floating*. Resumidamente, após sucessivas lavagens com uma solução salina de fosfato de potássio tamponada (KPBS 0,02 M), para retirada de solução anti-congelamento, os cortes foram incubados em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%, para inativação da peroxidase endógena. Após mais algumas lavagens, os cortes foram incubados com tampão citrato (10 mM) à 60°C e lavados com KPBS (0,02 M), novamente. Em seguida, realizou-se o bloqueio, com soro de jumento 1% e Triton 0,3% diluídos em KPBS (0,02 M), durante 40 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com o anticorpo primário, diluído no mesmo soro de bloqueio e deixados *overnight*, à 4°C, ao abrigo da luz. Os anticorpos utilizados foram: anti-MR (1:500) produzido em cabra e anti-GR (1:1000) produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology®). Os cortes foram, então, lavados com KPBS (0,02 M) e incubados por 2 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com os respectivos anticorpos secundários (1:1000) IgG anti-cabra e IgG anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology®), diluídos em KPBS e Triton 0,3%. Na sequência, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina (kit Elite; Vector®) para a visualização do complexo antígeno-anticorpo e realizou-se também a revelação do tecido com níquel, cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após montagem e secagem das lâminas (*overnight*), essas foram submetidas a uma bateria de desidratação, com imersão sequencial em: água destilada; etanol 50%, 70%, 95% e 100%; e xilol 98,5%. Por fim, as lâminas foram seladas com o meio sintético DPX e sobrepostas com lamínulas.

A marcação para MR e GR foi determinada a partir de imagens obtidas pela câmera Nikon Digital Sight®, acoplada ao microscópio óptico Nikon Eclipse E600® (20X), e visualizadas pelo *software* de Imagem *NIS-Elements Advanced Research*® (Nikon®). Para cada análise, foram avaliados 6 cortes representativos do hipocampo. As marcações para MR e GR nos neurônios foram determinadas separadamente. Estas marcações foram contadas manualmente, em 2 campos consecutivos (1,02 x 10<sup>4</sup> pixels), com auxílio do *software* Image J®. A partir destes valores calculou-se a relação MR:GR.

Devido à sobreposição de neurônios e células da glia na camada granular, estas análises foram feitas apenas na camada polimórfica do GD.



## 5.6 Marcação de células em degeneração com fluoro-Jade B

Após montagem e secagem das lâminas (48 horas), essas foram imersas, sequencialmente, nas seguintes soluções: etanol 80% acrescido de NaOH 1% (por 5 minutos), álcool 70% (por 2 minutos), água Milli-Q (por 2 minutos), permanganato de potássio 0,06% (por 10 minutos, protegido de luz), água Milli-Q (por 2 minutos), fluoro-jade B (Millipore®) + DAPI (por 20 minutos, protegido da luz) e água Milli-Q (por 1 minuto, 3 vezes). Depois de passar por esta bateria, as lâminas foram secas em estufa e imersas em xilol 98,5%. Por fim, as lâminas foram seladas com o meio sintético DPX e sobrepostas com lamínulas.

A marcação de neurônios fluoro-jade B positivos foi determinada a partir de imagens obtidas pela câmera Nikon Digital DXM 1200C®, acoplada ao microscópio óptico Nikon E1000® (20X), e visualizadas pelo *software* de Imagem Control software ACT1® (Nikon®). Para cada análise, foram avaliados 6 cortes representativos do hipocampo.

Os neurônios fluoro-jade B positivos foram contados manualmente, em 2 campos consecutivos (1,02 x 104 pixels), com auxílio do *software* Image J®. A porcentagem (%) de neurônios fluoro-jade B positivos foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$\% = (\text{contagem de neurônios fluoro-jade B positivos} \times 100) / \text{contagem de neurônios}$

Devido à sobreposição de neurônios e células da glia na camada granular, esta análise foi feita apenas na camada polimórfica do GD.

## 5.7 Forma de análise dos resultados

Os parâmetros quantitativos foram tabulados e apresentados como valores médios, com seus respectivos erros padrão. Os resultados foram submetidos à uma análise de variância pelo teste F. As comparações entre dois grupos (JAd *versus* Id, machos idosos *versus* fêmeas idosas) foram feitas a partir do teste t não pareado, considerando significativo os valores de  $P < 0,05$ . Por meio do coeficiente de correlação de Pearson, testes de correlação foram aplicados entre diferentes parâmetros.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização dos grupos experimentais

Para a realização deste projeto, amostras de hipocampo de dezoito cães foram utilizadas. Estas amostras foram avaliadas em dois grupos distintos:

- **grupo JAd:** composto por 6 amostras de hipocampo de cães jovens ou adultos;
- **grupo Id:** composto por 12 amostras de hipocampo de cães idosos.

As informações como raça, sexo e diagnóstico presuntivo, assim como os valores individuais de idade e peso corporal dos cães, cujas amostras integraram os grupos JAd e Id, são apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Houve uma distribuição equilibrada de amostras provenientes de machos e fêmeas nos dois grupos. O grupo JAd foi formado por amostras de três machos (50%) e três fêmeas (50%). Já o grupo Id apresentou amostras de seis fêmeas (50%) e seis machos (50%). No grupo JAd, as amostras foram retiradas de cães de pequeno (50%) e médio (50%) portes e, no grupo Id, de cães de pequeno (18%), médio (36%) e grande (36%) portes. O porte do cão idoso, identificado pelo número 11, não pode ser determinado. Observou-se um predomínio de amostras de cães de raça nos dois grupos, 67% do JAd e 83% no Id.

As características macroscópicas e os diagnósticos presuntivos (descritos na ficha de necropsia) não indicaram o comprometimento direto do sistema nervoso central dos cães. Não foi possível obter informações clínicas sobre o estado cognitivo destes cães.

Tabela 1 – Dados dos cães jovens e adultos

Cães	Raça	Sexo	Idade	Peso (kg)	Diagnóstico presuntivo
1	Shi-tzu	M	3 meses	2,0	Gastroenterite
2	SRD	M	6 meses	4,9	Megaesôfago
3	Bull Terrier	M	10 meses	17,1	Doença renal congênita
4	SRD	F	3 anos	13,2	Doença cardiorrespiratória
5	Poodle	F	8 anos	1,8	Doença renal crônica
6	Dálmata	F	8 anos	---	Gastroenterite

SRD= sem raça definida. --- = não informado. Fonte: Própria autoria.

Tabela 2 – Dados dos cães idosos

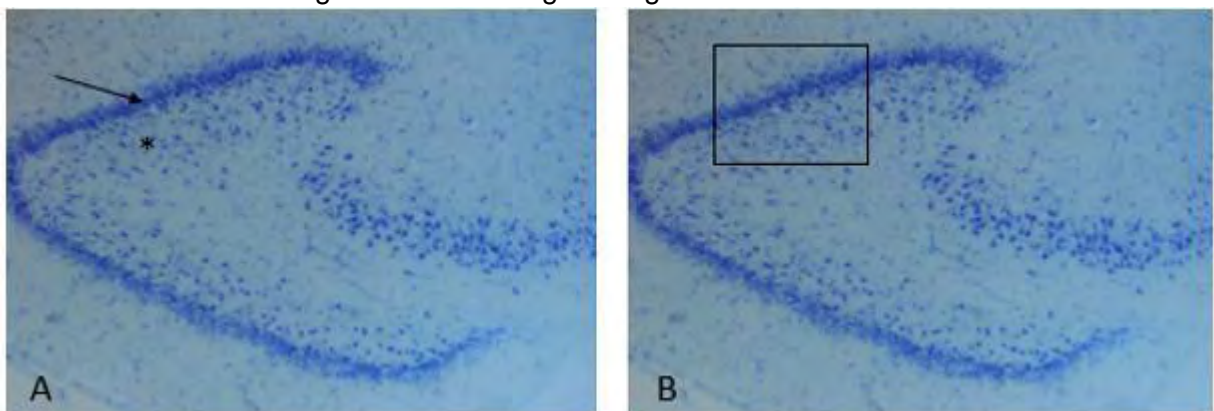
Cães	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Diagnóstico presuntivo
1	Fila	M	10	26,5	Desconhecido/ Neoplasia abdominal?
2	Labrador	M	10	15	Gastroenterite
3	Beagle	M	12	12,7	Doença cardiorrespiratória
4	Pastor alemão	M	13	39,5	Cardiomiopatia
5	Yorkshire	M	14	6,8	Pancreatite
6	Golden Retriever	F	10	27,9	Doença osteoarticular
7	Poodle	F	11	6,2	Doença do trato urinário
8	SRD	F	12	11,2	Obstrução biliar
9	SRD	F	14	9,9	Doença cardiorrespiratória
10	Whippet	F	16	---	Linfoma
11	SRD	F	26	---	Doença renal crônica
12	Poodle	M	20	12,5	Desconhecido/velhice?

SRD= sem raça definida. --- = não informado. Fonte: Própria autoria.

## 6.2 Região avaliada no giro denteado (GD)

O GD do hipocampo de cão é representado na Figura 7, com destaque para as camadas granular e polimórfica (Figura 7A). A região do GD, padronizada para a determinação dos parâmetros em todas as amostras incluídas neste estudo, é indicada na Figura 7B.

Figura 7 – Corte sagital do giro denteado de cão



Amostra de hipocampo de uma cadela, Dálmata, 8 anos. (A) No detalhe, as camadas granular (seta) e polimórfica (\*) do giro denteado. (B) região do giro denteado avaliada em todas as amostras. Coloração de Nissl. 4X, 100µm. Fonte: Própria autoria.

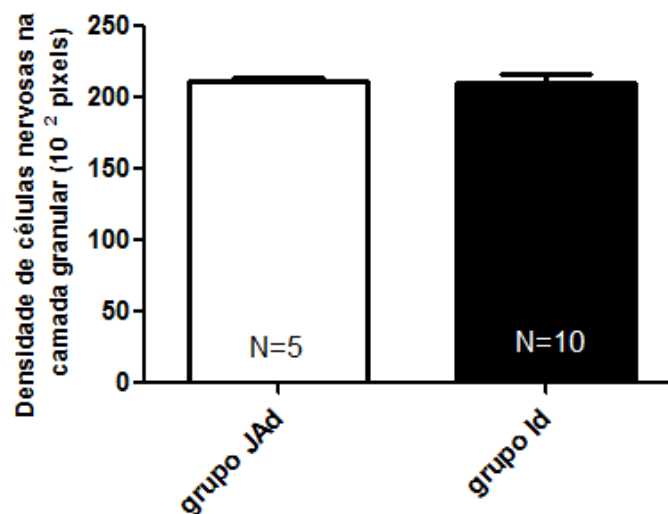
### 6.3 Identificação de células nervosas pela coloração de Nissl

#### 6.3.1 Densidade de células nervosas na camada granular do GD

Não houve diferença entre os grupos, em relação à densidade celular da camada granular do GD (Figura 8 e Tabela 3).

Não foi possível determinar a densidade celular em algumas amostras, sendo assim, o N do grupo JAd passou de 6 para 5 e do grupo Id de 12 para 10.

Figura 8 – Densidade de células nervosas na camada granular do giro denteado

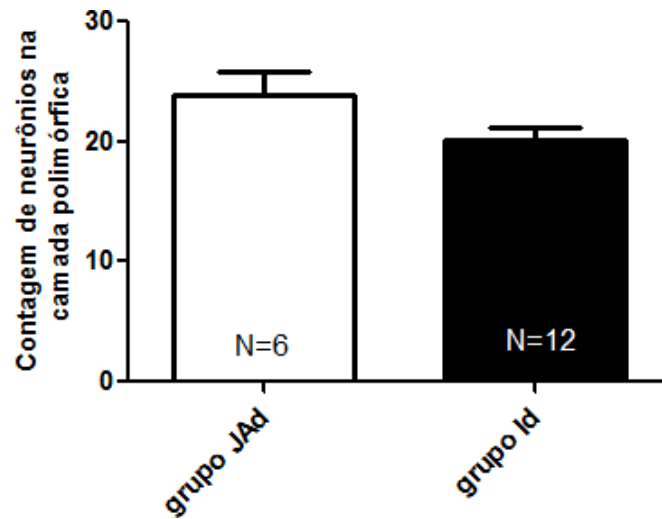


Valores médios  $\pm$  erro padrão. N = número de amostras por grupo. JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. Não houve diferença entre os grupos ( $P = 0,865$ ). Fonte: Própria autoria.

#### 6.3.2 Contagem de neurônios na camada polimórfica do GD

A contagem de neurônios na camada polimórfica também não diferiu entre os grupos. Apesar de não haver diferença estatística ( $p = 0,088$ ), observou-se uma tendência à redução celular no grupo Id (Figura 9 e Tabela 3).

Figura 9 – Contagem de neurônios na camada polimórfica do giro denteado



Valores médios  $\pm$  erro padrão. N = número de amostras por grupo. JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. Não houve diferença entre os grupos ( $P = 0,088$ ). Fonte: Própria autoria.

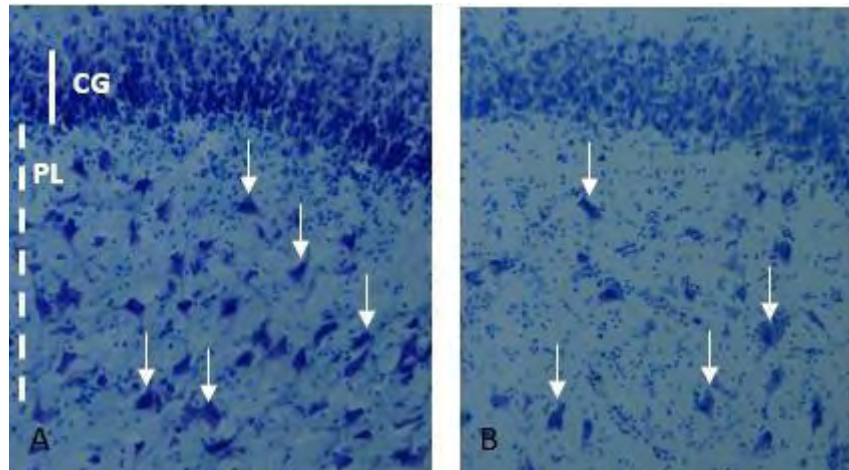
Tabela 3 – Identificação das células no giro denteado. Densidade e contagem celular nos grupos JAd e Id

Parâmetros	Grupo JAd	Grupo Id	Valor P
<b>Camada granular</b>			
Densidade de células Nervosas	211,6 $\pm$ 2,38 A (N = 5)	209,9 $\pm$ 6,61 A (N = 10)	0,865
<b>Camada polimórfica</b>			
Contagem de Neurônios	23,9 $\pm$ 1,93 A (N = 6)	20,13 $\pm$ 1,12 A (N = 12)	0,088

JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos.  $\pm$  = erro padrão. N = número de amostras por grupo. Letras iguais na mesma linha não expressam diferença entre os valores médios. Fonte: Própria autoria.

Imagens representativas da identificação celular nas camadas granular e polimórfica de um cão jovem (shi-tzu, 3 meses) e um cão idoso (Whippet, 16 anos) são apresentadas na Figura 10. Nota-se que os neurônios são mais escassos na camada polimórfica do cão idoso

Figura 10 – Identificação de células nervosas no giro denteado de cães



Imagens das camadas granular e polimórfica do giro denteado de cães. (A) Shi-tzu, 3 meses, macho. (B) Whippet, 16 anos, fêmea. Na camada polimórfica é possível individualizar os neurônios (setas). CG= camada granular. PL= camada polimórfica. Coloração de Nissl. 20X, 100 $\mu$ m. Fonte: Própria autoria.

Por conta da sobreposição celular da camada granular, as análises das marcações de GR, MR e fluoro-jade B foram realizadas, apenas na camada polimórfica.

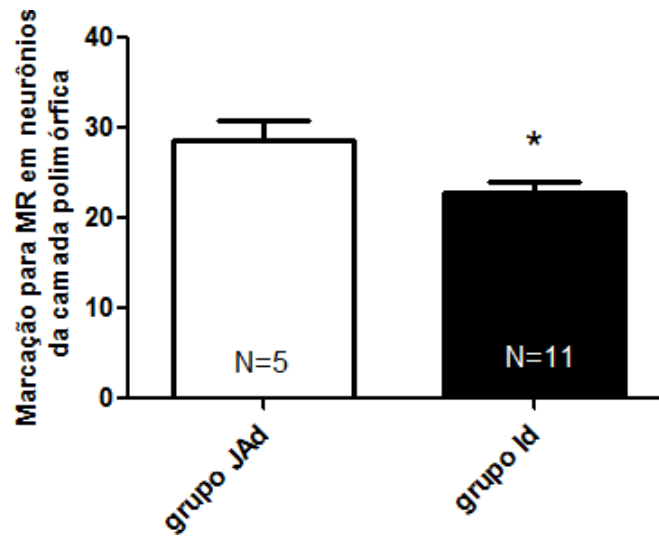
#### 6.4 Marcação para MR e GR em neurônios da camada polimórfica do GD por imunohistoquímica

O grupo Id apresentou menor marcação para MR, em relação ao grupo JAd ( $p = 0,043$ ) (Figura 11); entretanto, não houve diferença na marcação para GR entre os dois grupos ( $p = 0,559$ ) (Figura 12). Estes resultados levaram a um menor valor da relação MR:GR no grupo Id ( $p = 0,034$ ) (Figura 13).

Os valores médios da marcação para MR e GR, assim como da relação MR:GR são apresentados na Tabela 4.

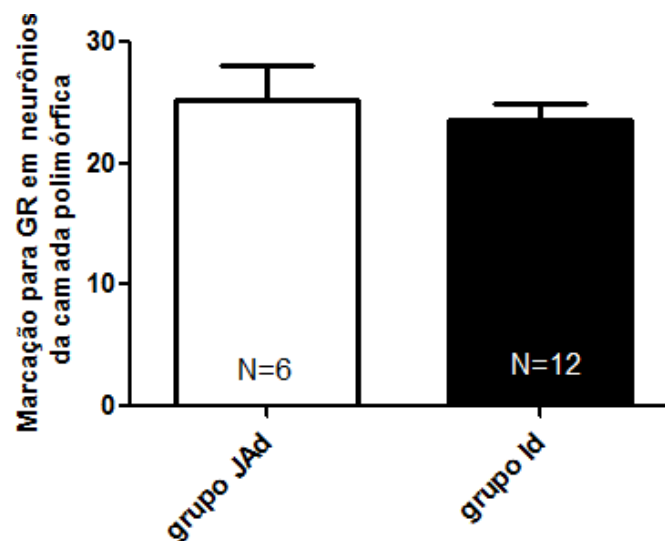
Não foi possível determinar a marcação para MR em algumas amostras, sendo assim, o N do grupo JAd passou de 6 para 5 e do grupo Id de 12 para 11.

Figura 11 – Marcação para MR em neurônios da camada polimórfica do giro denteado



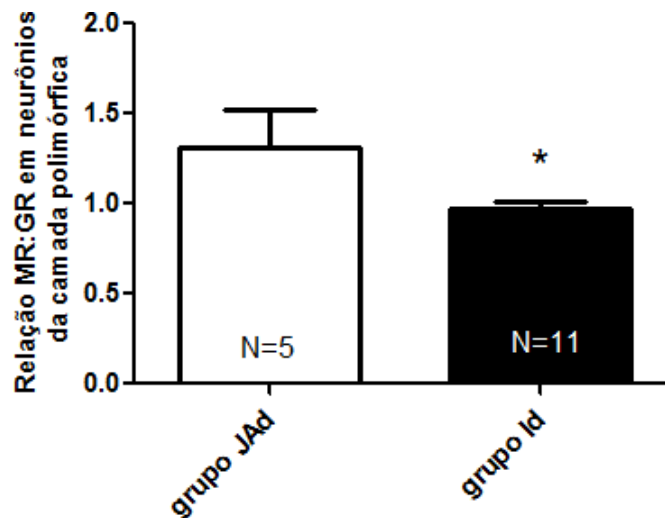
Valores médios  $\pm$  erro padrão. N = número de amostras por grupo. JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. A marcação para o receptor para mineralocorticoides (MR) foi menor no grupo Id (\*P = 0,043). Fonte: Própria autoria.

Figura 12 – Marcação para GR em neurônios da camada polimórfica do giro denteado



Valores médios  $\pm$  erro padrão. GR = receptor para glicocorticoides. N = número de amostras por grupo. JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. Não houve diferença entre os grupos (P = 0,559). Fonte: Própria autoria.

Figura 13 – Relação MR:GR em neurônios da camada polimórfica do giro denteado



Valores médios  $\pm$  erro padrão. N = número de amostras por grupo. JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. A relação entre os receptores para mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR) foi menor no grupo Id (\*P = 0,034). Fonte: Própria autoria.

Tabela 4 – Marcação para os receptores MR e GR e relação MR:GR nos grupos JAd e Id

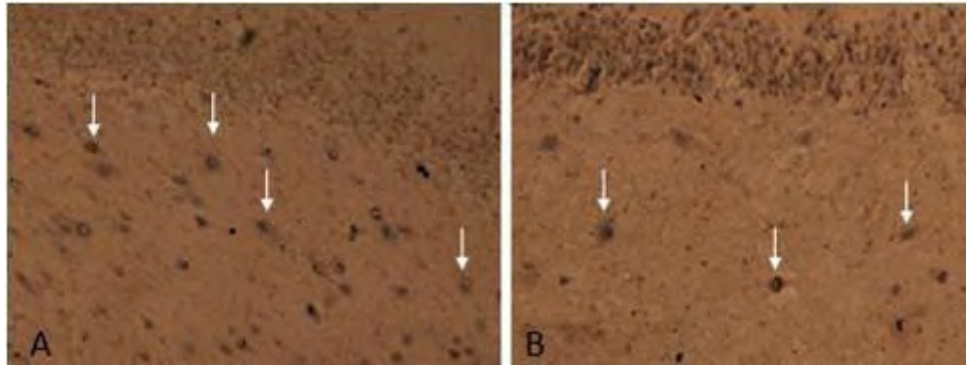
Parâmetros	Grupo JAd	Grupo Id	Valor P
<b>Camada polimórfica</b>			
Marcação para MR	28,63 $\pm$ 2,12 A (N = 5)	23,25 $\pm$ 1,32 B (N = 11)	0,043
Marcação para GR	25,22 $\pm$ 2,86 A (N = 6)	23,58 $\pm$ 1,34 A (N = 12)	0,560
Relação MR:GR	1,31 $\pm$ 0,20 A (N = 5)	0,97 $\pm$ 0,04 B (N = 11)	0,034

JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. MR = receptor para mineralocorticoides. GR = receptor para glicocorticoides.  $\pm$  = erro padrão. N = número de amostras por grupo. Letras diferentes na mesma linha expressam diferença entre os valores médios. Fonte: Própria autoria.

Imagens representativas da marcação para MR e GR em cães jovens e idosos são apresentadas nas Figuras 14 e 15, respectivamente. Na Figura 14, nota-se se que a marcação para o MR é mais escassa no cão idoso (Beagle, 12 anos), em comparação a um cão adulto (Poodle, 8 anos). Já na Figura 15, é possível perceber que a marcação para o GR é abundante no cão jovem (Shi-tzu, 3 meses) e também no idoso (Golden, 10 anos).

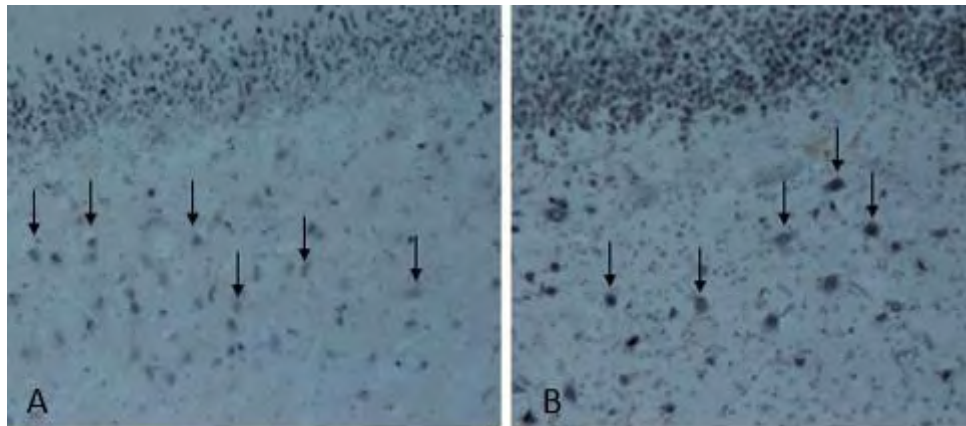


Figura 14 – Marcação para MR no giro denteado



Imunohistoquímica para MR no giro denteado de cães. (A) Poodle, 8 anos, fêmea. (B) Beagle, 12 anos, macho. No detalhe, marcação para MR na camada polimórfica (setas). MR = receptor para mineralocorticoide. 20X, 100µm. Fonte: Própria autoria.

Figura 15 – Marcação para GR no giro denteado



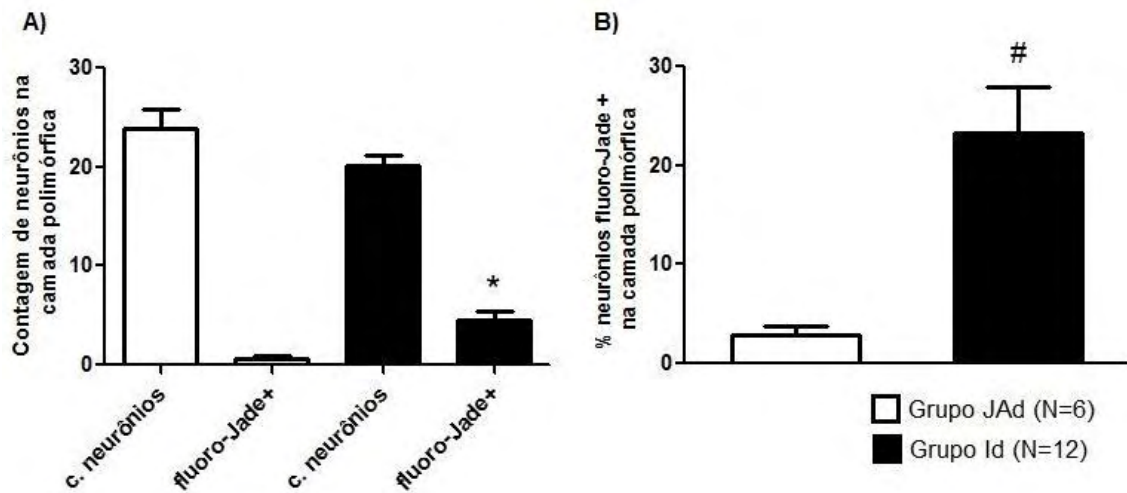
Imunohistoquímica para GR no giro denteado de cães. (A) Shi-tzu, 3 meses, macho. (B) Golden, 10 anos, fêmea. No detalhe, marcação para GR camada polimórfica (setas). GR = receptor para glicocorticoides. 20X, 100µm. Fonte: Própria autoria.

### 6.5 Identificação de neurônios em degeneração na camada polimórfica do GD pela coloração fluoro-Jade B

A contagem de neurônios fluoro-Jade B positivos foi maior nos cães idosos ( $p = 0,009$ ) (Figura 16A e Tabela 5); portanto, este grupo apresentou maior contagem de neurônios em degeneração na camada polimórfica.

Considerando a contagem total de neurônios na camada polimórfica, o grupo Id apresentou uma maior porcentagem de neurônios em degeneração, quando comparado com o grupo JAd (Figura 16B e Tabela 5).

Figura 16 – Contagem de neurônios fluoro-Jade B positivos na camada polimórfica do giro denteado



Valores médios  $\pm$  erro padrão. **(A)** Contagem (c.) de neurônios totais (coloração de Nissl) e fluoro-Jade + na camada polimórfica. **(B)** Porcentagem (%) de neurônios fluoro-Jade +, em relação ao total de neurônios na camada polimórfica. JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. N = número de amostras por grupo. A contagem e a % de neurônios fluoro-Jade + foram maiores no grupo Id. \*P = 0,009 *versus* grupo JAd. #P = 0,008 *versus* grupo JAd. Fonte: Própria autoria.

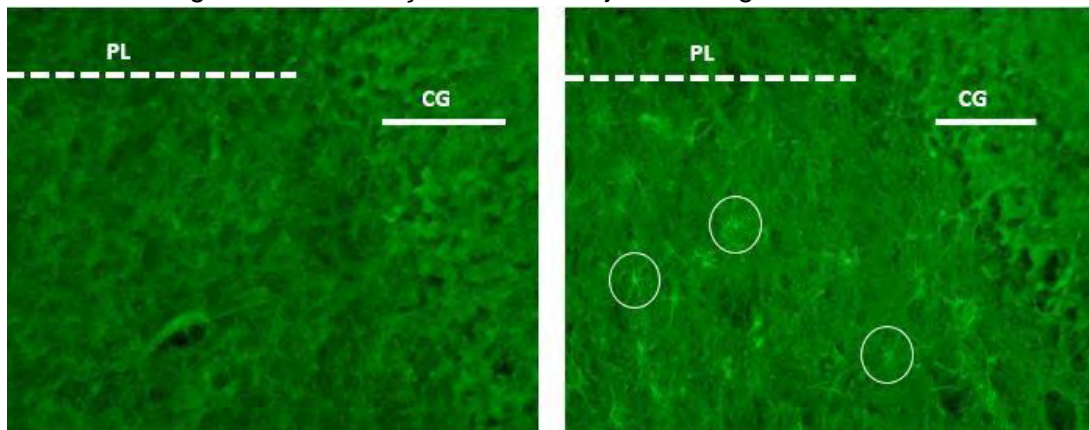
Tabela 5 – Marcação com fluoro-jade B para neurônios em degeneração nos grupos JAd e Id

Parâmetros	Grupo JAd	Grupo Id	Valor P
<b>Camada polimórfica</b>			
Contagem de neurônios fluoro-Jade B Positivos	0,69 $\pm$ 0,18 A (N = 6)	4,50 $\pm$ 0,89 B (N = 12)	0,009
% neurônios fluoro-Jade B positivos, em relação ao total de neurônios	2,95 $\pm$ 0,76 A (N = 6)	23,35 $\pm$ 4,64 B (N = 12)	0,008

JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. N = número de amostras por grupo. % = porcentagem. Letras diferentes na mesma linha expressam diferença entre os valores médios. Fonte: Própria autoria.

Imagens representativas da marcação de neurônios fluoro-jade B positivos, em um cão jovem e um idoso, são apresentadas na Figura 17, na qual podem ser observados vários neurônios em degeneração no cão idoso (Beagle, 12 anos), mas nenhum no cão jovem (SRD, 6 meses).

Figura 17 – Marcação com fluoro-jade B no giro denteado



Marcação com fluoro-jade B para neurônios em degeneração no giro denteado de cães. (A) SRD, 6 meses, macho. (B) Beagle, 12 anos, macho. No detalhe, neurônios fluoro-jade B positivos (círculos) na camada polimórfica. CG= camada granular. PL= camada polimórfica. SRD= sem raça definida. 20x, 100 $\mu$ m. Fonte: Própria autoria.

## 6.6 Correlações

Os valores das correlações avaliadas são apresentados na Tabela 6. Os maiores coeficientes foram observados entre parâmetros dependentes.

Notou-se uma correlação negativa entre a idade dos cães e a densidade de células nervosas na camada granular (-0,45) e uma correlação positiva entre o peso dos cães e a contagem de neurônios fluoro-jade B positivos na camada polimórfica (+0,43). A idade e o peso dos cães parecem não interferir com a quantidade de neurônios e a marcação para os receptores MR e GR na camada polimórfica, uma vez que as correlações foram muito baixas.

A contagem de neurônios na camada polimórfica apresentou correlação positiva com a marcação para MR e GR (+0,63 e +0,52, respectivamente).

A correlação negativa entre a marcação para MR e a porcentagem de neurônios fluoro-jade B positivos (-0,42), assim como, entre a relação MR:GR e os neurônios fluoro-jade B positivos (contagem e %) (-0,39 e -0,37, respectivamente) sugerem que a diminuição do MR pode estar relacionada com a perda da integridade dos neurônios na camada polimórfica.

Tabela 6 – Correlação linear (coeficiente de Pearson) entre os parâmetros avaliados

	Idade (anos)	Peso (Kg)	Neurônios PL			Receptores PL		
			Nº.	fluoro-jade +	% fluoro-jade +	MR	GR	MR:GR
<b>Idade (anos)</b>	1							
<b>Peso (Kg)</b>	+0,24	1						
<b>Densidade celular G</b>	<b>-0,45</b>	0,01						
<b>Neurônios PL</b>								
Nº.	-0,29	-0,09	1					
fluoro-jade+	+0,27	<b>+0,43</b>	-0,20	1				
% fluoro-jade +	+0,27	+0,35	-0,44	+0,94*	1			
<b>Receptores PL</b>								
MR	-0,18	+0,11	<b>+0,63</b>	-0,27	<b>-0,42</b>	1		
GR	-0,16	0,00	<b>+0,52</b>	0,00	-0,14	+0,26	1	
MR:GR	-0,25	-0,25	+0,34	<b>-0,39</b>	<b>-0,37</b>	+0,64*	-0,55*	1

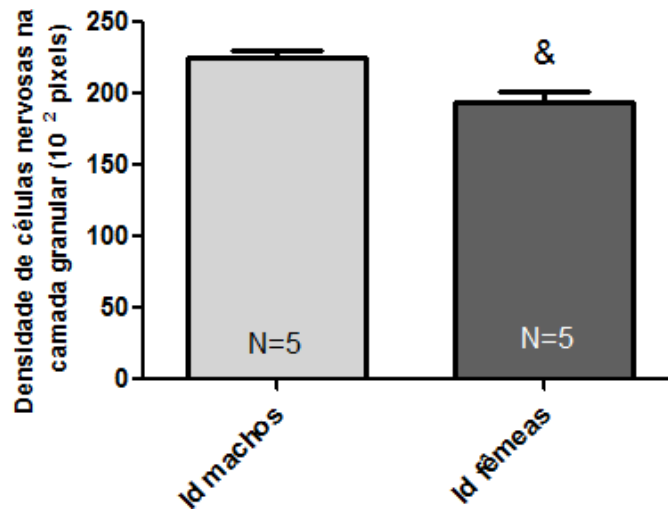
Nº. = número/contagem. PL = camada polimórfica do giro denteado. G = camada granular do giro denteado. fluoro-jade+ = contagem de neurônios fluoro-jade B positivos. % = porcentagem. MR = receptor para mineralocorticoides. GR = receptor para glicocorticoides. MR:GR = relação entre os receptores MR e GR. \* parâmetros dependentes. Fonte: Própria autoria.

### 6.7 Comparação dos parâmetros avaliados no grupo Id, de acordo com o sexo

Os machos e fêmeas idosos não diferiram em relação aos valores médios para idade [ $13,17 \pm 1,51$  anos (N = 6) *versus*  $14,83 \pm 2,40$  anos (N = 6)] ( $p = 0,570$ ) e peso [ $18,83 \pm 4,91$  Kg (N = 6) *versus*  $13,80 \pm 4,82$  Kg (N = 4)] ( $p = 0,506$ ).

Na camada granular, a densidade celular foi menor nas fêmeas idosas, em comparação aos machos idosos ( $p = 0,008$ ) (Figura 18). Entretanto, não foram encontradas diferenças entre machos e fêmeas em nenhum dos parâmetros avaliados na camada polimórfica (Tabela 7).

Figura 18 – Densidade de células nervosas na camada granular de machos e fêmeas idosos



Valores médios  $\pm$  erro padrão. JAd = amostras de cães jovens e adultos. Id = amostras de cães idosos. N = número de amostras por grupo. A densidade celular na camada granular foi menor nas fêmeas idosos (& P = 0,008). Fonte: Própria autoria.

Tabela 7 – Comparação entre machos e fêmeas idosos para os parâmetros avaliados

Parâmetros	Id machos	Id fêmeas	Valor de P
<b>Camada granular</b>			
Densidade de células nervosas	225,40 $\pm$ 5,10 A (N= 5)	194,40 $\pm$ 7,10 B (N= 5)	0,008
<b>Camada polimórfica</b>			
Contagem de neurônios	20,50 $\pm$ 2,08 A (N = 6)	19,76 $\pm$ 1,06 A (N = 6)	0,757
Marcação para MR	22,44 $\pm$ 1,93 A (N= 6)	24,21 $\pm$ 1,90 A (N= 5)	0,534
Marcação para GR	23,60 $\pm$ 2,12 A (N= 6)	23,56 $\pm$ 1,87 A (N= 6)	0,989
Relação MR:GR	0,96 $\pm$ 0,11 A (N= 6)	0,98 $\pm$ 0,15 A (N= 5)	0,730
Contagem de neurônios fluoro-Jade B positivos	5,08 $\pm$ 1,18 A (N= 6)	4,00 $\pm$ 1,42 A (N= 6)	0,594
Porcentagem de neurônios fluoro-Jade B positivos	26,74 $\pm$ 6,99 A (N= 6)	19,95 $\pm$ 6,44 A (N= 6)	0,491

$\pm$  = erro padrão. N = número de amostras por grupo. Letras diferentes na mesma linha expressam diferença entre os valores médios. Fonte: Própria autoria.

## 7 DISCUSSÃO

Com o envelhecimento, algumas regiões do SNC canino sofrem alterações estruturais. No hipocampo de cães idosos, Tapp et al. (2004) e Pugliese et al. (2010) descreveram a redução do volume (atrofia); Siwak-Tapp et al. (2008) relataram a redução do número de neurônios no hilo (que inclui a camada polimórfica do GD) e Siwak-Tapp et al. (2007) observaram a redução da neurogênese.

Com o avançar da idade, todas as regiões do hipocampo podem ser afetadas; entretanto, estas áreas diferem profundamente em termos de arquitetura molecular e vias celulares (DATSON et al., 2012). O GD recebe múltiplos estímulos sensoriais (vestibulares, olfativas, visuais, auditivas e somáticas) do córtex entorrinal; portanto, lesões ou processos degenerativos que venham a acometer o GD podem comprometer o processamento de informações espaciais (localização) e não espaciais (objetos, odores, etc.) (KESNER, 2017).

De acordo com Chapagain et al. (2017), cães com envelhecimento cognitivo podem apresentar diminuição na capacidade de encontrar a comida caída, locomoção errática, declínio na aprendizagem espacial e memória. Estes sinais podem sugerir o comprometimento do GD. Portanto, devido à importância desta área, o GD foi escolhido como alvo deste estudo. Além disso, outros autores já relataram alterações importantes relacionadas ao envelhecimento cerebral canino nesta região, como a deposição de peptídeos beta amiloide (COLLE et al., 2000; SCHMIDT et al., 2015), a redução de precursores neuronais (HWANG et al., 2007), da contagem de neurônios e neurogênese (SIWAK-TAPP et al., 2007; SIWAK-TAPP et al., 2008).

Para esta pesquisa, as análises foram feitas em hipocampos de cães machos e fêmeas, principalmente com raça definida e de diferentes portes. Os resultados de Rofina et al. (2006) e Yu et al. (2011) sugerem que a raça ou o porte canino não interferem nas alterações encontradas no envelhecimento. Porém, algumas diferenças podem ser observadas, comparando-se o hipocampo de machos e fêmeas (TAPP et al., 2006) e estas serão discutidas mais adiante.

Os grupos experimentais JAd e Id foram compostos por amostras de animais com até 8 anos e com 10 anos ou mais, respectivamente. Essa faixa etária foi escolhida, uma vez que dados da literatura sugerem que (em média) os cães são considerados idosos com mais de 8 anos de idade (ROFINA et al., 2006; SCHUTT et al., 2015; TAPP et al., 2004) e algumas alterações relacionadas ao envelhecimento

no hipocampo não surgem em cães com menos de 10 anos (SCHMIDT et al., 2015; YU et al., 2011; TAPP et al., 2004).

A densidade de células nervosas na camada granular do GD não diferiu entre os grupos; contudo, no grupo Id, observou-se uma tendência para a redução na contagem de neurônios na camada polimórfica. Esta tendência estaria de acordo com a literatura, uma vez que neurônios da região hilar (que inclui a camada polimórfica) sofrem uma redução pronunciada com o avançar da idade (CADIACIO, 2003; MCAVOY; SAHAY, 2017). O estudo de Siwak-Tapp et al. (2008) demonstrou que na espécie canina esta redução pode ser de até 30%. No presente estudo correspondeu a 16%.

A grande quantidade de células nervosas (gliais e neurônios) na camada granular, assim como a sobreposição das mesmas, impossibilitou a individualização das marcações histoquímicas (imuno-histoquímica e fluoro-jade B), comprometendo a avaliação dos receptores (MR e GR) e dos neurônios em degeneração. Na camada polimórfica, a quantidade de células é menor e é possível individualizar os neurônios; portanto, foram apresentados os resultados das análises histoquímicas realizadas nesta camada.

Uma correlação negativa (-0,45) foi verificada entre a idade dos cães e a densidade de células na camada granular; indicando que, quanto maior a idade, menor a densidade celular nesta camada do GD. Considerando que essa camada recebe células formadas pela neurogênese (SARAVIA et al., 2007) e que este processo está reduzido em cães idosos (HWANG et al., 2007; PEKCEC et al., 2008; YOUSSEF et al., 2016), uma menor densidade celular na camada granular poderia ser esperada com o avanço da idade.

Ao contrário de Rofina et al. (2006) e Yu et al. (2011), Schmidt et al. (2015) demonstraram que os cães idosos de pequeno e médio portes apresentaram uma maior deposição da proteína beta amiloide em diferentes regiões cerebrais (incluindo o hipocampo), em comparação aos cães de grande porte. Em adição, o estudo de Pugliese et al. (2010) evidenciou atrofia hipocampal mais pronunciada em cães com menos de 10 kg, quando comparada com cães de 10 a 25 kg. O N amostral deste projeto não permitiu a comparação dos resultados, de acordo com o porte dos cães. Porém, evidenciou-se uma correlação positiva (+0,43) entre o peso dos cães e a contagem de neurônios em degeneração (fluoro-jade B positivos) na camada polimórfica do GD, indicando que os cães maiores apresentam maior degeneração

neuronal. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que cães de grande porte apresentam menor sobrevida e envelhecem mais cedo do que os de pequeno ou médio porte (SCHMIDT et al., 2015), ou pela maior frequência de amostras dos cães maiores no grupo Id.

O grupo Id apresentou menor marcação para MR, em relação ao grupo JAd. A marcação para GR não se apresentou alterada no grupo Id. Resultados semelhantes foram descritos por Reul, Rothuizen e Kloet (1991). Choi et al. (2008) evidenciaram a diminuição da marcação (imunorreatividade) para ambos os receptores (MR e GR) no GD de cães idosos (entre 10 e 12 anos). Contudo, a quantificação proteica (por *Western blot*) confirmou apenas a redução do MR. Estes autores também observaram o aumento da concentração sérica de cortisol nos cães idosos e concluíram que, aliado a isto, a redução da marcação e da proteína MR pode estar associada a disfunção neural no hipocampo.

No estudo de Murphy et al. (2002) foi demonstrado que no hipocampo de ratos idosos não há alteração na expressão proteica de GR, porém há uma menor sinalização nuclear deste receptor. Uma menor atividade de GR no SNC de idosos resultaria na redução do *feedback* negativo para o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (JOELS et al., 2004), na maior ativação do eixo HHS e no aumento das concentrações circulantes de cortisol (MICHAILIDOU et al., 2008). Nesse projeto, não foi avaliada a atividade nuclear do GR e, tão pouco, a concentração do cortisol; portanto, só se pode afirmar que, em cães idosos, a expressão do GR não diferiu dos cães jovens/adultos e que a ativação desse receptor poderia mediar tanto efeitos benéficos (CONBOY; SANDY, 2010) como deletérios (CROCHEMORE et al., 2005). Porém, O GR por si só não parece ter o papel principal nas alterações estruturais e celulares do GD, uma vez que, a contagem de neurônios na camada polimórfica apresentou correlação positiva tanto com a marcação para MR (+0,63) quanto para GR (+0,52).

Assim como no presente estudo, Choi et al. (2008) observaram um desbalanço na relação MR:GR em cães idosos, devido à diminuição na expressão do MR. Porém, no estudo deste autor, não foi demonstrada a influência e/ou correlação desse desbalanço com a degeneração neuronal presente no envelhecimento cerebral canino e tampouco foram utilizadas amostras de hipocampo provenientes de cães de diversas raças, da rotina clínica. Assim, este estudo é de alta relevância para o entendimento da interferência dos glicocorticoides sobre as alterações no GD de cães idosos, causadas pelo avançar da idade.



O grupo Id apresentou um maior número de neurônios em degeneração (marcação fluoro-jade B positiva) na camada polimórfica, aliado à tendência para redução do número de neurônios e diminuição da marcação/expressão para MR nesta região. A perda neuronal é uma possível causa para a atrofia do hipocampo e outras regiões do SNC em idosos (HEAD, 2011; HWANG et al., 2008, SIWAK-TAPP, 2008; YOUSSEF et al., 2016; YU et al., 2011).

Publicações anteriores discutem que a ativação do MR propicia um efeito neuroprotetor importante (CROCHEMORE et al., 2005; ALMEIDA et al., 2000; GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014). Desta maneira, a tendência para diminuição dos neurônios e o maior número de neurônios em degeneração, observados no grupo Id, poderia ter uma relação com a menor expressão do MR. Os efeitos neuroprotetores do MR ocorrem, particularmente, em células do GD. Em ratos, a superexpressão do MR parece proteger o GD dos efeitos ocasionados pelo excesso de GCs (FERGUSON; SAPOLSKY, 2007; FERGUSON, SAPOLSKY, 2008). Em adição, Woolley et al. (1991) demonstrou que ratos adrenalectomizados apresentaram apoptose nas células do GD, o que foi completamente revertido pela aldosterona (um agonista do MR).

Os estudos de Reul, Rothuizen e Kloet (1991) e Choi et al. (2008) demonstraram que a redução de MR no hipocampo de idosos ocorre, concomitantemente, com o aumento das concentrações de cortisol. Tal fato deve-se ao envolvimento do MR em um controle tônico inibitório do eixo HHS, que reduz o cortisol circulante (HERMAN et al., 2003; LUCASSEN et al., 2006; REUL; ROTHUIZEN; DE KLOET, 1991). Em humanos, a administração da espironolactona (um antagonista competitivo do MR) induziu o aumento do cortisol plasmático (CORNELISSE; JOELS; SMEETS, 2011). O papel do MR na inibição do eixo HHS e controle do cortisol também foi evidenciado em ratos transgênicos com MR deletado, que apresentaram resposta exagerada ao estresse (BRINKS et al., 2009).

É importante ressaltar que algumas funções do MR estão relacionadas com a sua interação com GR. Tal fato pode ser demonstrado tanto para funções cognitivas como para o controle do eixo HHS (HARRIS et al., 2013). Isso pode ocorrer devido ao fato de que alguns efeitos celulares, como por exemplo a própria transcrição do MR, podem ser uma consequência da formação de heterodímeros MR-GR (ZENNARO; LE MENUET; LOMBES, 1996).

A relação MR:GR foi menor no grupo Id, em comparação ao grupo JAd, e apresentou correlações negativas com a contagem (-0,39) e a porcentagem (-0,37) de neurônios em degeneração na camada polimórfica do GD. Em neurônios derivados de células tronco embrionárias, o aumento da relação MR:GR foi relacionada com a proteção contra apoptose induzida pelos GCs (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014). Assim, pode-se perceber a importância da relação MR:GR para a sobrevivência e função dos neurônios do GD. Além disso, a relação equilibrada entre MR e GR é crucial para a adaptação normal do indivíduo ao ambiente. Estudos demonstraram que a menor relação MR:GR pode ser responsável pelo declínio cognitivo em humanos (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014).

O SNC de idosos é muito vulnerável (DROR; STERN; GOMORI, 2014) e pode sofrer processos de neurodegeneração por diversos fatores, como por exemplo, o estresse oxidativo (DAVIS; HEAD, 2014). A maior vulnerabilidade desse tecido a esse e outros insultos pode ser causada pelos efeitos crônicos dos GCs (SAPOLSKY, 2000), os quais se apresentam em concentrações elevadas em idosos (MIZOGUCHI et al., 2009; CHOI et al., 2008), mimetizando a uma condição de estresse crônico.

O GD é uma região sensível aos efeitos do estresse crônico (HEINE et al., 2004; JOELS et al., 2004), com consequente redução de seu volume (PHAM et al., 2003). A vulnerabilidade dos neurônios nessa região parece ser devido à diferentes perfis transcricionais gerados pelo estresse (DATSON et al., 2013), como por exemplo, as alterações na sinalização de cálcio (DATSON et al., 2012) e o aumento dos fatores pró-apoptóticos (ALMEIDA et al., 2000).

Em relação ao sexo, verificou-se uma menor densidade celular na camada granular do GD das fêmeas do grupo Id, sugerindo perda neuronal ou de células gliais, em comparação aos machos idosos. Este resultado pode ter relação com uma possível diminuição na responsividade ao estrógeno (FOSTER et al., 2005). Nesta pesquisa não foram determinados os níveis hormonais e a informação sobre o estado reprodutivo dos cães (castrado ou inteiro) também não constava da ficha de necropsia. Sabe-se que o estrógeno propicia neuroproteção (SARAVIA et al., 2007), ao favorecer a proliferação no processo de neurogênese, prevenir da excitotoxicidade e inflamação, inibir a apoptose, estimular genes antiapoptóticos (como o Bcl2) (SARAVIA et al., 2007) e pelos seus efeitos antioxidantes. Em cães já foi demonstrada uma maior vulnerabilidade das fêmeas idosas ao processo de envelhecimento, uma vez que estas apresentaram maior atrofia do hipocampo, em comparação aos machos (TAPP et al., 2006).

Apesar de ter ocorrido diferença na densidade celular da camada granular, a degeneração neuronal na camada polimórfica foi a mesma em fêmeas e machos, indicando que a responsividade ao estrógeno poderia ter prejudicado os processos de neurogênese e inserção celular na camada granular, mas não a degeneração neuronal na camada polimórfica do GD das fêmeas idosas.

Este trabalho discute a importância do MR e da relação MR:GR na sobrevivência neuronal do hipocampo de caninos. A maior taxa de neurônios em degeneração encontrada em idosos poderia contribuir, em parte, para a perda das funções cognitivas associadas ao envelhecimento. Uma elevada relação MR:GR poderia prevenir tais alterações e, portanto, futuros tratamentos relacionados com a ativação desses receptores (predominante sobre o MR) poderiam ser desenvolvidos para reduzir os efeitos do cortisol e envelhecimento sobre o SNC. Considerando as similaridades neuropatológicas, a espécie canina parece ser um bom modelo animal para o estudo de doenças neurodegenerativas e, assim, esse estudo apresenta grande relevância para o entendimento das alterações encontradas no SNC de caninos e humanos idosos e para futuros estudos clínicos de prevenção à neurodegeneração.

## 8 CONCLUSÃO

O envelhecimento promove alterações celulares na camada polimórfica do giro denteado de cães, representadas pela redução (em 16%) na contagem de neurônios e pelo maior número de neurônios em degeneração. Em conjunto com estas alterações celulares, a menor marcação/expressão do MR e a menor relação MR:GR foram correlacionadas com a degeneração neuronal em cães idosos; possivelmente, devido à diminuição da ativação do MR. O envelhecimento pode comprometer mais o GD das fêmeas, uma vez que a densidade celular na camada granular foi menor nas cadelas idosas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, O. F. X. et al. Subtle shifts in the ratio between pro-and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 5, p. 779-790, 2000.
- AMARAL, D. G.; SCHARFMAN, H. E.; LAVENEX, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Progress in brain research**, v. 163, p. 3-790, 2007.
- ANDRADE-NETO, J. P. Doenças Degenerativas. In: Jericó M. M et al. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2074- 2077, 2015.
- BAGLEY R.S. Formulation of the Differential Diagnosis of Animals with Neurologic Disease. In:\_. **Fundamentals of Veterinary Clinical Neurology**. Ames: Blackwell Publishing, 201-201, 2005.
- BARRETO-CHAVES, M. L. M. et al. Rim e Hormônios. In: Mello-Aires, M. **Fisiologia**, 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 792-796, 2012.
- BELLAVANCE, M. A.; RIVEST, S. The HPA-immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.
- BHARGAVA, A. et al. Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 3129-3138, 2000.
- BRINKS, V. et al. Differential MR/GR Activation in Mice Results in Emotional States Beneficial or Impairing for Cognition. **Neural Plasticity**, p. 1-11, 2007.
- BRINKS, V. et al. Mineralocorticoid receptors in control of emotional arousal and fear memory. **Hormones and behavior**, v. 56, n. 2, p. 232-238, 2009.
- CADIACIO, C. L. et al. Hilar neuropeptide Y interneuron loss in the aged rat hippocampal formation. **Experimental neurology**, v. 183, n. 1, p. 147-158, 2003.
- CHAPAGAIN, D. et al. Cognitive Aging in Dogs. **Gerontology**, 2017.
- CHOI, J. H. et al. Immunoreactivities and levels of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hippocampal CA1 region and dentate gyrus of adult and aged dogs. **Neurochemical research**, v. 33, n. 3, p. 562-568, 2008.

COLLE, M. A. et al. Vascular and parenchymal A $\beta$  deposition in the aging dog: correlation with behavior. **Neurobiology of aging**, v. 21, n. 5, p. 695-704, 2000.

CONBOY, L.; SANDI, C. Stress at learning facilitates memory formation by regulating AMPA receptor trafficking through a glucocorticoid action. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 674-685, 2010.

CORNELISSE, S.; JOELS, M.; SMEETS, Tom. A randomized trial on mineralocorticoid receptor blockade in men: effects on stress responses, selective attention, and memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 13, p. 2720-2728, 2011.

COTMAN, C. W. et al. Brain aging in the canine: a diet enriched in antioxidants reduces cognitive dysfunction. **Neurobiology of aging**, v. 23, n. 5, p. 809-818, 2002.

CROCHEMORE, C. et al. Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 8, p. 790-798, 2005.

DATSON, N. A. et al. Central corticosteroid actions: Search for gene targets. **European journal of pharmacology**, v. 583, n. 2, p. 272-289, 2008.

DATSON, N. A. et al. The transcriptional response to chronic stress and glucocorticoid receptor blockade in the hippocampal dentate gyrus. **Hippocampus**, v. 22, n. 2, p. 359-371, 2012.

DATSON, N. A. et al. Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus. **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 3261-3272, 2013.

DAVIS, P. R.; HEAD, E. Prevention approaches in a preclinical canine model of Alzheimer's disease: benefits and challenges. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, 2014.

DE KLOET, E. R. From receptor balance to rational glucocorticoid therapy. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 2754-2769, 2014.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463-475, 2005.

DROR, Y.; STERN, F.; GOMORI, M. J. Vitamins in the prevention or delay of cognitive disability of aging. **Current aging science**, v. 7, n. 3, p. 187-213, 2014.

ELGH, E. et al. Cognitive dysfunction, hippocampal atrophy and glucocorticoid feedback in Alzheimer's disease. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 2, p. 155-161, 2006.

FERGUSON, D.; SAPOLSKY, R. Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 30, p. 8046-8052, 2007.

FERGUSON, D; SAPOLSKY, R. Overexpression of mineralocorticoid and transdominant glucocorticoid receptor blocks the impairing effects of glucocorticoids on memory. **Hippocampus**, v. 18, n. 11, p. 1103-1111, 2008.

FOSTER, C. Interaction of rapid signal transduction cascades and gene expression in mediating estrogen effects on memory over the life span. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 26, n. 2, p. 51-64, 2005.

FUNDER, J. W. Non-genomic actions of aldosterone: role in hypertension. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 10, n. 2, p. 227-230, 2001.

GIUBILEI, F. et al. Altered circadian cortisol secretion in Alzheimer's disease: clinical and neuroradiological aspects. **Journal of neuroscience research**, v. 66, n. 2, p. 262-265, 2001.

GOMEZ-SANCHEZ, E; GOMEZ-SANCHEZ C. E. The multifaceted mineralocorticoid receptor. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 965-994, 2014.

HARRIS, A. P. et al. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 5, p. 648-658, 2013.

HEAD, E. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 9, p. 1384-1389, 2013.

HEAD, E. et al. Effects of age, dietary, and behavioral enrichment on brain mitochondria in a canine model of human aging. **Experimental neurology**, v. 220, n. 1, p. 171-176, 2009.

HEAD, E. et al. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. **Journal of neurochemistry**, v. 82, n. 2, p. 375-381, 2002.

HEAD, E. Neurobiology of the aging dog. **Age**, v. 33, n. 3, p. 485-496, 2011.

HEINE, V. M. et al. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 131-144, 2004.

HERMAN, J. P. et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 151-180, 2003.

HERMAN, J. P. et al. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1201-1213, 2005.

HILL, M. N. et al. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 29, p. 10506-10515, 2011.

HWANG, I. K. et al. Comparison of glutamic acid decarboxylase 67 immunoreactive neurons in the hippocampal CA1 region at various age stages in dogs. **Neuroscience letters**, v. 431, n. 3, p. 251-255, 2008.

HWANG, I. K. et al. Differences in doublecortin immunoreactivity and protein levels in the hippocampal dentate gyrus between adult and aged dogs. **Neurochemical research**, v. 32, n. 9, p. 1604-1609, 2007.

JOELS, M.; KRUGERS H. J. LTP after stress: up or down? **Neural Plasticity**, 2007.

JOELS, M, et al. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. **Stress**, v. 7, n. 4, p. 221-231, 2004.

JOELS, M.; SARABDJITSINGH, R. A.; KARST, H. Unraveling the time domains of corticosteroid hormone influences on brain activity: rapid, slow, and chronic modes. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 4, p. 901-938, 2012.

KARST, H. et al. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 52, p. 19204-19207, 2005.



KESNER, R. P. An analysis of dentate gyrus function (an update). **Behavioural Brain Research**, 2017.

KIATIPATTANASAKUL, W. et al. Apoptosis in the aged dog brain. **Acta neuropathologica**, v. 92, n. 3, p. 242-248, 1996.

KIATIPATTANASAKUL, W. et al. Immunohistochemical detection of anti-oxidative stress enzymes in the dog brain. **Neuropathology**, v. 17, n. 4, p. 307-312, 1997.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 453-462, 2002.

LEE, A. L.; OGLE, W. O.; SAPOLSKY, R. M. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. **Bipolar disorders**, v. 4, n. 2, p. 117-128, 2002.

LISMAN, J. E. Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate–CA3 interactions. **Neuron**, v. 22, n. 2, p. 233-242, 1999.

LUCASSEN, P. J. et al. Stress, depression and hippocampal apoptosis. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, v. 5, n. 5, p. 531-546, 2006.

LUO, W. et al. Transcriptome comparison in the pituitary–adrenal axis between Beagle and Chinese Field dogs after chronic stress exposure. **Animal genetics**, v. 46, n. 5, p. 522-534, 2015.

LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature reviews neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 434-445, 2009.

MCAVOY, K. M.; SAHAY, A. Targeting Adult Neurogenesis to Optimize Hippocampal Circuits in Aging. **Neurotherapeutics**, v.14, p.630–645, 2017.

MCEWEN, B. S. Structural plasticity of the adult brain: how animal models help us understand brain changes in depression and systemic disorders related to depression. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 119, 2004.

MCINTOSH, L. J.; CORTOPASSI, K. M.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. **Brain research**, v. 791, n. 1, p. 215-222, 1998.

MELIS, J. P. M et al. Aging on a different scale—chronological versus pathology-related aging. **Aging (Albany NY)**, v. 5, n. 10, p. 782-788, 2013.

- MICHAILIDOU, Z. et al. Glucocorticoid receptor haploinsufficiency causes hypertension and attenuates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and blood pressure adaptations to high-fat diet. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 11, p. 3896-3907, 2008.
- MIZOGUCHI, K. et al. Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. **Neuroscience**, v. 159, n. 1, p. 259-270, 2009.
- MURIALDO, G. et al. Hippocampal perfusion and pituitary-adrenal axis in Alzheimer's disease. **Neuropsychobiology**, v. 42, n. 2, p. 51-57, 2000.
- MURPHY, E. K. et al. Decrements in nuclear glucocorticoid receptor (GR) protein levels and DNA binding in aged rat hippocampus. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1362-1370, 2002.
- O'NEILL, D. G. et al. Longevity and mortality of owned dogs in England. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 638-643, 2013.
- OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 5, p. 1033-1044, 2013.
- OLIJSLAGERS, J. E. et al. Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 10, p. 2542-2550, 2008.
- OSELLA, M. C. et al. Canine cognitive dysfunction syndrome: prevalence, clinical signs and treatment with a neuroprotective nutraceutical. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 105, n. 4, p. 297-310, 2007.
- PATEL, P. D. et al. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. **Journal of psychiatric research**, v. 34, n. 6, p. 383-392, 2000.
- PEKCEC, A. et al. Effect of aging on neurogenesis in the canine brain. **Aging cell**, v. 7, n. 3, p. 368-374, 2008.
- PHAM, K. et al. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 879-886, 2003.
- PUGLIESE, M. et al. Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. **Brain research**, v. 1139, p. 85-94, 2007.

PUGLIESE, M. et al. Magnetic resonance imaging of cerebral involuntional changes in dogs as markers of aging: an innovative tool adapted from a human visual rating scale. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 2, p. 166-171, 2010.

REUL, J. M.; ROTHUIZEN, J.; DE KLOET, E. R. Age-related changes in the dog hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: neuroendocrine activity and corticosteroid receptors. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 1, p. 63-69, 1991.

ROFINA, J. E. et al. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. **Brain research**, v. 1069, n. 1, p. 216-226, 2006.

SALVIN, H. E. et al. Under diagnosis of canine cognitive dysfunction: a cross-sectional survey of older companion dogs. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 3, p. 277-281, 2010.

SANDI, C. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes. **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 4, p. 165-176, 2011.

SCHUTT, T.; TOFT, N.; BERENDT, M. Cognitive Function, Progression of Age-related Behavioral Changes, Biomarkers, and Survival in Dogs More Than 8 Years Old. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 29, n. 6, p. 1569-1577, 2015.

SAPOLSKY, R. M. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 755-765, 2000.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. **Endocrine reviews**, v. 7, n. 3, p. 284-301, 1986(a).

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels. **Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 2240-2244, 1986(b).

SARAVIA, F. et al. Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 480-492, 2007.

SASWATI P. et al. "Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 7, n. 43, 2015.

SCHMIDT, F. et al. Detection and quantification of  $\beta$ -amyloid, pyroglutamyl A $\beta$ , and tau in aged canines. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 74, n. 9, p. 912-923, 2015.

SECKL, J. R.; OLSSON, T. Glucocorticoid hypersecretion and the age-impaired hippocampus: cause or effect? **Journal of endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 201-211, 1995.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 23, p. 10771-10778, 1994.

SIWAK-TAPP, C. T. et al. Neurogenesis decreases with age in the canine hippocampus and correlates with cognitive function. **Neurobiology of learning and memory**, v. 88, n. 2, p. 249-259, 2007.

SIWAK-TAPP, C. T. et al. Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. **Neurobiology of aging**, v. 29, n. 1, p. 39-50, 2008.

SOHAL, R. S.; MOCKETT, R. J.; ORR, W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 1, 2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 575-586, 2002.

SOUSA, N.; CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. **Brain research reviews**, v. 57, n. 2, p. 561-570, 2008.

TAPP D et al. An antioxidant enriched diet improves concept learning in aged dogs. **Society for Neuroscience Abstracts**, v. 836, n. 12, 2003.

TAPP, P. D. et al. Frontal lobe volume, function, and  $\beta$ -amyloid pathology in a canine model of aging. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 38, p. 8205-8213, 2004.

TAPP, P. D., et al. Application of an automated voxel-based morphometry technique to assess regional gray and white matter brain atrophy in a canine model of aging. **Neuroimage**, v. 29, n. 1, p. 234-244, 2006.

TASKER, J. G.; DI, S.; MALCHER-LOPES, R. Rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5549-5556, 2006.

TAUPIN, P. **The Hippocampus: neurotransmission and plasticity in the nervous system**. Nova York: Nova Science Publishers, Nova York, 2007.

VYAS, S. et al. Chronic stress and glucocorticoids: from neuronal plasticity to neurodegeneration. **Neural plasticity**, 2016.

WIEGERT, O. et al. Glucocorticoid receptor activation selectively hampers N-methyl-D-aspartate receptor dependent hippocampal synaptic plasticity in vitro. **Neuroscience**, v. 135, n. 2, p. 403-411, 2005.

WOOLLEY, C. S. et al. Effects of aldosterone or RU28362 treatment on adrenalectomy-induced cell death in the dentate gyrus of the adult rat. **Brain research**, v. 554, n. 1, p. 312-315, 1991.

YANG, C. H.; HUANG, C. C.; HSU, K. S. Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4288-4293, 2005.

YOUSSEF, S. A. et al. Pathology of the aging brain in domestic and laboratory animals, and animal models of human neurodegenerative diseases. **Veterinary pathology**, v. 53, n. 2, p. 327-348, 2016.

YU, C. H. et al. Histopathological and immunohistochemical comparison of the brain of human patients with Alzheimer's disease and the brain of aged dogs with cognitive dysfunction. **Journal of comparative pathology**, v. 145, n. 1, p. 45-58, 2011.

ZENNARO, M. C.; LE MENUET, D.; LOMBES, M. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. **Molecular endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 1549-1560, 1996.