

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

GISELE PRISCILA SOARES DE AGUIAR

# AUMENTO DA ATIVAÇÃO NEURONAL E DE MARCAÇÃO DE BDNF APÓS DEGRADAÇÃO DAS REDES PERINEURONAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE PRIVAÇÃO SENSORIAL

BELÉM 2016

## GISELE PRISCILA SOARES DE AGUIAR

## AUMENTO DA ATIVAÇÃO NEURONAL E DE MARCAÇÃO DE BDNF APÓS DEGRADAÇÃO DAS REDES PERINEURONAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE PRIVAÇÃO SENSORIAL

**Defesa** de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Neurociências Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade Orientador: Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia Co-Orientador: Prof. Dr. Antonio Pereira Jr Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP) Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Aguiar, Gisele Priscila Soares de

Aumento da ativação neuronal e de marcação de BDNF após degradação das redes perineuronais em modelo experimental de privação sensorial / Gisele Priscila Soares de Aguiar ; Orientador, Carlomagno Pacheco Bahia ; Co-Orientador, Antonio Pereira Jr. - 2016.

74 f. : il. Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

 Sistema nervoso – avaliação sensorial. 2. Privação sensorial.
Neuroplasticidade. I. Bahia, Carlomagno Pacheco, orientador. II. Pereira Jr, Antonio, co-orientador. III. Titulo.

CDD – 22 ed. 612.8

#### GISELE PRISCILA SOARES DE AGUIAR

## AUMENTO DA ATIVAÇÃO NEURONAL E DE MARCAÇÃO DE BDNF APÓS DEGRADAÇÃO DAS REDES PERINEURONAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE PRIVAÇÃO SENSORIAL

**Defesa** de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Belém (PA), 23 de setembro de 2016. Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia ICS-UFPA (Orientador)

Prof. Dr. Antonio Pereira Jr Instituto do Cérebro- UFRN (Co-Orientador)

Prof. Dr. Eliã Pinheiro Botelho ICS-UFPA (1°Avaliador)

Marcelo Marques Cardoso ICS-UFPA (2°Avaliador)

#### AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família que sempre me apoiou, principalmente aos meus pais, Nelcy Aguiar e Carlos Aguiar, que facilitaram e muito meu percurso até aqui.

À minha mãe e madrinha, Theyla Pinheiro, mesmo longe ela consegue me passar boa energia, incentivando, tranquilizando e impulsionando meu crescimento profissional e, sobretudo, pessoal.

Aos meus colegas do Laboratório de Neuroplasticidade (LNP), em especial ao Klebson, ao meu orientador e co-orientador com quem estou sempre aprendendo sobre ciência e aprendendo a lidar com as dificuldades em se fazer ciência onde vivemos.

Às neurogatas, minhas divas, especialmente à Susanne, Ivanira e Vanessa, que me ajudaram no meu trabalho além da amizade e companheirismo. E ao neuroboy, Dannilo, querido pupilo.

Aos meus amigos parceiros e amigos pra vida, que carrego desde os tempos de escola e de graduação: à Fernanda, aos Fibroblastos, aos Sensates... Todos eles sabem que são extremamente importantes pra mim.

Ao apoio financeiro proporcionado pelo CNPQ e agradeço também aos laboratórios colaboradores.

YOUNG, GIFTED

AND BLACK.

(Nina Simone, 1958)

#### RESUMO

O sistema nervoso central (SNC) tem a capacidade de processar e armazenar informações colhidas do ambiente e, em virtude disso, modificar-se para se adequar à diversidade de estímulos ambientais. Entretanto, o SNC possui baixa capacidade regenerativa após lesão ou doença neurodegenerativa. Diversos trabalhos estão demonstrando os mecanismos celulares e moleculares que atuam em sua plasticidade, como as moléculas de glicosaminoglicanas de sulfato de condroitina (GAGs-SC), importantes componentes da matriz extracelular do tecido nervoso responsáveis pela estabilização sináptica, concentração de fatores de crescimento e íons próximos aos neurônios. A degradação destas GAGs-SC do tecido nervoso possui o potencial de (re)abrir uma (nova) janela para plasticidade do SNC. O objetivo de nosso trabalho foi avaliar a influência da degradação destas GAGs-SC na atividade neuronal, demonstrada via marcação de cFos, e nos níveis de marcação de BDNF, em modelo experimental de privação sensorial durante o período crítico de plasticidade. Para isso, utilizamos 18 Rattus novergicus, da linhagem Wistar, submetidos à vibrissectomia da face direita desde o primeiro dia de vida (P0) até o fim do período crítico de plasticidade (P30). Os animais privados com 40 dias de vida receberam implantes epidurais de polímero Elvax, previamente saturado com condroitinase ABC (para degradação da matriz extracelular) ou com albumina de soro bovino (controle), no campo de barris do hemisfério cerebral contralateral à privação sensorial (esquerdo). Após 10 (P50) ou 20 dias (P60) de implante do polímero, nossos resultados demonstram que os animais submetidos a privação sensorial e à degradação das GAGs-SC apresentaram alteração na característica de maturidade das redes perineuronais (PNNs) em relação aos animais sem privação. Estes animais também apresentam aumento no número de células cFos positivas (principalmente na camadas granular de S1) e de imunomarcação para BDNF no PMBSF privado após o implante de elvax saturado com ChABC. Desta forma, concluímos que a degradação das GAGs-SC induziu a plasticidade local, provocando mudanças na atividade cortical e na expressão de BDNF no PMBSF privado, mesmo 30 dias após o fim do período crítico de plasticidade de S1.

**Palavras chaves:** Módulos de processamento sensorial; cFos; BDNF; Campo de barris; Privação Sensorial; Período Crítico de Plasticidade; Neuroplasticidade

#### ABSTRACT

The central nervous system (CNS) has the ability to processing and store information collected from the environment, and modifies and adapt under environmental stimuli diversity. However, It has low regeneration capacity after injury or neurodegenerative disease. Several works are demonstrating cellular and molecular mechanisms implicated in CNS plasticity, such as chondroitin sulfate glycosaminoglycans (GAGs-SC) important components of the extracellular matrix from nervous tissue, responsible for synaptic stabilization, toconcentrateof growth factors and ions around neurons. Removing CSPG of the nervous tissue, we can (re)opens a potential plasticity window in the CNS. The goal of our work is to evaluate the influence of removal of GAGs-SC on neuronal activity, via cFos immunolabeling, and BDNF proteins levels at the barrel cortex, under an experimental model of sensory deprivation (vibrissectomy) during critical period of plasticity. To do that, we used 18 rats (Rattus novergicus), Wistar lineage, submitted to the removal of all whiskers from their right snout (vibrissectomy) since first day of life (P0) until the end of critical period of plasticity (P30). The 40 days deprived animals received epidural polimer implant of Elvax, previously saturated with chondroitinase ABC (ChABC, to degraded the extracellular matrix) or with bovine albumin serum(BSA, control), on the barrel cortex of contralateral cerebral hemisphere to the sensory deprivation (left). The animals were perfused 10 (P50) or 20 days (P60) after Elvax implant. Our results shown that the animals submitted to the sensory deprivation, during critical period of plasticity of S1, and to GAGsSC degradation presents modification in perineuronal net (PNNs) characteristics when compared to control animals, at P50. Those animals also presents increase in cFos labeled cells (mainly at the granular layer of S1) and in BDNF labeled cells at the deprived PMBSF, both seen in 10 (P50) as 20 days (P60) after Elvax implant saturated with ChABC. In this way, we concluded that GAGs-SC removal induced local plasticity, evoking changes in cortical activity and BDNF expression at the deprived PMBSF, even 30 days after critical period of plasticity ended at S1.

Key words:SensoryProcessingModule;cFos;BDNF;BarrelCortex;SensoryDeprivation;CriticalPeriod;Neuroplasticity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ORGANIZAÇÃO DOS BARRIS 15
FIGURA 2: VIAS SOMATOSENSORIAIS (TRIGEMINAIS) DA REPRESENTAÇÃO DA FACE SÃO SEGREGADAS E PARALELAS DESDE A PERIFERIA SENSORIAL ATÉ CHEGAREM AO CÓRTEX CEREBRAL 16
FIGURA 3: MECANISMOS QUE CONTROLAM ABERTURA E FECHAMENTO DE PERÍODOS CRÍTICOS DE PLASTICIDADE 19
FIGURA 4: REMODELAMENTO SINÁPTICO DEPENDENTE DE ATIVIDADE ELÉTRICA DURANTE O PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE <b>20</b>
FIGURA 5: PROCESSO DE SÍNTESE, TRÁFICO E ATUAÇÃO DE BDNF NO RECEPTOR TRKB <b>22</b>
FIGURA 6: ESTRUTURAS DAS LECTICANAS 27
FIGURA 7: PNNS E PLASTICIDADE 28
FIGURA 8: ILUSTRAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE PRIVAÇÃO SENSORIAL DOS ANIMAIS E O IMPLANTE DE ELVAX 33
FIGURA 9: ILUSTRAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL 37
FIGURA 10: ILUSTRAÇÃO DO MÉTODO DE CONTAGEM DE CÉLULAS 41
FIGURA 11: FOTOMICROGRAFIAS DA HISTOQUÍMICA PARA Vicia villosa 41
FIGURA 12: EFEITO DA PRIVAÇÃO SENSORIAL E DEGRADAÇÃO DAS GAGS- SC SOBRE AS PNNS NO PMBSF DE RATOS, EM P50 43
FIGURA 13: EFEITO DA PRIVAÇÃO SENSORIAL E DEGRADAÇÃO DAS GAGS- SC SOBRE AS PNNS NO PMBSF DE RATOS, EM P60 44
FIGURA 14: QUANTIFICAÇÃO DAS PNNS MADURAS E IMATURAS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS NAS DIFERENTES SOBREVIDAS (10 OU 20 DIAS APÓS O IMPLANTE) <b>45</b>
FIGURA 15: QUANTIFICAÇÃO DAS PNNS NOS HEMISFÉRIOS CEREBRAIS HD (NÃO PRIVADO) E HE (PRIVADO) DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS <b>46</b>
FIGURA 16: EFEITO DA PRIVAÇÃO SENSORIAL E DEGRADAÇÃO DAS GAGS- SC SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DE CFOS NO PMBSF DE RATOS, EM P50 <b>48</b>
FIGURA 17: EFEITO DA PRIVAÇÃO SENSORIAL E DEGRADAÇÃO DAS GAGS- SC SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DE CFOS NO PMBSF DE RATOS, EM P60 <b>49</b>

FIGURA 18: EFEITO DA PRIVAÇÃO SENSORIAL E DEGRADAÇÃO DAS GAGS-SC SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DE CFOS NAS CAMADAS CORTICAIS DO PMBSF DE RATOS, EM P50 E P60 50 FIGURA 19: QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CFOS POSITIVAS NAS CAMADAS CORTICAIS DO PMBSF DE ANIMAIS PRIVADOS E NÃO PRIVADOS 51 FIGURA 20: QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CFOS POSITIVAS NOS HD E HE DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS 52 FIGURA 21: EFEITO DA PRIVAÇÃO SENSORIAL E DEGRADAÇÃO DAS GAGS-SC SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DE BDNF NO PMBSF DE RATOS 54 TABELA 1: CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS 36 TABELA 2: ILUSTRAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL 40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADAMTs Desintegrinas e metaloproteinases com resíduos de trombospondina
- ALBSF Subcampo anterolateral de barris
- AMPAR Receptor ionotrópico AMPA
- BDNF Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BSA Albumina de soro bovino
- ChABC Condroitinase ABC
- GABA-t GABA transaminase
- GAD65 Ácido glutâmico descarboxilase
- GAG Glicosaminoglicanas
- GAGs-SC Glicosaminoglicanas de sulfato de condroitina
- GDNF Fator neurotrófico derivado de células gliais
- MEC Matrix extracelular
- mIPSC Correntes pós-sinápticas inibitórias em miniatura
- MMPs Metaloproteinases
- NGF Fator trófico neural
- NMDAR Receptor ionotrópico NMDA
- PGSC Proteoglicanos sulfato de condroitina
- PMBSF Subcampo posteromedial de barris
- PNNs Redes perineuronais
- POM Núcleo posteromedial do tálamo
- PV Parvalbumina
- rPTPσ Proteína tirosina fosfatase do tipo sigma
- SNC Sistema nervoso central

- S1 Córtex somestésico primário
- S2 Córtex somestésico secundário
- tpA Fator plasminogênio tecidual
- TrkB Receptor tirosina cinase do tipo B
- VPM Núcleo ventroposteromedial do tálamo
- Vglut Transportador vesicular de glutamato
- VV Vicia villosa
- WFA Wisteria floribunda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	.12
1.1 CÓRTEX SOMESTESICO	.13
1.1.1 CAMPO DE BARRIS	.13
1.1.2 AFERÊNCIAS CORTICAIS PARA O CAMPO DE BARRIS	.14
1.2 PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE E PRIVAÇÃO SENSORIAL	.16
1.2.1 BDNF E DESENVOLVIMENTO CORTICAL CEREBRAIS	.20
1.3 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	.22
1.3.1 REDES PERINEURONAIS (PNNs) E SUA IMPORTÂNCIA PARA	
PLASTICIDADE DO SNC	.23
1.3.2 GAGs E NEUROPLASTICIDADE	.27
1.4 JUSTIFICATIVA	.27
2. OBJETIVOS	.29
2.1. OBJETIVO GERAL	.29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	.29
3. METODOLOGIA	.30
3.1. ANIMAIS	.30
3.2. PRIVAÇÃO SENSORIAL	.30
3.3. PREPARAÇÃO E IMPLANTE DO ELVAX	.32
3.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS	.33
3.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	.33
3.6. HISTOLOGIA	.36
3.6.1 PERFUSÃO, CRANIOTOMIA E MICROTOMIA	.36
3.6.2.1 HISTOQUÍMICA PARA VICIA VILLOSA	.36
3.6.2.2 IMUNOHISTOQUÍMICAS PARA BDNF E CFOS	.37
3.6.2.3 LAVAGEM, DESIDRATAÇÃO E MONTAGEM	.38
3.7 MÉTODOS DE CONTAGEM DE CÉLULAS	.38
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	.40
4. RESULTADOS	.40
4.1. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VV POSITIVAS PRESENTES NO PMBSF	.41
4.2. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CFOS POSITIVAS PRESENTES NO PMBSF	46
4.3. ANÁLISE QUALITATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO PARA BDNF	.52
5. DISCUSSÃO	54

.54
.57
)
.59
.61
.62
.63
.73

### 1. NTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) responde adaptativamente aos mais variados estímulos ambientais e é capaz de se modificar em resposta aos estímulos relevantes como acontece durante os processos de aprendizagem e formação de memória. Durante e após o desenvolvimento ontogenético, o tecido nervoso apresenta um período onde as modificações e adaptações são mais pronunciadas, o período crítico de plasticidade, que o permite ser mais susceptível às influências ambientais (FELDMAN, 2009).

Passados o período crítico de neuroplasticidade e o amadurecimento cortical cerebral, a plasticidade do SNC sofre um declínio tornando então menor a sua capacidade regenerativa ou de modificações em resposta aos estímulos ambientais (FELDMAN, 2009). Algumas alternativas têm-se mostrado capazes de restaurar a plasticidade е assim otimizar а recuperação de lesões ou modificações/readequações de sistemas sensoriais privados de informações do ambiente. Novas terapias celulares, moleculares ou ainda abordagens fisioterápicas para reabilitação do sistema locomotor, têm apresentado importante progresso neste sentido (THURET *et al.*, 2006). Umas das mais promissoras terapias é a degradação de elementos da matriz extracelular com reconhecida ação inibitória à plasticidade sináptica, que torna o meio mais permissivo à formação de novas sinapses (ROUSLAHTI, 1996; RAUCH, 1997; MOON et al., 2001; BRADBURY et al., 2002; JOHN et al., 2006).

Dentre os fatores responsáveis por bloquear ou reduzir a neuroplasticidade, encontram-se as moléculas de proteoglicanos contendo sulfato de condroitina (PGSC) que desempenham um papel importante na estabilização das sinapses e manutenção das relações celulares no tecido nervoso adulto; na de fatores de crescimento ao redor de certos neurônios e, ainda, promovem ligação da matriz extracelular com o citoesqueleto (CELIO and BLÜMCKE, 1994; CELIO *et al.*, 1998; VIGGIANO, 2000). Naturalmente, essas moléculas são alvos de várias manipulações terapêuticas experimentais.

No presente projeto, propomos realizar a degradação de glicosaminoglicanas sulfato de condroitina (GAGs-SC) do córtex somestésico de ratos (S1), especificamente dos módulos de processamento sensorial chamado de campo de barris, visando a geração de novas sinapses, atividade neuronal via marcação de

cFos e a influência de uma importante proteína sobre esta plasticidade dependente de experiência e estímulos ambientais, como o BDNF.

## 1.1. CÓRTEX SOMESTÉSICO

O córtex somatossensorial ou somestésico primário (S1) é a área cortical cerebral responsável por processar informação sensorial captada por receptores distribuídos por todo o corpo do individuo. Assim como em outras áreas corticais cerebrais, S1 se organiza em estrutura colunar e cada camada cortical apresenta características funcionais e anatômicas distintas (ver MOUNTCASTLE, 1997). São elas: camada **molecular** (I), constituída de poucos corpos ceulares de neurônios não-piramidais e células gliais, fibras e terminações axonais e dendríticas; camadas **supragranulares** (II/III), rica em neurônios piramidais; camada **granular** (IV), onde estão presentes neurônios estrelados e que recebem os inputs sensoriais vindos do tálamo; e **infragranulares** (V/VI), neurônios piramidais com axônios projetando para fora do córtex (BROADMANN, 1909).

Em S1 estão presentes grupos de neurônios que respondem especificamente a uma parte específica da superfície do corpo, formando mapas receptivos conhecidos como somatotopia cortical (KAAS, 2004). A estrutura da superfície do corpo com maior representação, em termos de área cortical cerebral ocupada, depende especialmente de sua importância para o individuo, aliada à densidade de receptores nesta estrutura (CATANIA, 2002). Nos pequenos roedores, por exemplo, as grandes vibrissas são importantes porque recebem boa parcela de informação sensorial conduzida aos barris em S1 ((WOOLSEY and LOOS, 1970).

### 1.1.1. CAMPO DE BARRIS

O campo de barris (módulos de processamento sensorial) é um dos modelos experimentais mais usados para estudos de circuitos neurais, desenvolvimento, regeneração e plasticidade do sistema nervoso central porque apresenta estrutura colunar clara e fácil de definir funcionalmente e histologicamente (FOX, 2002). Os barris são estruturas anatômicas compostas por agregados de células granulares, presentes na camada granular (camada IV), que possuem relação topográfica precisa com as grandes vibrissas mistaciais do focinho do animal (Figura 1). São

separados pelos septos, uma zona com alta densidade de células GABAérgicas (WOOLSEY and LOOS, 1970; DAWSON and KILLACKEY, 1985).

Cada barril do subcampo posteromedial (PMBSF do acrônimo inglês *Postero Medial Barrel Subfield*) recebe aferências de uma única vibrissa do focinho do animal (Figura1) (HARRIS *et al.*, 1999). As vibrissas mistaciais, estruturas organizadas em cinco fileiras e cinco colunas na face de pequenos roedores, responsáveis pela discriminação tátil, localização de objetos, tamanho e distância são individualmente representadas no PMBSF, enquanto que as vibrissas do focinho rostral são representadas no subcampo anterolateral (ALBSF) de S1 (WELKER, 1976; PETERSEN, 2003).



Figura1: **Organização dos barris** do PMBSF na camada IV de S1 com representação precisa e individualizada das grandes vibrissas do focinho do animal. Adaptado de Diamond and Arabzadeh, 2012.

## 1.1.2. AFERÊNCIAS SENSORIAIS PARA O CAMPO DE BARRIS

Cada folículo de uma vibrissa é cercado por diversas terminações nervosas livres de neurônios sensoriais trigeminais que conduzem as informações sensoriais táteis captadas por este órgão sensorial para o campo de barris em S1. Estas terminações captam a informação que segue inicialmente para o gânglio trigeminal no tronco encefálico (*barrilettes*). Dos *barrilletes* as informações táteis são transmitidas aos *barreloides*, outros módulos de processamento sensorial

localizadas no núcleo ventroposteromedial (VPM) do tálamo, onde fazem a segunda estação sináptica. Estas, por sua vez, transmitem a informação diretamente ao barril correspondente à vibrissa estimulada no PMBSF para S1 no córtex cerebral. Definese então uma das principais vias de processamento sensorial, a *via lemniscal*. Por outro lado, Os *barriloides* no núcleo posteromedial (POM) do tálamo também enviam as informações táteis para a região de septo na camada IV, desta forma compondo a *via paralemniscal*. Na *via extralemniscal*, os neurônios dos *barrilettes* projetam para domínio ventrolateral do VPM (VPMvI) do tálamo, com seus axônios se projetando para o septo entre os barris de S1 e para a área somestésica secundária (S2) (Figura 2) (KILLACKEY *et al.*, 1995; PETERSEN, 2003; BRECHT, 2007).



Figura 2: Vias somatosensoriais (trigeminais) da representação da face são segregadas e paralelas desde a periferia sensorial até chegarem ao córtex cerebral. (A) Aferências somatosensoriais partindo do folículo das grandes vibrissas na face do animal, seguindo ao gânglio trigeminal (TG), ao núcleo trigeminal (TN) do tronco encefálico, ao tálamo e ao córtices somestésico primário (S1) e secundário (S2). (B) Via lemniscal (vermelha) transmitindo informação tátil diretamente ao centro do barril; a via paralemniscal (verde), transmitindo informação sensorial ao septo; já a via extralemniscal (azul) conduz informação tátil direto do tálamo somestésico para o córtex motor primário. Ao chegar em S1, as vias lemniscal e paralemniscal são complementares. Abreviações: VPM, núcleo

posteromedial ventral do tálamo; VPMvI, domínio ventrolateral do núcleo posteromedial ventral do tálamo; VPMdm, secção dorsomedial do núcleo posteromedial ventral do tálamo; POM, secção medial do núcleo posterior do tálamo. Adaptado de Diamond, 2008 e Peterson, 2007.

## 1.2. PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE E PRIVAÇÃO SENSORIAL

**Plasticidade sináptica** é definida como a capacidade do SNC em se adaptar às mudanças dos estímulos ambientais. No início do desenvolvimento pós-natal, o SNC é mais sensível a essas adaptações e possui capacidade plástica aumentada, uma janela de oportunidades de adaptação do córtex cerebral aos estímulos captados pela periferia sensorial, apresentando então um **período crítico de plasticidade** (FELDMAN, 2009), que variam entre as modalidades sensoriais e as camadas corticais (FOX, 2002; ERZURUMLU and GASPAR, 2012).

São inúmeros os fatores que atuam no início e no término do período crítico de plasticidade, dentre eles principalmente observamos:

 - A competição e a força sináptica, onde há o fortalecimento de conexões pré e pós-sinápticas que estão sincronizadas e enfraquecimento das conexões dessincronizadas (Figura 4) (FELDMAN, 2001);

- O equilíbrio entre a excitação e inibição cortical, destacando a importância dos interneurônios e de seu papel inibitório sobre o amadurecimento do córtex cerebral (Figura 4C) (NOWICKA *et al.*, 2009; GENTET, 2012; MAGUERESSE and MONYER, 2013; LIGUZ-LECZNAR *et al.*, 2014);

- E ainda, a diversidade molecular presente nos diferentes estágios do desenvolvimento. Moléculas que contribuem tanto para a abertura e o processo de plasticidade quanto para o encerramento do período crítico de plasticidade (Figura 3) (MCALLISTER *et al.*, 1999; BEURDELEY *et al.*, 2012; GU *et al.*, 2013);

Algumas destas moléculas, relacionadas ao período crítico e plasticidade, estão apresentadas na Figura 3. Dentre elas, fatores tróficos (como o BDNF, NGF e GDNF); proteínas que atuam no sistema inibitório, como a parvalbumina, GAD65; transportadores, receptores, canais iônicos e enzimas (Vglut, GABA-t, NMDAR, AMPAR, rPTPσ); proteínas presentes nas vesículas sinápticas (sinaptogamina, sinapsinal, sinaptofisina); e ainda, genes imediatos (MCALLISTER *et al.*, 1999;

FAGIOLINI *et al.*, 2009; OKUNO, 2011; MOREAU and KULLMANN, 2013; KARPOVA, 2014; SIDDOWAY *et al.*, 2014). Em geral são agentes que também participam do desenvolvimento de circuitos sinápticos.

Deve-se lembrar ainda que o período crítico de plasticidade é dependente do uso das vias neurais, ou seja, desenvolve-se com a presença de estímulos da periferia sensorial. Logo, a ausência destes estímulos impede a formação correta dos mapas corticais que representam a periferia sensorial, o que pode ser observado em diversos modelos experimentais de privação sensorial (FOX, 1992; RHOADES *et al.*, 1997; PIZZORUSSO *et al.*, 2006; BAHIA *et al.*, 2008; GHOSHAL *et al.*, 2009). O corte das vibrissas no período neonatal (*trimming*), por exemplo, é capaz de alterar o tamanho dos barris em S1 de ratos (LEE *et al.*, 2009).

Deste modo, privações sensoriais durante o período crítico de plasticidade provocam alterações sinápticas, estruturais, funcionais e até grandes mudanças morfológicas na área privada (KELLER and CARLSON, 1999; STERN *et al.*, 2001; FOX and CATERSON, 2002; HENSCH, 2004; REBSAM *et al.*, 2005; BRINER *et al.*, 2010; CHU *et al.*, 2013).

Portanto, como os genes imediatos estão relacionados a plasticidade cortical e sua expressão acontece apenas na presença de estímulos, investigamos nesse estudo se a privação sensorial, durante todo período crítico de plasticidade, e a degradação das GAGs-SC influenciam e/ou alteram a atividade neuronal no PMBSF de S1, via marcação do gene cFos.



Figura 3: Mecanismos que controlam abertura e fechamento de períodos críticos de plasticidade do SNC. (A) Abertura do período crítico de plasticidade é guiado por fatores que promovem maturação de células parvalbumina (Otx2, BDNF, and NARP), levando a um balanço de atividade excitatória e inibitória nos circuitos corticais. Isso leva a uma sequência de eventos moleculares, incluindo segundo mensageiros (CaMKII, ERK), miR-132, CREB, síntese de proteínas, liberação de proteases (tPA) e fatores homeostáticos (TNFa), o que induz mudanças estruturais (*spine pruning, regrowth, axonal rewiring*). O período crítico de plasticidade então fecha quando moléculas, conhecidas como "molecular brakes", gradualmente emergem para diminuir a plasticidade, dentre as quais: PNNs (CSPG), sinalização de receptor nogo (Alluin *et al.*)-PirB, Lynx1 e mudanças epigenéticas (HDAC). Adaptado de Takesian and Hensch, 2013.



Figura 4: **Remodelamento sináptico dependente de atividade elétrica durante períodos críticos de plasticidade.** (A) Progressão do desenvolvimento de dendritos. Dendritos altamente dinâmicos no período crítico antes da consolidação de conexões maduras. (B) Mudanças no número de sinapses em função da idade. (C) Mudanças sinápticas dependentes de atividade elétrica ocorrem durante o período crítico de plasticidade, no qual a parceria sináptica é solidificada ou dissolvida, coincidindo com o fortalecimento da inibição pelos interneurônios inibitórios, mielinização e formação das redes perineuronais. Fonte: Doll and Boadie, 2014.

#### 1.2.1 BDNF E DESENVOLVIMENTO CORTICAL CEREBRAL

O fator neurotrófico derivado do cerébro (BDNF do acrônimo inglês *Brain Derived Neurotrofic Factor*) é uma neurotrofina importante para sobrevivência e morfogênese neuronal (HANOVER *et al.*, 1999). Em casos de baixa ou alta atividade neuronal, há indução da secreção do fator plasminogênio tecidual (tpA) ou atuação de metaloproteinases capazes de converter, no meio extracelular, o bdnf previamente secretado (proBDNF) em sua forma madura, o mBDNF (HANOVER *et al.*, 1999).

O BDNF possui papel importante na plasticidade neuronal, pois alguns trabalhos mostram que durante o desenvolvimento do SNC ocorre aumento da sua expressão no tecido nervoso, relacionado tanto com maturação do sistema de neurotransmissores inibitórios quanto com a manutenção de espinhas dendríticas (KARPOVA, 2014; KELLNER *et al.*, 2014). E que, além disso, sua atividade no receptor TrkB promove o aumento inicial da expressão de parvalbumina por interneurônios no córtex visual primário (V1), permitindo a abertura do período crítico de plasticidade,ao passo que sua super expressão implica em um início e término precoce do mesmo (HANOVER *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 1999; PATZ, 2004).

Alguns modelos de privação de informação visual, envolvendo curtos e longos períodos de tempo, têm influenciado na expressão de BDNF (BRACKEN e TURRIGIANo, 2009). Com privação monocular em animais jovens, Rossi *et al.* (ROSSI *et al.*) demonstraram que houve redução de células imunomarcadas para expressão de BDNF no córtex visual privado. Já em ratos neonatos, Seki *et al.* (2003) observaram redução parcial da expressão de BDNF na retina dos animais privados por 15 dias. Apesar disso, o BDNF tem sido importante para manutenção das espinhas dendríticas de neurônios piramidais em V1 e para a recuperação da resposta cortical cerebral (V1) depois da privação monocular (KANEKO *et al.*, 2012). Em outras palavras, esta neurotrofina exerce papel importante para recuperação da plasticidade cortical.



Figura 5: **Processo de síntese, tráfico e atuação de BDNF no receptor TrkB**. Inicialmente sintetizada no retículo endoplasmático (RE) como um precursor (pró-BDNF), o BDNF é moldado no RE e no complexo de Golgi que o empacota em vesículas secretoras. Em seguida, o BDNF é destinado a vias constitutivas ou regulatórias e transportados para o local apropriado de liberação. O pró-BDNF pode ser clivado intracelularmente por furinas ou proteínas convertases, resultando na secreção do BDNF maduro (mBDNF). Alternativamente, o pró-BDNF pode ser secretado e clivado extracelularmente pela via de tPA/plasmina ou metaloproteinases, definindo-o em mBDNF. Uma vez secretado, o pró-

BDNF e o mBDNF elicitam diversas ações biológicas, opostas, via dois distintos receptores. O mBDNF se liga ao TrkB, levando à autofosforilação de resíduos de tirosina, no domínio de tirosina cinase. Em contraste, o pró-BDNF se liga ao receptor p75 (p75NRT), resultando em ativação de outras moléculas de sinalização intracelular. Adaptado de Woo and Lu, 2009.

Sabendo que o BDNF, como importante proteína relacionada à plasticidade, sofre influência de estímulos e da periferia sensorial, buscamos investigar neste trabalho se a privação sensorial, durante o período crítico de plasticidade, e a degradação das GAGs-SC influenciam e/ou alteram os níveis de BDNF no campo de barris de S1.

#### 1.3. MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A matriz extracelular possui papel fundamental na manutenção da homeostase e de algumas funções celulares. Seus principais constituintes, como as glicoproteínas, proteoglicanos e proteínas de adesão atuam em conjunto na proliferação, migração, adesão e diferenciação celular (ROZARIO and DESIMONE, 2010).

No desenvolvimento do SNC se tem observado que o remodelamento da MEC é necessário para permitir o crescimento de neuritos (futuramente axônios ou dendritos) de neurônios jovens (WANG and ZHANG, 2008; DITYATEV *et al.*, 2010; WLODARCZYK *et al.*, 2011; ENRIQUEZ-BARRETO *et al.*, 2012; HOWELL and GOTTSCHALL, 2012). Naturalmente, algumas proteinases presentes no tecido nervoso são as responsáveis por fazer esse remodelamento através da degradação dos componentes da MEC. São inúmeros tipos de proteinases já descritas, mas as famílias de metaloproteinases (MMPs) desintegrinas e metaloproteinases com resíduos de trombospondina (ADAMTs) são as mais estudadas, capazes de degradar tanto glicoproteínas quanto os proteoglicanos (Lu *et al.*, 2011).

Como os proteoglicanos se encontram em abundância na MEC do SNC depois do período crítico de plasticidade, principalmente os sulfato de condroitina (PGSC) que compõem as PNNs, no presente trabalho propomos avaliar se a degradação dessas moléculas do tecido nervoso por uma proteinase exógena, proporciona uma nova janela de oportunidade de plasticidade no SNC.

## 1.3.1 REDES PERINEURONAIS (PNNs) E SUA IMPORTÂNCIA PARA PLASTICIDADE DO SISTEMA NERVOSO

As PNNs são constituídas por, principalmente: glicoproteínas, tenascina-R, hialuronana e proteoglicanos (RHOADES and FAWCETT, 2004; KWOK *et al.*, 2011). Proteoglicanos são macromoléculas compostas por longas cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), ancoradas a uma proteína central por resíduos de serina. As GAGs que não se ancoram às proteínas centrais, a hialuronana ou ácido hialurônico, estão presentes na superfície de neurônios estabelecendo contato com a matriz extracelular. Atuam ligando as PNNs à superfície celular de neurônios, especialmente, os interneurônios GABAérgicos que expressam a proteína quelante de cálcio do tipo parvalbumina (Figura 4) (BRUCKNER *et al.*, 1994; CELIO and BLÜMCKE, 1994; CARULLI *et al.*, 2007).

Dentre as GAGs que formam os proteoglicanos, encontram-se sulfato de dermatana, sulfato de heparana, sulfato de queratana e sulfato de condroitina. Os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSC) compõem a família das lecticanas: fosfocana, versicana, agrecana, neurocana e brevicana. As últimas restritas ao tecido nervoso (KJELLÉN and LINDAHL, 1991; YAMAGUCHI, 2000).

Embora apresentem os mesmos domínios *N*-terminal e *C*-terminal, essas lecticanas variam em quantidade de GAGs de sulfato de condroitina ancoradas ao seu domínio central (Figura 5). Além disso, as lecticanas apresentam padrões de expressão diferentes durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal de mamíferos, sendo a brevicana mais prevalente no tecido nervoso adulto considerando-se a quantidade absoluta (YAMAGUCHI, 2000; FRISCHKNECHT and SEIDENBECHER, 2012).

Os PGSC são os proteoglicanos que se apresentam em maior quantidade nas PNNs. Estudos prévios demonstraram que o amadurecimento das PNNs coincide com o período de mielinização, sinaptogênese e desenvolvimento de canais iônicos dependentes de voltagem, além de apresentarem um importante papel no estabelecimento de sinapses (HOCKFIELD and MCKAY, 1983; KÖPPE *et al.*, 1997). Celio e Blümcke (1994) demonstraram que as PNNs também desempenham funções como a concentração de fatores de crescimento ao redor de neurônios e também um vínculo com o citoesqueleto intracelular, ajudando indiretamente com sinalização intracelular, crescimento axonal e de espinhas dendríticas (CELIO and BLÜMCKE, 1994; CARULLI *et al.*, 2005; KARETKO and SKANGIEL-KRAMSKA, 2009; WLODARCZYK *et al.*, 2011).

Bahia *et al.* (2008) observaram que as PNNs são expressas no PMBSF em pelo menos dois períodos distintos: de P5 a P17, no qual as moléculas de PGSC estão dispersas no parênquima do tecido nervoso e criam um ambiente favorável ao crescimento de aferências talamocorticais para o PMBSF, servindo como uma referência de ponto de parada no córtex cerebral; e a partir de P24, no qual as moléculas de PGSC já se organizam na forma de redes perineuronais ao redor do corpo celular e dendritos primário de certos neurônios, estabilizando as sinapses formadas, fechando o período crítico e limitando a plasticidade no PMBSF.



Figura 6: **Estruturas das lecticanas.** Todas as lecticanas contém domínios N-terminal G1 e domínios C-terminal G3. Somente agrecana contém domínio G2. Todas contém cadeias de sulfato de condroitina (*amarelo*) no domínio central. Agrecana também contém cadeias de sulfato de queratana (Wu *et al.*) na parte N-terminal do domínio central. Adaptado de Yamagushi,



Figura 7: **PNNs e plasticidade neural.** Composição da MEC dentro das PNNs na superfície neuronal, produzida por neurônios e astrócitos (a), aumentado em (a'). Ambiente inibitório a plasticidade (em vermelho), na presença de moléculas repulsivas. Apenas algumas áreas permissivas, indicadas em verde. Adaptado de Dzyubenko *et al.*, 2016.

#### 1.3.2 GAGs E A NEUROPLASTICIDADE

Muitos trabalhos têm relatado que os PGSCs são agentes não permissivos ao rearranjo sináptico (FAWCETT and ASHER, 1999; PIZZORUSSO *et al.*, 2002). Lesões no SNC provocam o aumento de sua produção na forma de cicatriz glial com propósito de impedir a difusão da lesão, desempenhando papel protetor ao tecido nervoso apesar de ao mesmo tempo, impedir a regeneração axonal (PIZZORUSSO *et al.*, 2002; CARULLI *et al.*, 2005; YIU and HE, 2006).

Na tentativa de reverter o papel restritivo dos PGSC na plasticidade do SNC, alguns estudos vêm descrevendo terapias eficazes em prolongar ou reabrir o período crítico, o que pode induzir/permitir eventos regenerativos no SNC, por exemplo, utilizando a enzima Condroitinase ABC (ChABC).

A ChABC é uma enzima extraída da bactéria *Proteus vulgaris* que degrada as GAGs sulfato de condroitina da matriz extracelular (SUZUKI *et al.*, 1968). Em modelos de lesão da medula espinhal em ratos adultos, a degradação dos PGSC pela ação da ChABC próxima à região da lesão foi capaz de criar um ambiente permissivo a regeneração axonal (MOON *et al.*, 2001; BRADBURY *et al.*, 2002). Adicionalmente em modelo de isquemia cerebral, a injeção da ChABC após três dias foi capaz de promover a recuperação sensoriomotora da pata anterior de ratos adultos (SOLEMAN *et al.*, 2012).

Sabendo disso, nossa hipótese experimental se baseia na estratégia da degradação GAGs-SC das PNNs,pelo uso da ChABC,após o período crítico de plasticidade de S1 visando recuperar a plasticidade desta área privada de informação sensorial, com aumento da atividade neuronal e formação de novas sinapses.

#### 1.4. JUSTIFICATIVA

Muitos estudos reafirmam que a degradação das GAGs-SC permite a recuperação da plasticidade do SNC, contudo, apresentados em modelos de lesão da medula espinhal ou lesão cortical cerebral experimental (MOON *et al.*, 2001;

BRADBURY *et al.*, 2002; SOLEMAN *et al.*, 2012). Nosso trabalho apresenta uma abordagem diferenciada, visando também à plasticidade, mas de módulos de processamento sensorial que foram privados de informação sensorial ao longo do desenvolvimento.

Este modelo experimental é análogo à privação de estímulos ambientais (sociais e cognitivos) esperados para os humanos na fase inicial do seu desenvolvimento (infância e adolescência) (SHERIDAN and MCLAUGHLIN, 2014). Porque tanto a privação sensorial experimental quanto a privação de estímulos ambientais em humanos apresentam consequências semelhantes para córtex cerebral como redução da espessura e do volume cortical privado, alterações estruturais nas sinapses e déficit cognitivo (MCLAUGHING *et al.*, 2014; SHERIDAN and MCLAUGHLIN, 2014). Estas alterações se estabelecem uma vez que a privação sensorial seja precoce, no período em que o tecido nervoso encontra-se mais susceptível às alterações ambientais (período crítico de plasticidade).

Além disso, a perspectiva geral de trabalhos como este que promovem a plasticidade, concentra-se em alcançar terapias não somente para regeneração como também para recuperação funcional do SNC.

#### 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência da degradação das glicosaminoglicanas (GAGs-SC) nos módulos de processamento sensorial de S1 privados de informações sensoriais (vibrissectomia) na atividade cortical, via marcação do gene imediato cFos, e imunomarcação para a neurotrofina BDNF.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Avaliar os efeitos da privação sensorial e da degradação das GAGs-SC na reorganização das PNNs no PMBSF de ratos;

 b. Avaliar os efeitos da privação sensorial e da degradação das GAGs-SC sobre a ativação neuronal, via cFos,no PMBSF de ratos;

c. Avaliar os efeitos da privação sensorial e da degradação das GAGs-SC sobre a imunomarcação de BDNF no PMBSF de ratos;

#### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 18 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) de ambos os sexos, com 40 e 50 dias de vida mais dez dias de sobrevida após o implante de Elvax<sup>®</sup> ® (ver item 3.3), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Todos os procedimentos experimentais, incluindo a manipulação de animais foram realizados em obediência as normas sugeridas pela *Society for Neuroscience, National Institute of Health* (NIH, USA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA: 141-13).

Os motivos principais de escolhermos o rato como modelo experimental são os seguintes: (a) Presença de módulos de processamento sensorial no córtex cerebral isomórficos, o campo de barris, no córtex somestésico primário (S1), com vasta informação disponível na literatura científica acerca da morfologia e fisiologia desses módulos; (b) o PMBSF é um dos principais modelos experimentais estabelecidos para o estudo do desenvolvimento, plasticidade e regeneração do sistema nervoso e, por fim, (c) o rato possui cérebro pequeno e liso, o que facilita os procedimentos histológicos e a análise dos dados obtidos.

## 3.2. PRIVAÇÃO SENSORIAL

Para induzir a privação sensorial, usamos a estratégia de retirada das grandes vibrissas mistaciais de uma das faces (direita) dos animais. Com isso, a informação sensorial que seria capturada pelas vibrissas não será transmitida para o córtex somestésico primário (S1) e comprometerá a formação dos módulos de processamento sensorial (campo de barris no PMBSF) no hemisfério cerebral do lado oposto (esquerdo) às vibrissas retiradas da face dos animais durante o desenvolvimento pós-natal (os primeiros 30 dias de vida).

O lado direito da face do animal privado foi inicialmente submetido à anestesia local com xilocaína e, em seguida, todas as cinco fileiras de vibrissas mistaciais deste lado foram retiradas diariamente durante os primeiros trinta dias de

vida pós-natal (de P0 até P30). Depois desse período as vibrissas destes animais privados continuarão o processo de crescimento normal. E em P40, os animais foram submetidos à cirurgia de implante do Elvax.



Figura 8: **Ilustração do procedimento de privação sensorial dos animais e o implante do Elvax**<sup>®</sup>(**polímero) saturado com ChABC ou BSA.** As vibrissas da face direita serão retiradas desde o dia do nascimento (P0) até a idade de P30, todos os dias, com o auxílio de uma pinça. Após este período, deixaremos as vibrissas crescerem normalmente.

#### 3.3. PREPARAÇÃO E IMPLANTE DO ELVAX E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Para prepararmos o polímero a ser implantado no espaço epidural dos hemisférios cerebrais dos animais experimentais, especificamente acima do PMBSF em S1, uma pequena quantidade de Elvax® foi previamente lavada com álcool comercial (90-95%), durante 24 horas sob agitação suave e constante. Em seguida, 200mg do polímero foram dissolvidos em 2mL de diclorometano (Vetec). Alíquotas de 2mL foram separadas em tubos de vidros (70 X 9 mm) e receberam 30µL de ChABC (50U/ml, Sigma Aldrich®). O volume resultante foi homogeneizado durante 1 minuto e ultracongelado (-80°C). Em seguida, as alíquotas permaneceram em temperatura baixa por tempo suficiente até a evaporação completa do diclorometano. Após isso, o polímero foi congelado e cortado em microfatias de 150 µm com o auxílio de um criostato. Os cortes foram mantidos à -20°C até o momento do implante epidural (Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150264879).

A concentração de ChABC utilizada foi de 1,5U/mL por fatia. Esta estimativa, baseada em cálculos de farmacocinética, é de que uma concentração de 0,6U/mL e deve atingir o tecido nervoso após as primeiras 12 horas de implante epidural a uma concentração semelhante às utilizadas em trabalhos clássicos disponíveis na literatura e que faziam uso de micro-injeções (PIZZORUSSO *et al.*, 2002; PIZZORUSSO *et al.*; SÁ, 2014).

No dia da cirurgia de implante da microfatia de Elvax saturado com ChABC (ou com BSA), os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg). E depois de abolidos os reflexos corneanos e de retirada da pata, os mesmos foram colocados num aparelho estereotáxico (Insight®, EFF-336). Realizamos a craniotomia, com auxílio de uma broca cirúrgica para exposição da região cortical do PMBSF. Uma fatia de 150µm de polímero, saturado com Condroitinase ABC (grupo tratado) ou saturado com BSA (grupo controle), foi posicionada no espaço epidural. Em seguida, a pele foi suturada e os animais recolocados em suas gaiolas de origem.

A entrega de ChABC pelo Elvax vem sendo utilizada no nosso laboratório (SOARES, 2012; CASTRO, 2014) e apresenta vantagens em relação aos outros métodos de entrega de drogas no tecido nervoso (para maiores detalhes ver SÁ.,

2014), pois reduz a possibilidade de danos mecânicos e ainda diminui a possibilidade de resposta inflamatória; a entrega ocorre somente no local de interesse, além de permitir a liberação da enzima de forma lenta e constante por tempo adequado ao tratamento (SÁ, 2014).

#### 3.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram randomicamente divididos em grupos, de acordo com as condições de saturação do Elvax<sup>®</sup> (BSA e ChABC) e tempo de duração do implante (10 ou 20 dias), conforme explicado na Figura 8. Todos os grupos foram avaliados por técnicas histológicas, com o número de animais experimentais descritos na Tabela1.

Os animais privados foram divididos em grupos que receberam implantes epidurais do polímero Elvax® saturado com ChABC, ou com BSA, na idade P40. Estes grupos tiveram 10 (idade **P50**) ou 20 dias (idade **P60**) de sobrevida após o implante do polímero. Os animais do grupo controle não passaram por privação sensorial tampouco receberam o implante epidural do Elvax.

#### 3.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Um dia antes da perfusão, todos os animais passaram no mínimo 12 horas em uma caixa (BOX OFF) que proporcionava blindagem ao som e à luz, portanto nela o animal não recebe estímulos auditivo e/ou visual. No dia seguinte, os animais foram submetidos apenas à estímulos sensoriais nas grandes vibrissas mistaciais da face (direita e esquerda) durante 1 hora, inicialmente com a exposição do animal aos objetos novos de diferentes texturas e tamanhos e, em seguida, manualmente com objetivo de induzir a expressão dos genes imediatos (FILIPKOWSKI, 2000).

Após a perfusão, os encéfalos passaram por pós-fixação em paraformaldeído (PFA, 4%) por 24h antes da microtomia. As secções obtidas foram organizadas em uma sequência correspondente aos procedimentos histológicos, que incluem imunohistoquímica para gene imediato cFos e proteína BDNF; e histoquímica de *Vicia villosa* para marcação de PNNs (Figura 9).
Grupos	Tempo de Sobrevida após o dia do nascimento	Descrição	'N' experimental
Elvax ChABC	P40 (+10)	Animais submetidos ao implante do polímero com <b>ChABC</b>	n=03
	P40(+20)		n=03
Elvax BSA	P40(+10)	Animais submetidos ao implante do	n=03
		polímero sem ChABC, preparado com	
	P40(+20)	BSA	n=03
Sem Cirurgia (controle da cirurgia)	P50	Animais <b>sem implante</b>	n=03
	P60		n=03

Tabela 01. Caracterização dos grupos experimentais. O "n" refere-se ao número amostral.

BSA: Albumina de Soro Bovino; P40 (+10, referente a idade de P50; P40(+20), referente a idade de P60, dias após o nascimento (P0). N=18.



Figura 9: Ilustração do protocolo experimental. Na ilustração observamos o protocolo comum а todos.Os animais em P50 e P60 dias. Após a privação sensorial e o procedimento cirúrgico, todos os animais por estímulos passaram sensoriais por 1hantes da perfusão. Os encéfalos passaram por pósfixação em paraformaldeído (PFA) por 24h antes da Por fim, microtomia. as secções obtidas foram submetidas às imunohistoquímica е histoquímicas na sequência ilustrada.

Fonte das imagens: https://mindthegraph.com/workspa ce/user-creations/65896.

#### 3.6. HISTOLOGIA

#### 3.6.1. PERFUSÃO, CRANIOTOMIA E MICROTOMIA

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridato de cetamina (72 mg/kg, Konig) e cloridrato de xilazina (9 mg/kg, Konig), administrada por via intraperitoneal e perfundidos para fixação do tecido nervoso. Após verificar a ausência de respostas à estimulação dolorosa, foi realizada uma ampla abertura torácica, com obliteração da artéria aorta descendente. As perfusões foram iniciadas com uma injeção intraventricular (ventrículo esquerda) de 0,10ml de anticoagulante (Heparina Sódica, Ariston) seguida de perfusão transcardíaca com 200ml de tampão fosfato (0,1M) e salina 0,9% (PBS) pH 7,2, e 200ml de paraformaldeído 4% (PFA, Sigma).

Após a perfusão, os encéfalos foram retirados das caixas cranianas e submersos em solução de pós-fixação contendo PFA, por 24 horas. Depois deste tempo, os encéfalos (n=3 por grupo experimental) foram seccionados coronalmente a 50 $\mu$ m de espessura com o auxílio de um vibrátomo (Leica/modelo HM–505–EGermany) e todos os cortes foram recolhidos em solução de tampão fosfato a 0,1M e pH 7,2 – 7,4.

#### 3.6.2. PROCEDIMENTOS HISTOQUÍMICOS

3.6.2.1. A histoquímica para a lecitina Vicia villosa

Para marcação das redes perineuronais (PNN), realizamos a histoquímica para a lectina *Vicia villosa* biotinilada (Sigma-Aldrich). As secções foram incubadas numa solução contendo 0,5% de *Vicia villosa* biotinilada (Sigma), 4% de Triton X-100 (Sigma) diluídos em PBS, overnight, em temperatura ambiente (21-23°C) e sob agitação constante. Após isso, os cortes foram lavados em nova solução de PBS, por duas vezes de vinte minutos cada. Em seguida, as secções foram deixadas sob agitação suave constante sob temperatura ambiente (21-23°C) numa solução contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (complexo ABC, Vector) e Triton X-100 (Sigma) a 4% diluídos em tampão fosfato por no mínimo 8 horas. Em seguida, 37 houve nova lavagem em PBS e a peroxidase foi reagida utilizando-se o método

da glicose oxidase-diaminobenzidina-níquel (GND) (Shu *et al.*, 1988), adaptado para a histoquímica da *Vicia villosa*.

#### 3.6.2.2. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA BDNF e cFOS

Esta imunomarcação nos permite avaliar a distribuição espacial e temporal destas moléculas no tecido nervoso submetido ao nosso modelo experimental.

As secções cortadas em plano coronal foram lavadas duas vezes em PBS, por 5 minutos cada vez, e imersas em solução peróxido de hidrogênio (Merck®) a 3% em tampão fosfato 0,1M (PB 0,1M), inibindo desta forma a peroxidase endógena das células do tecido analisado. A partir daí, as secções foram novamente lavadas em PB 0,1M e, em seguida, incubadas em uma solução diluente (soro normal correspondente à reação de cada anticorpo a 10%, BSA a 10% e Triton x-100 a 3%) para os anticorpos primários (anti-BDNF, Santa Cruz Biotechnology Inc.; anti-cfos, Merck Millipore) durante uma noite, de acordo com a diluição previamente mencionada (ver Tabela 02).

No dia seguinte, as secções foram novamente lavadas (PB 0,1M) e incubadas em anticorpo secundário biotinilado por 2 horas (correspondente à origem de cada anticorpo primário utilizado). Após nova lavagem, foram incubadas em ABC (complexo avidina-biotina – Vector®, kit ABC Vectastain) por 1 hora. Em seguida, nova lavagem e reação para a peroxidase do complexo ABC. O cromógeno utilizado foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma-Aldrich). Na sequência, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas.

ANTICORPO	MARCAÇÃO	DILUIÇÃO
Anti-BDNF	BDNF ( <i>brain-derived neurotrophic fator–</i> fator neurotrófico derivado do cérebro)	1:200
Anti-cFos	Imunomarcação para o gene imediato cFos	1:6000

### Tabela 02: Anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica

## 3.6.2.3 LAVAGEM, DESIDRATAÇÃO E MONTAGEM

Após as reações histoquímicas e imunonohistoquímicas, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, secadas em temperatura ambiente durante oito horas e desidratadas em bateria de álcool com concentração de 70%, 80%, 90% e a 100% e clareadas em xileno. Em seguida, as secções foram cobertas com lamínula com o auxílio de um meio de inclusão (Entellan, Merk).

## 3.7. MÉTODO DE CONTAGEM DE CÉLULAS

O número de células Vicia villosa positivas (Vv positivas: imaturas, maduras e total – Figura 11) e cFos positivas (cFos+) na área cortical cerebral, correspondente área PMBSF.foram à do contadas no sistema stereo investigator (Stereologer2000®). Para estimativa de células Vv positivas, 20 caixas de contagem com área 2500 µm2, foram analisadas para cada área de interesse (PMBSF) em cada hemisfério cerebral (esquerdo = privado; direito = não privado). Para estimativa de células cFos positivas, 10 caixas de contagem com área 1500 µm2 foram analisadas, como descritas anteriormente, e as camadas cortical cerebral foram divididas em camadas supragranulares (camadas I, II/II); camada granular (IV); e camadas infragranulares (V/VI). Esta análise também foi realizada em ambos os hemisférios cerebrais (esquerdo/privado e direito/não privado).

O contorno das áreas analisadas foi realizado com lente objetiva de 2X e a contagem das células foi realizada com lente objetiva de 20X. A espessura do tecido

para a análise estereológica foi de 50µm. Dessa forma, o programa delimita a área de contagem com linhas vermelhas e verdes (Figura 9), sendo que a linha vermelha delimitava a área de exclusão e as linhas verdes, a área de inclusão. O coeficiente de erro foi, em média, similar entre as contagens.



**Figura 10: Ilustrações do método de contagem de células (esterologia).** A: delimitação da área de contagem pelos pontos verdes. Imagem usando-se a lente objetiva de 2x, escala de 2mm. B:Caixa de contagem de células. Linhas verdes consideradas como inclusão e, em vermelho, linhas de exclusão. Imagem usando-se a lente objetiva 20x escala 0,5mm;



**Figura 11: Fotomicrografias da marcação da histoquímica para lecitina** *Vicia villosa.* Identificação das células Vv positivas maduras (A), demonstradas com as setas; e células Vv positivas imaturas (B), algumas delas apontadas com as cabeças de setas.Escala:25µm.

## 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez que os dados se apresentaram paramétricos, a análise estatística realizada foi análise de variância de uma via (ANOVA one-way) e pós-teste de correção de Tukey. Quando aplicável, utilizamos ANOVA duas vias (two-way). Para dados não paramétricos, como em alguns casos, a análise de variância foi obtida pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância utilizada foi de p<0,05. A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas com auxílio do programa GraphPad (Prism 5.0).

#### 4. **RESULTADOS**

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da privação sensorial e da degradação das redes perineuronais sobre a atividade neuronal e uma importante proteína relacionada à neuroplasticidade (BDNF). Utilizamos o modelo experimental de privação sensorial por vibrissectomia, desde o primeiro dia de nascimento (P0) até o fim do período crítico de plasticidade (P30) para privação sensorial em S1 de pequenos roedores.

Para isto, utilizamos dois grupos experimentais: o primeiro deles composto por animais na idade de P50 (10 dias após o implante de Elvax) e o outro com animais na idade de P60 (20 dias após o implante de Elvax). Em ambos os casos incluem: animais privados ChABC (animais que foram privados e receberam implante de Elvax com ChABC); animais privados BSA (animais que foram privados e receberam implante de Elvax com BSA); e ainda, animais sem privação (animais controle, sem privação sensorial e sem implante de Elvax).

A delimitação experimental do presente trabalho apresenta ainda a necessidade de uso de técnicas de biologia molecular, necessárias para avaliação de expressão de proteínas estruturais de botões sinápticos e proteínas relacionadas à liberação do conteúdo neuroquímico das vesículas sinápticas para que se possa fazer correlações com os nossos resultados de privação sensorial e remoção de redes perineuronais, além da marcação do gene imediato cFos e da proteína BDNF.

#### 4.1. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS Vicia villosa POSITIVAS NO PMBSF

Para observar de que forma as redes perineuronais se comportam sobre influência da privação sensorial e da degradação das GAGs-SC, realizamos a técnica histoquímica de *Vicia villosa*, uma lecitina cuja marcação específica envolve a porção N-galactosamina das GAGs-SC (CELIO and BLÜMCKE, 1994).

Desta forma, verificamos se o número total de células Vv positivas alterava sob as nossas condições experimentais. Observamos que os grupos animais sem privação sensorial (265.7±57.31) (287.3±65.90), privados com implante de elvax com BSA (318.3±91.91) (298.5±17.18) e privados com implante de elvax com ChABC (319.0±109.6) (241.7±49.70) em P50 (Figura 12B) e em P60, respectivamente (Figuras 13B). Tanto em P50 (p=0.4383) quanto em P60 (F=1.808; p=0.2028) não observamos diferença significativa entre os grupos.

No entanto, quando classificamos as células Vv positivas entre maduras e imaturas, a diferença foi estatisticamente significativa. De fato, em P50, o número de células Vv positivas imaturas nos animais privados (BSA e ChABC) é estatisticamente maior em relação aos animais sem privação sensorial (F<sub>(2,6)</sub>=93.3; p< 0.0001) (Figura14A), e o número de células Vv positivas maduras também reduz nestas mesmas condições experimentais, indicando que a privação sensorial e a degradação das GAGs-SC induziram alteração nas redes perineuronais do PMBSF.

Já em P60, a diferença entre as PNNs imaturas e maduras continuam nos grupos privados ( $F_{(1,6)}$ =156; P<0.0001), mas claramente essa relação parece menor (Figura14B). Este resultado sugere que 20 dias após o fim do período crítico de S1, os animais privados retornam à condição controle ainda que haja grande diferença na qualidade das PNNs presentes no PMBSF.

Os dados de média e desvio padrão de cada grupo estão apresentados nas tabelas em anexo.

ChABC

ВŚА

**(B)** 



Figura 12: Efeito da privação sensorial e degradação das GAGs-SC sobre as PNNs no PMBSF de ratos, em P50. (A) Fotomicrografias das PNNs marcadas com a lecitina Vicia villosa, em aumentos de 100 e 200x, emanimais sem privação sensorial, privados BSA e privados ChABC, respectivamente. (B) Número de células totais quantificadas no PMBSF destes mesmos grupos em P50. Não houve diferença significativa entre os grupos (p=0.4383), análise de variância por teste de Kruskal-Wallis.



Figura 13: Efeito da privação sensorial e degradação das GAGs-SC sobre as PNNs no PMBSF de ratos, em P60. (A) Fotomicrografias das PNNs marcadas com a lecitina *Vicia villosa*, em aumentos de 100 e 200x, de animais sem privação, privados BSA e privados ChABC, respectivamente. (B) Número de células totais quantificadas no PMBSF destes mesmos grupos em P60. Não houve diferença significativa entre os grupos (p= 0.2028). Análise estatística com ANOVA one-way e pós-teste de Tukey.



Figura 14: Quantificação de PNNs maduras e imaturas dos grupos experimentais nas diferentes sobrevidas (10 ou 20 após o implante). (A) Células Vv positivas maduras e imaturas P50, com diferença entre os grupos (\*\*p=0.0078) e os tipos de células (\*\*\*\*p<0.0001). (B) Células Vv positivas maduras e imaturas nos grupos P60, com diferença apenas entre as células (\*\*\*\*p<0.0001). Número de células totais quantificadas no PMBSF destes mesmos grupos em P60. Valores expressos em média e desvio padrão, ANOVA two-way.

Analisamos também os hemisférios cerebrais privado (HE) e o não privado (HD) destes animais e verificamos que não houve diferença estatística em relação aos animais sem privação: no HD em P50 (p=0.8286) e P60 (p=0.1643); e no HE em P50 (p=0.6286) e em P60 (p=0.8357) (Figura15).



Figura 15: Quantificação de PNNs nos hemisférios cerebrais HD (não privado) e HE (privado) dos grupos experimentais. (A) representando o número de células VV positivas no HE em P50 e (A') em P60. Não houve diferença entre os grupos em P50 (p=0.6286) e em P60 (p=0.8747). (B) representando o número de células Vv positivas no HD em P50 e (B') em P60. Tampouco houve diferença estatística no HD em P50 (p=0.8286) ou P60 (p=0.1704). Análise de variância por teste de Kruskal-Wallis para o grupo P50 e, ANOVA one-way e pós-teste de Tukey para o grupo P60.

4.2. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS cFOS POSITIVAS PRESENTES NO PMBSF

Para acompanhar a atividade neuronal dependente de estímulo, realizamos a imunohistoquímica e quantificação de células imunomarcadas para o gene imediato cFos, já bastante utilizadas em outros estudos com o mesmo propósito (MACK and MACK, 1992; STEINER and GERFEN, 1994; KACZMAREK and CHAUDHURI, 1997; FILIPKOWSKI, 2000; KALISZEWSKA *et al.*, 2012; KALISZEWSKA e KOSSUT, 2015).

Nos animais em P50 (P40+10 dias após o implante), observamos um aumento significativo de células cFos positivas apenas do grupo ChABC em relação ao grupo sem privação (F=13.89; p=0.0006) (Figura 16B). Mas não houve diferença estatística entre os grupos P60 (P40+20 dias após o implante; F=1.074; p=0.3700; ver Figura 17B), indicando que a degradação das GAGs-SC foi necessária para induzir aumento de células cFos positivas no PMBSF de hemisfério cerebral privado.

Para saber se esse aumento na marcação de células cFos positivas era diferenciado entre as camadas corticais cerebrais, fizemos contagem de células nas camadas II/II (supragranulares, SUPRA), IV (granular, GRAN) e V/VI (infragranulares, INFRA). Desta forma, em P50 os animais privados ChABC notoriamente apresentaram um aumento de células cFos positivas especialmente nas camadas GRA (p=< 0.0001) e INFRA (p=< 0.0001) do PMBSF, em relação aos hemisférios cerebrais sem privação (Figura 18).



Figura 16: Efeito da privação sensorial e degradação das GAGs-SC sobre a imunomarcação de cFos no PMBSF de ratos, em P50. Em (A) fotomicrografias da imunomarcação de cFos realizada no PMBSF de animais sem privação, privados BSA e privados ChABC em P50. (B) Quantificação de células cFos positivas imunomarcadas nos animais experimentais. Diferença estatística entre ChABC e sem privação (\*\*\*p=0.0006), ANOVA one-way com pós-teste de Tukey.



Figura 17: Efeito da privação sensorial e degradação das GAGs-SC sobre a imunomarcação de cFos no PMBSF de ratos, em P60. (A) Fotomicrografias da imunomarcação de cFos realizada no PMBSF de animais sem privação, privados BSA e privados ChABC em P60. (B) Quantificação de células cFos positivas imunomarcadas nos animais experimentais. Não houve diferença estatística entre os grupos nessa sobrevida (p= 0.3700), ANOVA one-way com pós-teste de Tukey.



Figura 18: Efeito da privação sensorial e degradação das GAGs-SC sobre a imunomarcação de cFos camadas corticais do PMBSF, em P50 e P60. (A) Quantificação de células cFos positivas nas camadas supragranulares (I; II/III) dos grupos experimentais apresentou significativa diferença entre os grupos (\*\*\*p=0.0005) e sobrevida (\*\*p=0.0012). (B) Quantificação de células cFos positivas na camada granular (IV) dos grupos experimentais apresentou significativa diferença entre os grupos (\*\*\*p< 0.0001) e entre as sobrevidas (\*\*\*p< 0.0001). (C) Quantificação de células cFos positivas nas camadas infragranulares (V/VI) dos grupos experimentais apresentou significativa diferenção de células cFos positivas nas camadas infragranulares (V/VI) dos grupos experimentais apresentou significativa diferenção de células cFos positivas nas camadas infragranulares (V/VI) dos grupos experimentais apresentou significativa diferenção de células cFos positivas nas camadas infragranulares (V/VI) dos grupos experimentais apresentou significativa diferenção de células cFos positivas nas camadas infragranulares (V/VI) dos grupos experimentais apresentou significativa diferenção entre os grupos (\*\*\*p=0.0006) e entre as sobrevidas (\*\*\*p= 0.0008). Análise estatística com ANOVA two-way.

Em geral, os hemisférios cerebrais dos animais privados submetidos à degradação das PNNs pela ChABC apresentaram redução no número de células cFos positivas em P60 quando comparados aos seus pares em P50. A diferença entre os animais privados em P50 e em P60 apenas aparece na camada GRA (Figura 18B), nas demais permanece igual aos animais sem privação (Figura 18A e 18C). Estes dados indicam que a atividade neuronal presente no PMBSF é alterada com 10 dias após o início da ação da enzima ChABC (P50) e, permanecem alteradas em P60, ou seja, mesmo 30 dias depois do período crítico de S1.



Figura 19: Quantificação de células cFos positivas nas camadas corticais do PMBSF de animais privados e não privados. Na sequência observamos a diferença estatística entre as camadas em P50 (\*\*\*\*p< 0.0001) e P60 (p< 0.0001) nos animais sem privação; animais privados BSA em P50 (\*\*\*\*p< 0.0001) e em P60 (\*p=0.0209); e animais privados ChABC em P50 (\*\*\*\*p< 0.0001) e P60 (\*\*p=0.0011). Nos animais sem privação, a análise estatística foi realizada com teste de Kruskal-Wallis. Nos demais, ANOVA one-way, pósteste de Tukey.

Em relação às camadas corticais cerebrais dentro de um mesmo grupo, apenas os animais privados das informações táteis provindas das grandes vibrissas mistaciais da face direita demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os hemisférios cerebrais privados (HE) e não privado (HD). A camada granular (IV) sempre apresenta maior número de células imunomarcadas para cFos em relação as demais camadas, principalmente nos animais privados (Figura19).

Procuramos saber ainda se o número de células imunomarcadas para cFos de cada hemisfério cerebral do PMBSF variava entre as sobrevidas (Figura 20). Em P50 os animais ChABC apresentam aumento significativo de células cFos positivas no HE, em relação aos animais sem privação (F=13.40; p=0.0061), mas no HD não houve diferença (F=3.543; p=0.1101) (Figura 20A e 20A'). Já em P60, não houve diferença estatística entre os grupos no HE (F=0.2963; p=0.7558), tampouco no HD (F=0.8370; p=0.4858) (Figura 20B e 20B').



Figura 20: Quantificação de células cFos positivas nos HD e HE dos grupos experimentais. (A) representando o número de células cFos positivas no HE em P50 e (A') em P60. Diferença entre ChABC e sem privação apenas em P50 (p= 0.0061). (B) representando o número de células cFos positivas no HD em P50 e (B') em P60. Não houve diferença estatística no HD em P50 (p= 0.1101) ou P60 (p=0.4858). Análise de variância ANOVA one-way, pós-teste de Tukey.

## 4.3. ANÁLISE QUALITATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO PARA BDNF

Aliada aos outros resultados acima descritos, nosso interesse também era saber se a privação sensorial e a degradação das GAGs-SC alterariam a marcação para a proteína BDNF no PMBSF do hemisfério cerebral privado de informações provindas das grandes vibrissas mistaciais da face direita.

Para tal, realizamos a imunomarcação em todos os grupos experimentais do presente estudo. Na Figura 21, as fotomicrografias de secção coronal do encéfalo correspondente ao PMBSF de animais sem privação, animais privados + BSA e animais privados + ChABC em P50 (P40+10 dias) e P60 (P40+20 dias), respectivamente.

No PMBSF dos animais P50, observamos concentração de células BDNF positivas nas camadas supragranulares, mais evidente nos animais submetidos à degradação das PNNs pela enzima ChABC. Isto também foi observado nos animais que sofreram privação sensorial e submetidos à degradação das PNNs pela enzima ChABC em P60. A imunomarcação para BDNF no tecido nervoso dos hemisférios não privados (HD) foi semelhante em todos os grupos experimentais. Este resultado nos sugere que a degradação das GAGs-SC induziu o aumento de BDNF no tecido nervoso da área cortical cerebral privada de informações sensoriais, tanto em P50 quanto em P60, mesmo após o fim do período crítico de plasticidade.



Figura 21: Efeito da privação sensorial e degradação das GAGs-SC sobre imunomarcação de BDNF no PMBSF de ratos. Fotomicrografias de imunomarcação de BDNF nos animais do grupo P50 e P60, respectivamente. Escala: 100µm.

### 5. DISCUSSÃO

Neste estudo buscamos investigar de que forma a privação de uma modalidade sensorial aliada à degradação das GAGs-SC na mesma área cortical cerebral, alteram e/ou ativam neurônios através da marcação do gene imediato cFos assim como a resposta na marcação da proteína relacionada a plasticidade, o BDNF. Para tal realizamos a privação sensorial tátil unilateral, retirando todas as vibrissas mistaciais da face direita dos animais desde o dia do nascimento (P0) até o fim do período crítico de plasticidade de S1 (P30). Em P40 fizemos o implante de Elvax nos animais privados que permaneceram com o implante por 10 dias (grupo P50) e 20 dias (grupo P60).

Além da resposta cortical cerebral de S1, em termos de imunomarcação de cFos e da proteína BDNF, também avaliamos a dinâmica temporal da degradação das GAGs-SC das redes perineuronais (PNNs) e ressurgimento dessas estruturas da matriz extracelular sob as mesmas condições experimentais.

A limitação técnica do presente trabalho foi não realizarmos o registro eletrofisiológico da área cortical cerebral privada da atividade elétrica, via privação sensorial advinda da periferia sensorial como consequência de sua remoção durante todo o período crítico de plasticidade. A atividade dos neurônios da área cortical cerebral foi realizada indiretamente, via marcação do gene imediato cFos, já amplamente utilizado e relatado na literatura científica. Outra limitação técnica foi a não realização de experimentos de biologia molecular para avaliar a expressão da proteína relacionada à neuroplasticidade BDNF, que foi realizada apenas com marcação tecidual.

# 5.1. ALTERAÇÃO NO PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE INDUZIDO PELA PRIVAÇÃO SENSORIAL E DEGRADAÇÃO DAS GAGS-SC

Inúmeros estudos mostram o sucesso da degradação das GAGs-SC, pela ChABC, em restaurar memória (YANG *et al.*, 2015) e lesões corticais ou na medula espinhal (MOON *et al.*, 2001; BRADBURY *et al.*, 2002; SOLEMAN *et al.*, 2012). Desta forma, postulamos que esta mesma estratégia seria capaz de restaurar a resposta cortical cerebral de uma área sensorial privada de estímulos ambientais, já

que a estrutura sensorial periférica (no nosso modelo, as vibrissas mistaciais) de um lado se manteve intacta e a do lado privado, mesmo sendo retirada durante todo o período crítico de plasticidade, cresceu novamente em condições de captar estímulos táteis do ambiente.

Para tal, avaliamos inicialmente a dinâmica de degradação das redes perineuronais (PNNs), que são estruturas importantes para o fechamento do período crítico de plasticidade das diferentes áreas cortical cerebral. Utilizamos como marcador a *Vicia villosa*, que similar a Wisteria floribunda (WFA), são lecitinas capazes de reconhecer as glicosaminoglicanas (GAGs) mais abundantes da matriz extracelular do tecido nervoso, as GAGs de sulfato de condroitina (GAGs-SC) (VENSTROM and REICHARDT, 1993; YAMAGUCHI, 2000).

Já se tem observado que o aumento da produção e sulfatação dessas GAGs limitam a plasticidade cortical cerebral, porque se acumulam ao redor de células, especialmente as que expressam receptor Kiv37 (interneurônios parvalbumina), e compõem as PNNs. Por isso, a expressão destas PNNs se correlaciona com o final do período crítico já que formam uma barreira física e inibitória a formação de novas sinapses (FAWCETT and ASHER, 1999; PIZZORUSSO *et al.*, 2002; LAABS, 2005; YIU and HE, 2006).

Sendo assim, perturbações no desenvolvimento cortical cerebral podem alterar o curso de produção, composição e sulfatação das GAGs dos PGSC, influenciando na densidade e maturação das PNNs (MICHEVA and BEAULIEU, 1995; KÖPPE *et al.*, 1997; MCRAE *et al.*, 2007; BAHIA *et al.*, 2008; NAKAMURA *et al.*, 2009). Bahia *et al.* (2008) demonstraram que a privação sensorial, por cauterização das vibrissas, reduziu a densidade das PNNs no PMBSF de ratos. Nossos resultados seguem esse raciocínio já que observamos uma redução de células PNN positivas maduras e um aumento das imaturas no PMBSF de animais privados (Figura 14A).

Interessante ressaltar que no presente trabalho, o método de privação sensorial adotado preserva os folículos pilosos possibilitando que as vibrissas cresçam novamente e desempenhem suas funções de captar informações do ambiente adequadamente. Sendo assim, tanto a via lemniscal quanto a via paralemniscal voltam a mandar impulsos elétricos para esta área cortical cerebral durante e após a degradação das GAGs.

Um estudo envolvendo privação monocular também relata a redução da densidade das PNNs e o expõe como indicativo de restaurador da plasticidade do córtex visual (MATAGA *et al.*, 2004), fornecendo um ambiente permissivo à reorganização de circuitos corticais (SALE *et al.*, 2007). Porque uma vez que as PNNs consolidam sinapses com amadurecimento dos interneurônios e dos circuitos inibitórios, sua degradação ou redução de densidade favorecem a redução da inibição cortical e, portanto, a plasticidade local. Inúmeros estudos afirmam que a redução da inibição GABAérgica, mesmo que pequena, é suficiente e favorável à plasticidade (SADAKA *et al.*, 2003; BARONCELLI *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2013; UENO *et al.*, 2015).

Logo, é provável que a privação sensorial por vibrissectomia neste estudo tenha favorecido a restauração ou prolongamento do período crítico de plasticidade do PMBSF de ratos, 20 dias após o fim do período crítico (P50), assim como nos animais privados e submetidos à remoção das GAGs das PNNs via enzima ChABC. No entanto, a degradação das GAGs-SC nestes animais privados não foi suficientemente capaz de manter aberto este período crítico, porque nos animais do grupo P60 o número de células Vv positivas imaturas se mantiveram estatisticamente iguais aos animais sem privação (Figura 14B), embora a relação entre PNNs imaturas e PNNs maduras ainda estivesse presente.

Já está estabelecido na literatura que uma simples injeção de ChABC, na área nigroestriatal de ratos adultos, pode produzir alterações por mais de 10 dias (LIN *et al.*, 2008) e, como não observamos mais diferença estatística entre o perfil de PNNs encontradas nos animais do grupo P60 e animais sem privação, então sugerimos que no nosso modelo envolvendo polímero de Elvax, as alterações avaliadas acerca das PNNs não ultrapassam 20 dias após o implante (Figura13B e Figura 14B). Uma hipótese que justifica esses dados é a de que as GAGs-SC já tenham se reestruturado após o fim da ação enzimática na matriz extracelular.

Em nosso laboratório de pesquisa demonstramos que a enzima pode ser liberada por pelo menos 10 dias neste mesmo modelo experimental (SÁ, 2014), então podemos assumir que em P60 (20 dias após o implante do polímero com ChABC), as GAGs que formam as PNNs já estejam sendo restabelecidas na matriz extracelular do tecido nervoso alvo. Outros estudos no nosso laboratório já estão avaliando esta dinâmica das GAGs.

Além disso, apesar de não demonstrar diferença estatística, qualitativamente observamos uma tendência ao aumento no número de células Vv positivas em ambos os hemisférios cerebrais dos animais privados em P50, mas que se igualam às condições experimentais controle em P60, indicando que alterações provocadas pela degradação das GAGs-SC no hemisfério privado podem afetar o hemisfério oposto (Figura 15).

# 5.2. ALTERAÇÃO DA MARCAÇÃO DE cFos NO PMBSF APÓS PRIVAÇÃO SENSORIAL DAS VIBRISSAS MISTACIAIS

Alguns genes imediatos (p. ex. zif, cFos, arc, dentre outros) vêm sendo largamente estudados nos últimos anos em diferentes condições experimentais, pois sua expressão reflete a imediata atividade de um neurônio a um determinado estímulo, sejam eles estímulos sensoriais ou motores (MACK and MACK, 1992; STEINER and GERFEN, 1994; KACZMAREK and CHAUDHURI, 1997; FILIPKOWSKI, 2000). O produto desses genes permite ativação de vias intracelulares, como expressão de proteínas de fase tardia, capazes de responder ao estímulo recebido e modificar a estrutura sináptica dos neurônios envolvidos (LOEBRICH and NEDIVI, 2009; WEST and GREENBERG, 2011).

Filipkowski *et al.* (2000) apresentaram dois modelos de estímulos sensoriais, um mecânico e outro em que o animal era exposto a um novo ambiente com diferentes objetos para atividade exploratória. Ambas as condições experimentais foram capazes de induzir a expressão protéica de cFos nas camadas corticais cerebrais do PMBSF de S1 de ratos. Outro recente trabalho também aponta o gene do citoesqueleto regulado por atividade (arc ou arg 3.1) como estímulo dependente, uma vez que tanto a estimulação manual quanto a exposição do animal ao ambiente enriquecido foram capazes de induzir sua expressão no subcampo de barris em S1 (KHODADAD *et al.*, 2015).

Em trabalhos envolvendo privação sensorial tem-se observado aumento de células positivas para cFos no hemisfério privado em praticamente todas as camadas corticais, embora mais significativamente na camada granular (IV) (KALISZEWSKA *et al.*, 2012; KALISZEWSKA E KOSSUT, 2015). No entanto, nossos dados mais significativos são a respeito da degradação das GAGs-SC e não

apenas da privação sensorial. Mostramos que a degradação das GAGs-SC que compõem as PNNs na matriz extracelular induziu o aumento no número de células cFos positivas total no PMBSF de animais privados e submetidos a ação da enzima ChABC nos animais do grupo P50 (Figura 16). Mais ainda, este aumento se mostrou evidente nas camadas granular e infragranulares destes animais nas condições experimentais do grupo P50 (Figura 18B e 18C). Birkbaev *et al.* (2015) também mostrou que a degradação da MEC pela hialuronidase aumentou a atividade neuronal em células hipocampais in vitro (BIKBAEV *et al.*, 2015), o que nos comprova a relação entre MEC e atividade neuronal.

Em geral, nestes animais privados ChABC do grupo P60 observamos redução da atividade neuronal dos animais privados, via marcação de cFos, em relação aos animais sem privação, de tal modo que entre eles não aparece diferença significativa (Figura 17B). No entanto, o aumento da atividade neuronal na camada granular permanece em P60 (Figura 18B).

De fato, a remoção dos componentes das PNNs gera pelo menos duas consequências para área submetida a nossa estratégia experimental: 1) influência direta na atividade dos interneurônios e na regulação da inibição dos circuitos locais (DZYUBENKO *et al.*, 2016), já que as PNNs normalmente funcionam como buffer de cátions, mantendo estes íons próximos à membrana plasmática de interneurônios e facilitando seus rápidos disparos de potencial de ação; 2) uma vez que as PNNs restringem a motilidade de receptores glutamatérgicos e funcionam como barreira a formação de novas sinapses, a remoção de seus componentes permite o aumento da motilidade destes receptores, aumentando a excitabilidade e geração de potenciais de ação nos interneurônios locais e, ainda, a sinaptogênese (DITYATEV *et al.*, 2007; DZYUBENKO *et al.*, 2016).

Em outras palavras, a degradação das GAGs-SC reduz a inibição cortical e permite o aumento da atividade das células presentes no PMBSF, como observado na marcação das células cFos positivas da camada granular dos nossos animais experimentais que foram submetidos a degradação das GAGs, mesmo 20 dias após o implante do elvax saturado com a enzima ChABC (ver Figura 18).

O resultado de aumento de marcação para a proteína BDNF, descrito neste trabalho, também corrobora com os achados de marcação para o gene imediato cFos. O BDNF maduro age em receptores tirosina cinase do tipo B (TrKB) podendo atuar em canais de potássio (Kiv37), canais de cálcio (NMDAr e AMPAr) e ainda

afetar os canais de sódio, aumentando a atividade neuronal local (WOJTOWICZ *et al.*, 2015). Isto ocorre também com a liberação da metalopreoteinase-9 (MMP-9), o que pode regular as correntes em canais iônicos ativados pelos receptores do tipo NMDA, porque aumentam sua mobilidade lateral e, por sua vez, influenciam na atividade neuronal (MICHALUK *et al.*, 2009).

O aumento de íons cálcio produzido pela atividade de BDNF no seu receptor também eleva a ativação transcricional através da marcação de cFos (KELLNER *et al.*, 2014). O aumento da imunomarcação de cFos na camada granular dos animais submetidos a privação neste trabalho, justifica-se não somente pela diminuição da inibição cortical (MA *et al.*, 2013), mas também podem estar relacionados ao enfraquecimento das sinapses inibitórias (mIPSC) presentes nesta camada (GAINEY *et al.*, 2016), o que pode favorecer a plasticidade e recrutamento de sinapses "silenciosas" ou multisensoriais, como acontece nas camadas supragranulares no córtex visual privado (LEE and WHITT, 2015). A razão pela qual isso não acontece nas camadas supragranulares neste estudo ainda não está claro.

Outra explicação possível seria o aumento de inputs sinápticos excitatórios para camada IV, de modo que as aferências sensoriais que chegam ao hemisfério intacto (HD) indiretamente ativa o hemisfério privado (HE) via corpo caloso (GHOSHAL *et al.*, 2014), o que justifica as alterações encontradas em nosso estudo, em que o hemisfério cerebral privado (HE) apresenta quantidades maiores de células cFos positivas em relação aos animais sem privação (ver Figura 20A), além de observarmos a mesma tendência no hemisfério cerebral não privado (HD) apesar de não aparecer diferença estatística (Figura 20B).

# 5.3. BDNF SOB INFLUÊNCIA DA PRIVAÇÃO SENSORIAL E DEGRADAÇÃO DAS GAGs-SC

O fator neurotrófico derivado do cerébro (BDNF do acrônimo inglês Brain Derived Neurotrofic Factor) é uma neurotrofina importante para sobrevivência e morfogênese neuronal (HANOVER *et al.*, 1999) e tem sido relatada em várias neuropatologias como, por exemplo, a redução da sua expressão em casos de desordem bipolar, esquizofrenia e depressão, bem como Doença de Parkison, Alzheimer e Doença de Huntington (NUMAKAWA *et al.*, 2010). Além disso, está

claro que o BDNF possui papel importante na plasticidade neuronal, pois alguns trabalhos mostram que durante o desenvolvimento do SNC há aumento da sua expressão no tecido nervoso, relacionado tanto com maturação do sistema inibitório quanto com a manutenção de espinhas dendríticas (KARPOVA, 2014; KELLNER *et al.*, 2014). A sua super expressão também está implicado no início e término precoce do período crítico de plasticidade (HANOVER *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 1999; PATZ, 2004).

Vários estudos relatam a redução da expressão de BDNF diante de modelos de privação monocular em animais neonatos (SEKI *et al.*, 2003) e animais jovens (BRACKEN and TURRIGIANO, 2009). Nossos resultados já nos mostram que a remoção das vibrissas mistaciais provocou o aumento de células BDNF positivas no PMBSF de animais privados (Figura 21).

Nos animais do grupo P60, apenas os animais submetidos à ação da enzima ChABC continuam a apresentar intensidade considerável de células BDNF positivas (Figura 21). Isto nos sugere, descrevendo pela primeira vez na literatura científica, que as PNNs e a degradação das GAGs-SC de alguma forma influenciam na expressão desta neurotrofina.

Em geral, privação de estímulos sensoriais (WATANABE *et al.*, 2012; UENO *et al.*, 2015) e a degradação das GAGs-SC pela ChABC (YAMADA *et al.*, 2015) reduzem a expressão de parvalbumina e ambos eventos alteram a regulação da inibição cortical. Desta forma, é necessário que se recupere o equilíbrio da relação excitação/inibição da área cortical cerebral afetada pela privação de atividade elétrica provinda da periferia sensorial para promover o aumento (ou fortalecimento) dos circuitos inibitórios, cujo principal atuante neste processo é o próprio BDNF. Outra via de atuação importante é através do receptor tirosina cinase do tipo (TrkB) e promovendo o aumento ou fortalecimento dos circuitos inibitórios, cujo principal atuante neste processo é o próprio BDNF. Através do receptor tirosina cinase do tipo (TrkB) e ativação de vias intracelulares específicas, o BDNF é capaz de induzir a expressão de genes imediatos (KUZNIEWSKA *et al.*, 2013) e parvalbumina (PATZ, 2004).

A parvalbumina (PV) (HANOVER *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 1999; PATZ, 2004) é uma importante proteína quelante de cálcio presente nos interneurônios envolvidos por PNNs e responsáveis também pelo amadurecimento de circuitos 61 inibitórios, regulando o período crítico de plasticidade (CHEVALEYRE and

PISKOROWSKI, 2014). Sabendo que o BDNF tem influencia na expressão de PV, é possível que o aumento de BDNF observado nos nossos resultados sejam uma tentativa de restaurar o balanço excitação-inibição alterados pela privação sensorial e degradação das GAGs-SC, atuando na recuperação da resposta cortical cerebral (KANEKO *et al.*, 2012), que nos animais ChABC se observa mais tardiamente (em P60).

Outra hipótese para justificar o aumento de BDNF, baseia-se no aumento da atividade neuronal observado com as células cFos positivas nos animais privados, uma vez que estas células ativadas são capazes de liberar proteases, como tpA e MMPs, responsáveis por clivar o proBDNF no meio extracelular ou mesmo clivar o proBDNF no meio intracelular, aumentando a disponibilidade de BDNF maduro e ativo na área (WOJTOWICZ *et al.*, 2015).

A concentração de células BDNF positivas nas camadas supragranulares e substância branca (corpo caloso) observadas nas fotomicrografias ainda precisam ser elucidas.

## 6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste estudo, pela primeira vez, demonstramos uma relação entre redes perineuronais (PNNs), atividade neuronal observada através da imunomarcação de cFos e expressão da proteína BDNF.

A privação sensorial por vibrissectomia, durante todo o período crítico de plasticidade de S1, foi capaz de promover alterações nas PNNs, com aumento inicial de PNNs imaturas no PMBSF privado, apesar de não comprometer o número total de células cFos. Com 30 dias após o fim período crítico de plasticidade (P60), as alterações de PNNs não estão mais presentes nos animais privados, quando comparados aos animais sem privação. Não houve alteração na imunomarcação de CFos, tampouco na imunomarcação de BDNF neste animais privados.

A estratégia de degradação das GAGs-SC no PMBSF após o fim do período crítico de plasticidade (animais ChABC) inicialmente promoveu o aumento de PNNs imaturas e de células cFos (nas camadas granular e infragranulares). E 20 dias após 62 o implante de elvax com ChABC (P60), ainda observamos significativa atividade

neuronal na camada granular, apesar de não comprometer o número de células totais, e intensa imunomarcação de BDNF na área privada.

Portanto, mesmo que a degradação das GAG-SC não promova recuperação funcional significativa da área privada (VOROBYOV *et al.*, 2013), neste estudo esta estratégia induziu alterações na atividade neuronal e na proteína BDNF a longo prazo.

Por esse motivo, concluímos que a degradação das GAGs-SC promoveu a plasticidade local, por induzir o aumento de marcação para BDNF e da atividade neuronal via cFos na camadas granular, que se prolongaram por até pelo menos 30 dias (P60) depois do fim do período crítico de plasticidade de S1.

## 7. CONCLUSÃO

- A privação sensorial e a degradação das GAGs-SC provocaram aumento no número de células Vv positivas imaturas no PMBSF (10 dias após o inicio da remoção). Entretanto, este perfil de organização das GAGs das PNNs volta a se apresentar como células Vv maduras 20 dias após o início da degradação das estruturas das PNNs, isto tanto para o hemisfério privado quanto para o hemisfério não privado.
- A privação sensorial e a degradação das GAGs-SC no PMBSF provocou alteração na imunomarcação de células cFos positivas, principalmente na camada granular (IV) do PMBSF, que inclusive permanece mesmo 20 dias após o início da degradação das GAGs. Isto indica que, consequentemente, a atividade elétrica nesta camada, aumentou após a remoção das GAGs nas PNNs na matriz extracelular do tecido nervoso.
- A privação sensorial e a degradação das GAGs-SC no PMBSF provocou aumento na intensidade de imunomarcação da proteína BDNF, principalmente nas camadas supragranulares (II/III) e substância branca, mesmo 20 dias após o início da degradação das GAGs nas PNNs na matriz extracelular do tecido nervoso.

# 8. REFERÊNCIA

BAHIA, C. P. *et al.* Spatiotemporal distribution of proteoglycans in the developing rat's barrel field and the effects of early deafferentation. **J Comp Neurol**. v.510; n.2; p.145-57; Sep 102008.

BARONCELLI, L. *et al.* Experience-dependent reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. **Exp Neurol**. v.226; n.1; p.100-9; Nov2010.

BEURDELEY, M. *et al.* Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. **J Neurosci.,** v.32; n.27; p.9429-37; 2012.

BIKBAEV, A.; FRISCHKNECHT, R.; HEINE, M. Brain extracellular matrix retains connectivity in neuronal networks. **Sci Rep**. v.5; p.14527; 2015.

BRACKEN, B. K.; TURRIGIANO, G. G. Experience-dependent regulation of TrkB isoforms in rodent visual cortex. **Dev Neurobiol**. v.69; n.5; p.267-78; Apr2009.

BRADBURY, E. J. *et al.* Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. **Nature**. v.416; n.6881; p.636-40; 2002.

BRECHT, M. Barrel cortex and whisker-mediated behaviors. **Curr Opin Neurobiol**. v.17; n.4; p.408-16; Aug2007.

BRINER, A. *et al.* Bilateral Whisker Trimming During Early Postnatal Life impairs dendritic spine Development in the Mouse Somatosensory Barrel Cortex. **J. Comp. Neurol.**, v.518; p.1711-1723; 2010.

BRUCKNER, G. *et al.* Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the Mongolian gerbil and rat. **Brain Research**. v.658; p.67-86; 1994.

CARULLI, D. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. **Curr Opin Neurobiol**. v.15; n.1; p.116-20; Feb2005.

CARULLI, D.; RHODES, K. E.; FAWCETT, J. W. Upregulation of Aggrecan, Link Protein 1, and Hyaluronan Synthases during Formation of Perineuronal Nets in the Rat Cerebellum. **THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY**. v.501; p.83–94; 2007.

CASTRO, K. J. S. Efeito combinado do exercício físico e da degradação da matriz extracelular na plasticidade do córtex cerebral após isquemia. 2014. 71 (Mestrado); Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará; Belém, Pará.

CATANIA, K. C. Barrels, stripes, and fingerprints in the brain - implications for theories of cortical organization. **J Neurocytol**. v.31; n.3-5; p.347-58; Mar-Jun2002.

CELIO, M. R.; BLÜMCKE, I. Perineuronal nets - a specialized form of extracellular matrix. **Brain Research Reviews**. v.19; p.128-145; 1994.

CELIO, M. R. *et al.* Perineuronal nets: past and present. **Trends Neurosci**. v.21; p.510–515; 1998.

CHEVALEYRE, V.; PISKOROWSKI, R. Modulating excitation through plasticity at inhibitory synapses. **Front Cell Neurosci**. v.8; p.93; 2014.

CHU, Y.-F.; YEN, C.-T.; LEE, L.-J. Neonatal whisker clipping aters behavior, neuronal structure and neuronal activity in adult rats. v.238; p.124-133; 2013.

DAWSON, D. R.; KILLACKEY, H. P. Distinguishing topography and somatotopy in the thalamocortical projections of the developing rat. **Development Brain Research**. v.17; n.1-2; p.309-313; 1985.

DITYATEV, A. *et al.* Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. **Dev Neurobiol**. v.67; n.5; p.570-88; Apr2007.

DITYATEV, A.; SCHACHNER, M.; SONDEREGGER, P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. **Nat Rev Neurosci**. v.11; n.11; p.735-46; Nov2010.

DZYUBENKO, E.; GOTTSCHLING, C.; FAISSNER, A. Neuron-Glia Interactions in Neural Plasticity: Contributions of Neural Extracellular Matrix and Perineuronal Nets. **Neural Plast**. v.2016; p.5214961; 2016.

ENRIQUEZ-BARRETO, L. *et al.* Neural cell adhesion molecule, NCAM, regulates thalamocortical axon pathfinding and the organization of the cortical somatosensory representation in mouse. **Front Mol Neurosci.**, v.5; n.76; 2012.

ERZURUMLU, R. S.; GASPAR, P. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. **Eur J Neurosci**. v.35; n.10; p.1540-53; May2012.

FAGIOLINI, M.; JENSEN, C. L.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic influences on brain development and plasticity. **Curr Opin Neurobiol**. v.19; n.2; p.207-12; Apr2009.

FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Research Bulletin**. v.49; n.6; p.377–391; 1999.

FELDMAN, D. E. A new critical period for sensory map plasticity. **NEURON**. v.31; n.2; p.171–173; 2001.

\_\_\_\_\_. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. **Annu Rev Neurosci.,** v.32; p.33-55; 2009.

FILIPKOWSKI, R. K. Tactile Experience Induces c-fos Expression in Rat Barrel Cortex. Learning & Memory. v.7; n.2; p.116-122; 2000.

FOX, K. A Critical Period for Experience-dependent Synaptic Plasticity in Rat Barrel Cortex. **The Journal of Neuroscience**. v.12; n.5; p.1626-1636; 1992.

\_\_\_\_\_. ANATOMICAL PATHWAYS AND MOLECULAR MECHANISMS FOR PLASTICITY IN THE BARREL CORTEX. **Neuroscience** v.111; n.4; p.799-814; 2002.

FOX, K.; CATERSON, B. Freeing the Brain from the Perineuronal Net. **Science** v.298; n.5596; p.1187-1189 2002.

FRISCHKNECHT, R.; SEIDENBECHER, C. I. Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. **Int J Biochem Cell Biol**. v.44; n.7; p.1051-4; Jul2012.

GAINEY, M. A. *et al.* Whisker Deprivation Drives Two Phases of Inhibitory Synapse Weakening in Layer 4 of Rat Somatosensory Cortex. **PLoS One**. v.11; n.2; p.e0148227; 2016.

GENTET, L. J. Functional diversity of supragranular GABAergic neurons in the barrel cortex. **Front Neural Circuits**. v.6; p.52; 2012.

GHOSHAL, A. *et al.* Unilateral whisker trimming in newborn rats alters neuronal coincident discharge among mature barrel cortex neurons. **J Neurophysiol**. v.112; n.8; p.1925-35; Oct 152014.

GHOSHAL, A. *et al.* Early bilateral sensory deprivation blocks the development of coincident discharge in rat barrel cortex. **J Neurosci**. v.29; n.8; p.2384-92; Feb 252009.

H.P. KILLACKEY; RHOADES, R. W.; BENNETT-CLARKE, C. A. The formation of a cortical somatotopic map. **Trends Neurosci**. v.18; p.402-407; 1995.

HARRIS, J. A.; PETERSEN, R. S.; DIAMOND, M. E. Distribution of tactile learning and its neural basis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** . v.96; p.7587–7591; 1999.

HENSCH, T. K. Critical period regulation. Annu Rev Neurosci. v.27; p.549-79; 2004.

HOCKFIELD, S.; MCKAY, R. D. G. A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**. v.80; p.5758-5761; 1983.

HOWELL, M. D.; GOTTSCHALL, P. E. Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. **Neuroscience**. v.217; p.6-18; Aug 162012.

HANOVER J.L. *et al.* Brain-derived Neurotrophic Factor Overexpression Induces Precocious Critical Period in Mouse Visual Cortex. **The Journal of Neuroscience**. v.19; p.1-5; 1999.

HUANG Z.J. *et al.* BDNF Regulates the Maturation of Inhibition and the Critical period of Plasticity in Mouse Visual Cortex. 1999.

JOHN, N. *et al.* Brevican-containing perineuronal nets of extracellular matrix in dissociated hippocampal primary cultures. **Mol Cell Neurosci**. v.31; n.4; p.774-84; Apr2006.

KAAS, J. H. Evolution of somatosensory and motor cortex in primates. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**. v.281; n.1; p.1148-56; Nov2004.

KACZMAREK, L.; CHAUDHURI, A. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. **Brain Res Rev.**, v.23; n.3; p.237-56; 1997.

KALISZEWSKA, A. *et al.* Experience-dependent plasticity of the barrel cortex in mice observed with 2-DG brain mapping and c-Fos: effects of MMP-9 KO. **Cereb Cortex**. v.22; n.9; p.2160-70; Sep2012.

KALISZEWSKA, A.; KOSSUT, M. Npas4 expression in two experimental models of the barrel cortex plasticity. **Neural Plast**. v.2015; p.1-9; 2015.

KANEKO, M. *et al.* Dendritic BDNF synthesis is required for late-phase spine maturation and recovery of cortical responses following sensory deprivation. **J Neurosci**. v.32; n.14; p.4790-802; Apr 42012.

KARETKO, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J. Diverse functions of perineuronal nets. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**. v.69; n.4; p.564-77; 2009.

KARPOVA, N. N. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. **Neuropharmacology**. v.74; p.709-718; 2014.

KELLER, A.; CARLSON, G. C. Neonatal Whisker Clipping Alters Intracortical, But Not Thalamocortical Projections, in Rat Barrel Cortex. **THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY**. v.412; p.83-94; 1999.

KELLNER, Y. *et al.* The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. **Front Synaptic Neurosci** v.6; n.5; 2014.

KHODADAD, A. *et al.* The time course of activity-regulated cytoskeletal (ARC) gene and protein expression in the whisker-barrel circuit using two paradigms of whisker stimulation. **Behav Brain Res.**, v.284; p.249-56; 2015.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. PROTEOGLYCANS: STRUCTURES AND INTERACTIONS. Annu. Rev. Biochem., v.60; p.443-75; 1991.

KÖPPE, G. *et al.* Developmental patterns of proteoglycan-containing extracellular matrix in perineuronal nets and neuropil of the postnatal rat brain. **Cell Tissue Res**. v.288; p.33-41; 1997.

KUZNIEWSKA, B. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor induces matrix metalloproteinase 9 expression in neurons via the serum response factor/c-Fos pathway. **Mol Cell Biol.** v.33; n.11; p.2149-62; Jun2013.

KWOK, J. C. *et al.* Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. **Dev Neurobiol**. v.71; n.11; p.1073-89; Nov2011.

LEE, H. K.; WHITT, J. L. Cross-modal synaptic plasticity in adult primary sensory cortices. **Curr Opin Neurobiol**. v.35; p.119-26; Dec2015.

LEE, L. J. *et al.* Neonatal whisker trimming causes long-lasting changes in structure and function of the somatosensory system. **Exp Neurol**. v.219; n.2; p.524-32; Oct2009.

LIGUZ-LECZNAR, M. *et al.* Altered glutamate/GABA equilibrium in aged mice cortex influences cortical plasticity. **Brain Struct Funct.**, v.220; n.3; p.1681-93; 2014.

LIN, R. *et al.* Chondroitinase ABC has a long-lasting effect on chondroitin sulphate glycosaminoglycan content in the injured rat brain. **J Neurochem**. v.104; n.2; p.400-8; Jan2008.

LOEBRICH, S.; NEDIVI, E. The function of activity-regulated genes in the nervous system. **Physiol Rev**. v.89; n.4; p.1079-103; Oct2009.

LU, P. *et al.* Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v.3; n.12; 2011.

MA, W. P.; LI, Y. T.; TAO, H. W. Downregulation of cortical inhibition mediates ocular dominance plasticity during the critical period. **J Neurosci**. v.33; n.27; p.11276-80; Jul 32013.

MACK, K. J.; MACK, P. A. Induction of transcription factors in somatosensory cortex after tactile stimulation. **Brain Res Mol Brain Res.**, v.12; n.1-3; p.141-7; 1992.

MAGUERESSE, C. L.; MONYER, H. GABAergics interneurons shape the functional maturation of the cortex. **Neuron Review**. v.77; p.308-405; 2013.

MATAGA, N.; MIZUGUCHI, Y.; HENSCH, T. K. Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. **Neuron**. v.44; n.6; p.1031-41; Dec 162004.

MCALLISTER, A. K.; KATZ, L. C.; LO, D. C. Neurotrophins and synaptic plasticity. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.22; p.295–318; 1999.

MCRAE, P. A. *et al.* Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. **J Neurosci**. v.27; n.20; p.5405-13; May 162007.

MICHALUK, P. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. **J Neurosci**. v.29; n.18; p.6007-12; May 62009.

MICHEVA, K. D.; BEAULIEU, C. Neonatal sensory deprivation induces selective changes in the quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons in the rat barrel field cortex. **J Comp Neurol**. v.361; n.4; p.574-84; Oct 301995.

MOON, L. D. F. *et al.* Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. **Nature Neuroscience** v.4; p.465 - 466; 2001.

MOREAU, A. W.; KULLMANN, D. M. NMDA receptor-dependent function and plasticity in inhibitory circuits. **Neuropharmacology**. v.74; p.23-31; Nov2013.

NAKAMURA, M.; NAKANO, K.; MORITA, S; NAKASHIMA, T.; OOHIRA, A.; MIYATA, S. Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in barrel field of mouse and rat somatosensory cortex. **Brain research**. v.1252; p.117-129; 2009.

NOWICKA, D. *et al.* Parvalbumin-containing neurons, perineuronal nets and experience-dependent plasticity in murine barrel cortex. **Eur J Neurosci**. v.30; n.11; p.2053-63; Dec 32009.

NUMAKAWA, T. *et al.* BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histol Histopathol** v.25; p.237-258; 2010.

OKUNO, H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. **Neurosci Res**. v.69; n.3; p.175-86; Mar2011.

PATZ, S. Parvalbumin Expression in Visual Cortical Interneurons Depends on Neuronal Activity and TrkB Ligands during an Early Period of Postnatal Development. **Cerebral Cortex**. v.14; n.3; p.342-351; 2004.

PENZES, P. *et al.* Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci**. v.14; n.3; p.285-93; Mar2011.

PETERSEN, C. C. The barrel cortex--integrating molecular, cellular and systems physiology. **Pflugers Arch**. v.447; n.2; p.126-34; Nov2003.

PIZZORUSSO, T. *et al.* Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the adult cortex **Science**. v.298; n.5596; p.1248-51; 2002.

PIZZORUSSO, T. *et al.* Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.103; n.22; p.8517-22; May 302006.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D. Neuroscience. 2nd. 2001.

RAUCH, U. Modeling an extracellular environment for axonal pathfinding and fasciculation in the central nervous system. **Cell Tissue Res**. v.290; p.349-356; 1997.

REBSAM, A.; SEIF, I.; GASPAR, P. Dissociating barrel development and lesioninduced plasticity in the mouse somatosensory cortex. **J Neurosci**. v.25; n.3; p.706-10; Jan 192005.

RHOADES, R. W. *et al.* Sensitive Period for Lesion-Induced Reorganization of Intracortical Projections Within the Vibrissae Representation of Rat's Primary Somatosensory Cortex. **THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY**. v.389; p.185–192; 1997.

RHODES, K. E.; FAWCETT, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans preventing plasticity or protecting the CNS. **J. Anat.** v.204; p.33-48; 2004.

ROSSI, F. M. *et al.* MONOCULAR DEPRIVATION DECREASES BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR IMMUNOREACTIVITY IN THE RAT VISUAL CORTEX. **Neuroscience** v.90; n.2; p.363–368; 1999.

ROUSLAHTI, E. Brain extracellular matrix. **Glycobiology** v.6; n.5; p.489-192; 1996.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Dev Biol**. v.341; n.1; p.126-40; May 12010.

SÁ, A. L. **Plasticidade dependente da experiência induzida por manipulação da matriz extracelular**. 2014. 138 (Doutorado); Instituto do Cérebro, Universidade Federal do Rio Grande do Norte; Natal, RN.

SADAKA, Y. *et al.* Changes in mouse barrel synapses consequent to sensory deprivation from birth. **J Comp Neurol**. v.457; n.1; p.75-86; Feb 242003.

SALE, A. *et al.* Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. **Nat Neurosci**. v.10; n.6; p.679-81; Jun2007.

SEKI, M. *et al.* BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** p.3211--3218; 2003.

SHERIDAN, M. A.; MCLAUGHLIN, K. A. Dimensions of early experience and neural development: deprivation and threat. **Trends Cogn Sci**. v.18; n.11; p.580-5; Nov2014.

SHU, S.; JU, G.; FAN, L. The glucose oxidade-DAB-niquel method in peroxidase histochemistry of nervous system. **Neuroscience letters**. v.85; p.169-171; 1988.

SIDDOWAY, B.; HOU, H.; XIA, H. Molecular mechanisms of homeostatic synaptic downscaling. **Neuropharmacology**. v.78; p.38–44; 2014.

SOARES, S. C. D. S. Indução de plasticidade cerebral por remoção da matriz extracelular após lesão isquêmica no cortex sensório-motor de ratos. 2012. 78 (Mestrado); Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará; Belém, Pará.
SOLEMAN, S. *et al.* Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats. **Brain**. v.135; n.Pt 4; p.1210-23; Apr2012.

STEINER, H.; GERFEN, C. R. Tactile sensory input regulates basal and apomorphine-induced immediate-early gene expression in rat barrel cortex. **J Comp Neurol.** v.344; n.2; p.297-304; 1994.

STERN, E. A.; MARAVALL, M.; SVOBODA, K. Rapid Development and Plasticity of Layer 2/3 Maps in Rat Barrel Cortex In Vivo. **Neuron**. v.31; p.305–315; 2001.

SUZUKI, S. *et al.* Formation of three types of disulfated disaccharides from chondroitin sulfates by chondroitinase digestion. **J Biol Chem**. v.243; n.7; p.1543-50; Apr 101968.

THURET, S.; MOON, L. D. F.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nature Reviews**. v.7; 2006.

UENO, H. *et al.* Sensory Deprivation during Early Postnatal Period Alters the Density of Interneurons in the Mouse Prefrontal Cortex. **Neural Plast**. v.2015; p.753179; 2015.

VENSTROM, K. A.; REICHARDT, L. F. Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system. **FASEB J.**, v.7; n.11; p.996-1003; 1993.

VIGGIANO, D. The two faces of perineuronal nets. **Neuroreport**. v.11; n.10; p.2087-90; Jul 142000.

VOROBYOV, V. *et al.* Effects of digesting chondroitin sulfate proteoglycans on plasticity in cat primary visual cortex. J Neurosci. v.33; n.1; p.234-43; Jan 22013.

WANG, H.; ZHANG, Z. W. A critical window for experience-dependent plasticity at whisker sensory relay synapse in the thalamus. **J Neurosci**. v.28; n.50; p.13621-8; Dec 102008.

WATANABE, M. *et al.* Attenuated sensory deprivation-induced changes of parvalbumin neuron density in the barrel cortex of FcgammaRIIB-deficient mice. Acta Med Okayama. v.66; n.2; p.143-54; 2012.

WELKER, C. Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. **Journal of Comparative Neurology**. v.166; n.2; p.173–189; 1976.

WEST, A. E.; GREENBERG, M. E. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v.3; n.6; Jun2011.

WLODARCZYK, J. *et al.* Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. **Dev Neurobiol**. v.71; n.11; p.1040-53; Nov2011.

WOJTOWICZ, T.; BRZDAK, P.; MOZRZYMAS, J. W. Diverse impact of acute and long-term extracellular proteolytic activity on plasticity of neuronal excitability. **Front Cell Neurosci**. v.9; p.313; 2015.

WOOLSEY, T. M.; LOOS, H. V. D. THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF LAYER IV IN THE SOMATOSENSORY REGION (S I) OF MOUSE CEREBRAL CORTEX. **Brain Research**. v.17 p.205-242; 1970.

WU, C. S.; BALLESTER ROSADO, C. J.; LU, H. C. What can we get from 'barrels': the rodent barrel cortex as a model for studying the establishment of neural circuits. **Eur J Neurosci**. v.34; n.10; p.1663-76; Nov2011.

GU, Y. *et al.* Obligatory role for the immediate early gene NARP in critical period plasticity. **Neuron**. v.79; n.2; p.335-46; Jul 242013.

YAMADA, J.; OHGOMORI, T.; JINNO, S. Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. **Eur J Neurosci**. v.41; n.3; p.368-78; Feb2015.

YAMAGUCHI, Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. **Cell. Mol.** Life Sci. v.57; p.276–289; 2000.

YANG, S. *et al.* Perineuronal net digestion with chondroitinase restores memory in mice with tau pathology. **Exp Neurol**. v.265; p.48-58; Mar2015.

YIU, G.; HE, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. **Nat Rev Neurosci**. v.7; n.8; p.617-27; Aug2006.

## **ANEXO:** TABELA DE DADOS DOS GRUPOS EXPERIMENTOS

	P50	P60
SEM PRVAÇÃO	4619.67 ± 219.80	3192.83 ± 979.52
BSA	5491.50 ± 255.29	3821.00 ± 1543.88
ChABC	6495.33 ± 949.47	4302.50 ± 1449.17

Tabela 3: Total de células Vv positivas no PMBSF de ratos (Media±DP)

Tabela 4: Total de células cFos positivas no PMBSF de ratos (Media±DP)

	P50	P60
SEM PRVAÇÃO	265.67 ± 57.31	287.33 ± 65.90
BSA	265.67 ± 57.31	298.50 ± 17.18
ChABC	531.33 ± 114.62	401.50 ± 196.38

	IMATURAS		IMATURAS MADURAS	
	P50	P60	P50	P60
SEM PRVAÇÃO	1284.00 ± 538.82	1720.00 ± 708.52	998.50 ± 434.87	691.00 ± 263.04
BSA	2131.50 ± 852.06	1177.50 ± 450.43	551.50 ± 241.12	473.50 ± 195.87
ChABC	2104.00 ± 895.20	1538.50 ± 655.49	591.00 ± 209.30	537.00 ± 229.10

Tabela 5: Caracterização das células Vv positivas do PMBSF (Media±DP)

Tabela 6: Células cFos positivas nas camadas corticais cerebrais do PMBSF (Media±DP)

	P50		P60			
	SUPRA	GRA	INFRA	SUPRA	GRA	INFRA
SEM PRVAÇÃO	3394.50 ± 24.75	7349.00 ± 49.50	3115.50 ± 9.19	2402.00 ± 213.55	5231.50± 522.55	1945.00 ± 86.27
BSA	3491.00 ± 93.34	8764.50 ± 327.39	4014.00 ± 52.33	1699.50 ± 177.48	4079.00 ± 137.18	1863.50 ± 84.15
ChABC	4409.50 ± 249.61	10579.50 ± 205.77	4497.00 ± 169.71	3215.50 ± 620.13	6743.00 ± 421.44	2949.00 ± 277.19

Tabela 7: Total de células Vv positivas nos hemisférios cerebrais corticais (Media±DP)

	P50		P60	
	HE	HD	HE	HD
SEM PRVAÇÃO	273.67 ± 51.94	257.67 ± 72.95	281.67 ± 76.51	293.00 ± 70.06
BSA	312.00 ± 95.31	324.67 ± 109.15	284.50 ± 6.36	312.50 ± 7.78
ChABC	332.67 ± 95.48	305.33 ± 142.62	257.67 ± 70.59	225.67 ± 20.60

Tabela 8: Células cFos positivas nos hemisférios cerebrais corticais do PMBSF (Media±DP)

	P50		P60	
	HE	HD	HE	HD
SEM PRVAÇÃO	4616.00 ±	4623.33 ±	2999.00 ±	3386.67 ±
	214.75	273.17	1017.81	1118.02
BSA	5510.00 ±	5336.33 ±	3902.50 ±	3739.50 ±
	197.45	275.97	2291.73	1368.25
ChABC	6445.00 ±	6545.67 ±	3991.67 ±	4613.33 ±
	638.22	1356.03	1903.56	1156.22