



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

NONATA LUCIA TRÉVIA DA SILVA

ACUIDADE VISUAL E MATRIZ EXTRACELULAR NO CÓRTEX VISUAL
PRIMÁRIO: ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À PRIVAÇÃO MONOCULAR
PRECOCE E AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Belém - PA
Outubro 2012

NONATA LUCIA TRÉVIA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular como requisito básico para obtenção do Título de Mestre em Neurociências da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Picanço Diniz; Co-orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz.

ACUIDADE VISUAL E MATRIZ EXTRACELULAR NO CÓRTEX VISUAL
PRIMÁRIO: ALTERAÇÕES ASSOCIADAS À PRIVAÇÃO MONOCULAR
PRECOCE E AO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Belém – PA
Outubro 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos, que participaram diariamente de todo o processo de construção da minha carreira. Ao prof. Cristovam que me permitiu conhecer a ciência e realizar esse trabalho. Aos amigos e amigas do Laboratório de Neurodegeneração e Infecção, do Programa de Mestrado em Neurociências, da UFPA, a Cesar Diniz, Poliana Sampaio, Sandro Pereira, Fernando Carneiro, Henrique Campelo, Igor Silva, Isabela Almeida, Renata Reis, Aline Sousa, Daniel Diniz, João Bento, Marcia Kronka, Natali Valim.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho é analisar a influência do enriquecimento ambiental sobre a acuidade visual e a distribuição das redes perineuronais (RPNs) no córtex visual primário de camundongos submetidos à privação monocular durante o período crítico pós-natal. Camundongos suíços albinos fêmeas foram submetidos à sutura da pálpebra direita no 10º dia pós-natal (**M**, n=16), enquanto que os animais do grupo binocular não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico (**B**, n=16). Ao completarem 21 dias, os animais foram subdivididos em: ambiente padrão e ambiente enriquecido, constituindo os grupos **M.AP**, **M.AE**, **B.AP** e **B.AE**. Após três meses, os animais foram submetidos ao teste de acuidade visual, perfundidos e secções coronais de seus cérebros processadas para histoquímica da lectina *Wisteria floribunda* e posterior quantificação através do método estereológico do fracionador óptico. Os animais do grupo **B.AP** apresentaram acuidade visual de 0.48 ciclos/grau, enquanto que aqueles alojados em ambiente enriquecido (**B.AE**) apresentaram um melhor desempenho do teste, atingindo 0.996 ciclos/grau. A acuidade visual foi significativamente menor nos animais submetidos à privação monocular (**M.AP** 0.18 ciclos/grau; **M.AE** 0.4 ciclos/grau). Os resultados estereológicos revelaram que o ambiente enriquecido aumenta o número de RPNs tipo 1 e de RPNs total nas camadas supragranular e granular em ambos os hemisférios nos camundongos submetidos à privação monocular (ANOVA dois critérios, $p < 0.05$), sendo que essa diferença na camada granular é decorrente principalmente do aumento das redes perineuronais da matriz extracelular no hemisfério direito. Na camada infragranular, os animais do grupo **M.AE** apresentaram um aumento apenas no número de RPNs tipo 1.

Palavras-chave: privação monocular, período crítico, córtex visual, redes perineuronais, acuidade visual e estereologia.

ABSTRACT

The aim of the present study is to analyze the influence of enriched environment on the visual acuity and on the distribution of perineuronal nets (PNNs) in the primary visual cortex of albino mice that underwent monocular deprivation during the critical period of postnatal development. Mice at 10th postnatal day, were monocular deprived through right eye-lid sutured (**M**, n = 16) and the control group animals were not submitted to any surgical procedures (**B**, n = 16). After weaning, on postnatal day 21, animals were subdivided in: standard environment (AP) and enriched environment (AE), constituting the following groups: **M.AP**, **M.AE**, **B.AP** and **B.AE**. After 3 months, animals were submitted to grating visual acuity tests, perfused and coronal sections of their brains processed for *Wisteria floribunda* agglutinin to posterior stereological quantification through optical fractionator method. **B.AP** animals present visual acuity of 0.48 cycles/degree, while those raised in enriched environment (**B.AE**) present a better performance at visual test, reaching 0.996 cycles/degree. Animals with monocular deprivation had significantly lower visual acuity (**M.AP** 0.18 cycles/degree; **M.AE** 0.4 cycles/degree). Stereological quantifications revealed that enriched environment increases type 1 and the total number of perineuronal nets at supragranular and granular layers in both hemispheres of deprived animals (ANOVA, two-ways, $p < 0.05$) and this difference at granular layer is due to an increase of perineuronal nets mainly at the right hemisphere (ipsilateral to the monocular deprivation). At infragranular layer, **M.AE** animals presented an increase only at the number of type 1 PNNs in both hemispheres.

Key-words: monocular deprivation, critical period, visual cortex, perineuronal nets, visual acuity and stereology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Três tipos de redes perineuronais mostrados pela marcação com *Wisteria floribunda*. A. Redes perineuronais contornando nitidamente um neurônio não-piramidal. A estrutura reticular é visivelmente identificada ao redor do corpo celular, das porções proximais dos dendritos e do segmento inicial do axônio; B. Redes perineuronais circundando uma célula piramidal da camada III do córtex parietal, caracterizada pela estrutura delicada e menor intensidade de marcação; C. Rede perineuronal do tipo difusa, na camada VIb. As setas indicam o segmento inicial do axônio. Escala: 20 µm. Adaptado de Wegner et al., 2003..... 17

Figura 2. Desenho esquemático do sistema visual do camundongo. Os hemisférios visuais esquerdo e direito são representados em vermelho e verde, respectivamente. O campo visual binocular na região central é visto pelas retinas temporais de ambos os olhos. Fibras da porção temporal de cada retina (vermelho claro e verde claro) projetam para o núcleo geniculado lateral (NGL) ipsilateral. A grande maioria das células ganglionares da retina (mais de 90%) decussam no quiasma óptico. No córtex visual primário, respostas binoculares são encontradas no terço lateral. Os números no campo visual e no córtex representam a organização retinotópica. Adaptado de Gordon e Stryker, 1996. 19

Figura 3. A. Fotomicrografia de uma secção coronal de cérebro de camundongo corada com Nissl, evidenciando os limites do córtex visual primário (V1). Escala: 500µm. B. Fotomicrofotografia em maior aumento de V1, identificando as seis camadas celulares que o compõe. SB: Substância Branca. Escala: 125µm. 21

Figura 4. Áreas visuais no córtex do camundongo, mostrando nove áreas extraestriatais circunscrevendo o córtex visual primário (V1). A: Área anterior; AL: Área anterolateral; AM: Área anteromedial; Au: Córtex auditivo; ENT: córtex entorhinal; LI: Área laterointermediária; LM: Área lateromedial; P: Área posterior; PM: Área posteriomedial; POR: Área posrinal; RL: Área rostrolateral; RSA: Córtex agranular retrosplenial; S1: Área somatosensorial primária; V1: Área visual primária. Adaptado de Wang and Burkhalter, 2007 22

Figura 5. Aferências talâmicas do córtex visual de ratos (Peters, 1975). 23

Figura 6. A. Animal com 10 dias de vida, imediatamente após a sutura da pálpebra direita. B. Animal com 21 dias de vida, 11 dias após o procedimento de privação monocular. Escala: 1 cm.....	30
Figura 7. Fotografias de gaiolas de alojamento dos animais, com suas dimensões. A. Ambiente padrão; B. Ambiente enriquecido	31
Figura 8. Animal com três meses de vida, 80 dias após a sutura da pálpebra direita.....	32
Figura 9. Esquema de linha do tempo ilustrado as diversas etapas durante a formação dos grupos e procedimentos experimentais.....	32
Figura 10. Desenho esquemático e componentes do teste visual aquático de escolha forçada (adaptado de Prusky et al., 2000).	34
Figura 11. Fotomicrografia do córtex visual primário de camundongos reagidos para lectina <i>Wisteria floribunda</i> evidenciando os limites de V1 e sua organização laminar. Camada supragranular: I, II e III; Camada granular: IV; Camada infragranular: V e VI. L: Lateral; V: Ventral; D: Dorsal; M: Medial. Escala: 250 μ m.	37
Figura 12. Frequência espacial (ciclos/grau) máxima dos grupos experimentais no Teste de Acuidade Visual. <i>B.AP</i> – Binocular.Ambiente Padrão; <i>B.AE</i> – Binocular.Ambiente Enriquecido; <i>M.AP</i> – Monocular.Ambiente Padrão; <i>M.AE</i> – Monocular.Ambiente Enriquecido.	40
Figura 13. Fotomicrografia da marcação histoquímica para a lectina de <i>Wisteria floribunda</i> , identificando os dois tipos de redes perineuronais quantificadas no córtex visual. A cabeça de seta, indica as redes perineuronais Tipo 1, com intensa marcação no corpo celular e ramificações de segunda ordem ou superior; A seta indica as redes perineuronais Tipo 2, com discreta marcação no corpo celular e ramificações primárias. Escala: 25 μ m.	41
Figura 14. Quantificação estereológica (média \pm erro padrão) das redes perineuronais (RPNs) Tipo 1 (A), Tipo 2 (B) e redes Totais (C) nos córtices ipsi- e contralateral (direito e esquerdo, respectivamente) à privação monocular. *ANOVA	

dois critérios, $p < 0.05$; # Bonferroni pós-teste $p < 0.05$. *M.AP*, Monocular.Ambiente Padrão; *M.AE*, Monocular.Ambiente Enriquecido; HE, Hemisfério Esquerdo; HD, Hemisfério Direito..... 42

Figura 15. A. Quantificação estereológica (média \pm erro padrão) das redes perineuronais (RPNs) Tipo 1, Tipo 2 e redes totais, reveladas pela lectina da *Wisteria floribunda*, nas camadas supragranular, granular e infragranular dos hemisférios direito e esquerdo, de camundongos submetidos a privação monocular. *ANOVA dois critérios, $p < 0.05$; # Bonferroni pós-teste $p < 0.05$. B. Fotomicrografia de secção coronal do encéfalo de camundongo do grupo *M.AP* (orifício no tronco cerebral indica o lado do hemisfério direito). Escala: 500 μm . C. Fotomicrografia de secção coronal do encéfalo de camundongo do grupo *M.AE* (orifício no tronco cerebral indica o lado do hemisfério direito). Escala: 500 μm . D. Fotomicrografia em maior aumento dos córtices visuais primários direito e esquerdo de animais dos grupos *M.AP* e *M.AE*. Escala: 125 μm . *M.AP*, Monocular. Ambiente Padrão; *M.AE*, Monocular, Ambiente Enriquecido; HE, Hemisfério Esquerdo; HD, Hemisfério Direito..... 47

Figura 16. Interneuônios GABAérgicos durante o período crítico no córtex visual de camundongos. As aferências dos dois olhos convergem para o campo binocular no córtex visual primário, através de inputs provenientes do núcleo geniculado lateral do tálamo (LGN). Interações competitivas entre os dois olhos refinam a circuitaria cortical durante o período crítico. Receptores GABA_a contendo a subunidade $\alpha 1$ estão aumentados nas sinapses somáticas das grandes células em cesto com as células piramidais. CCK: Colecistoquinina; CR: Calretinina; PV: Parvalbumina; SOM: Somatostatina. Adaptado de Sugiyama et al. (2009)..... 56

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Período Crítico.....	12
1.2	A Matriz Extracelular.....	14
1.3	Organização e Laminação do Córtex Visual.....	17
1.4	Aferências e Eferências do Córtex Visual.....	22
1.5	Enriquecimento Ambiental.....	24
1.6	Morfologia Quantitativa.....	26
2.	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo Geral.....	28
2.2	Objetivos Específicos.....	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Animais.....	29
3.2	Formação dos Grupos Experimentais.....	30
3.3	Teste de Acuidade Visual.....	32
3.3.1	O Aparato.....	33
3.3.2	A Tarefa.....	34
3.4	Perfusão e Procedimentos Histológicos.....	36
3.4.1	Histoquímica para Lectina Wisteria floribunda (LWF).....	36
3.5	Quantificação Estereológica.....	37

3.6	Análise Estatística.....	38
4.	RESULTADOS	39
4.1	Acuidade Visual.....	39
4.2	Redes Perineuronais.....	40
4.2.1	Quantificação Estereológica	41
4.2.2	Quantificação Estereológica Laminar	44
5.	DISCUSSÃO	52
6.	CONCLUSÃO.....	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

Os circuitos neurais são moldados pela interação dos programas genéticos, que determinam grande parte da estrutura básica e da função do sistema nervoso, assim como, pela estimulação ambiental experimentada por cada indivíduo. Desde os clássicos experimentos de Wiesel e Hubel (1963), foi comprovado que a consolidação da maioria dos circuitos corticais é moldada pela experiência a que cada indivíduo foi submetido durante uma fase de extrema sensibilidade no período pós-natal, denominado período crítico.

As janelas temporais do período crítico têm sido extensamente estudadas no sistema visual, utilizando experimentos clássicos de manipulação da estimulação sensorial, como a privação monocular em roedores e primatas (para revisão, ver Berardi et al., 2000). Em humanos, recente estudo demonstrou que a privação visual precoce em crianças com catarata congênita pode produzir déficits visuais permanentes, com a redução da acuidade visual, caracterizando uma doença denominada ambliopia (Lewis and Maurer, 2009).

A experiência individual resultante da interação do indivíduo com o meio ambiente é um fator determinante da duração do período crítico. Caso, durante essa fase, haja um desequilíbrio entre as aferências sensoriais, como a privação da visão em um dos olhos, a típica organização do campo binocular e as aferências tálamo-corticais irão se reorganizar a favor do olho não privado (Bavelier et al., 2010). Por outro lado, a ausência de experiências visuais, como em animais submetidos ao modelo de privação de luz (“dark-rearing”), previne a maturação funcional do sistema visual. As conexões visuais nesse modelo, não se consolidam, permanecendo plásticas após o término do período crítico normal e não desenvolvem assim a acuidade visual esperada (Bartoletti et al., 2004).

A plasticidade no córtex visual declina com a idade, e se essa perda do estímulo sensorial ocorrer já na fase adulta, após o fechamento do período crítico, essas alterações morfofuncionais são reduzidas e induzir modificações na circuitaria e promover a recuperação desses déficits, torna-se mais difícil (Berardi et al., 2003).

Em contrapartida, progresso relevante tem sido obtido na compreensão da influência da experiência ambiental no desenvolvimento, refinamento e manutenção das conexões neurais. Esses experimentos baseiam-se no enriquecimento ambiental, definido como uma “combinação de complexas estimulações inanimadas e sociais” (Rosenzweig et al., 1978, Sztainberg and Chen, 2010) que aumentam a qualidade de vida do animal através de múltiplas estimulações sensório/cognitivas. Mesmo na fase adulta, o enriquecimento ambiental atua sobre o córtex cerebral de animais amblíopes, recuperando parte de suas funções visuais (Sale et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais a estimulação ambiental promove esse aumento da plasticidade cortical são multifatoriais, e permeiam funções de inibição cortical, alterações nas expressões de neurotrofinas e alterações nos componentes da matriz extracelular. O apropriado entendimento da fisiologia do enriquecimento ambiental sobre o sistema nervoso central pode ser potencialmente utilizado como uma estratégia não-invasiva para recuperar *déficits* induzidos durante o desenvolvimento ou mesmo para tratar doenças neurológicas.

1.1 Período Crítico

Períodos críticos têm sido reconhecidos por neurobiologistas por quase um século, sendo associados a diferentes fenômenos de plasticidade em diversas espécies e sistemas sensoriais. Sua presença foi descrita virtualmente em todas as espécies, de *Drosophila* (Barth et al., 1997) à humanos e claramente demonstrada tanto no sistema visual, quanto auditivo e somatossensorial (Berardi et al., 2000).

O período crítico é definido como uma forma extrema de sensibilidade do sistema nervoso, quando ele é capaz de responder e modular sua atividade e conexões baseado nas experiências naturais, particularmente durante o período pós-natal (Hensch, 2004). Essas janelas temporais existem quando determinados circuitos cerebrais são particularmente receptivos à aquisição de certas informações ou mesmo necessitam desses sinais para o seu desenvolvimento normal.

Assim, o período crítico é uma fase da vida do animal dedicada à formação e consolidação das conexões neurais, possuindo interessantes correlações: quanto maior

a expectativa de vida, maior a duração do período crítico; quanto maior o cérebro, proporcionalmente ao tamanho da espécie (assumindo-se uma maior complexidade), maior a janela de duração do período crítico; e a coincidência temporal entre a maturação sensorial de diferentes sistemas com o término do período crítico (Berardi et al., 2000).

Duas abordagens teóricas têm sido investigadas para revelar os mecanismos que limitam esse período de extrema plasticidade. Na primeira, supõe-se que o sistema nervoso não perde sua capacidade de adaptação e plasticidade sináptica, mas sim, que seja necessário uma ativação neural dinâmica e de maior intensidade para efetivamente ativar esse processo. Outros defendem a teoria de que uma série de fatores inibitórios atuam diminuindo a plasticidade, prevenindo assim, uma reorganização em larga escala da circuitaria, e então, encerrando estruturalmente a janela do período crítico. Atualmente, evidências sugerem que as duas teorias parecem coexistir agindo concomitantemente a partir da ação de diversos neuroreguladores (Hensch, 2003).

Hensch (2004) enumera nove fatores cruciais que atuam determinando a janela temporal do período crítico: competição funcional entre as aferências; papel da atividade elétrica; consolidação estrutural de determinadas vias neurais; regulação do início e duração do período crítico, não apenas pela idade, mas também pela experiência; diferentes períodos e diferentes durações para diferentes sistemas; diversidade de mecanismos moleculares reguladores; papel crucial do sistema inibitório; influência da atenção e motivação; e o potencial de reativação durante a fase adulta.

Dessa forma, as janelas temporais do período crítico são reguladas por uma grande variedade de determinantes moleculares, incluindo neurotrofinas, variações na composição das subunidades dos receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), circuitos inibitórios do ácido δ -aminobutírico (GABA) e maturação das redes perineuronais (RPNs) (Berardi et al., 2000).

Dentre os diversos supostos determinantes, a alteração na expressão de diferentes subtipos de neurotrofinas está correlacionada com mudanças na duração do período crítico. Essas neurotrofinas têm como principal função no sistema nervoso

modular a transmissão sináptica, sendo sua expressão regulada pelo desenvolvimento e dependente da atividade elétrica (McAllister et al., 1999). Tem sido demonstrado que o bloqueio do NGF (Neuronal Growth Factor) prolonga a duração do período crítico (Domenici et al., 1994) e que a superexpressão de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) acelera o desenvolvimento do sistema visual, antecipando o fechamento do período crítico através de um desenvolvimento precoce da circuitaria de interneurônios inibitórios (Huang et al., 1999).

Esse sistema de circuitaria inibitória desempenha importante papel na regulação do início e do término das janelas de plasticidade (Markram et al., 2004). Os interneurônios GABAérgicos são cruciais na sinalização elétrica dos circuitos corticais e na regulação da plasticidade sináptica, sendo sua função no córtex visual primário essencial para a estabilização fisiológica que proporciona a plasticidade dentro das suas colunas de dominância (Lazarus and Huang, 2011).

Outro fator associado à regulação dessa janela de plasticidade é a maturação das redes perineuronais, que coincide temporalmente com o fechamento do período crítico. A completa maturação dos componentes da matriz extracelular, entre eles o sulfato de condroitina, possui uma ação inibitória sobre a plasticidade dependente de experiências e há evidências de que após a sua remoção em animais submetidos à privação monocular, ocorre um remodelamento das conexões corticais a favor do olho não-privado (Pizzorusso et al., 2002).

1.2 A Matriz Extracelular

O espaço virtual compreendido entre as células do sistema nervoso é preenchido com os componentes da matriz extracelular (MEC), formada por uma complexa rede de proteínas e carboidratos secretados tanto por neurônios quanto por células gliais que regulam diversas interações estruturais e funcionais (Faissner et al., 2010). A matriz extracelular do sistema nervoso difere da MEC de outros tecidos por suas propriedades bioquímicas, composição molecular e complexidade funcional (Ruoslahti, 1996).

A matrix extracelular do sistema nervoso central contém uma complexa mistura de proteoglicanos, tenascina, fibronectina e hialurônio. O componente básico da MEC do cérebro são polissacarídeos não-ramificados de ácido hialurônico, que atuam como

uma espinha dorsal para o recrutamento de proteoglicanos – um grupo de glicoproteínas com ligações covalentes de glicosaminoglicanos sulfatados (GAG). Dentro do sistema nervoso central, há uma grande variedade de glicosaminoglicanos que são codificados por diversos genes, sendo a maioria constituída principalmente por sulfatos de condroitina ou cadeias de heparan sulfato (Bandtlow and Zimmermann, 2000, Yamaguchi, 2000, Rauch, 2004).

Em seu clássico trabalho de 1893, Camilo Golgi (1893) foi o primeiro a descrever umas das principais especializações da MEC no SNC, as redes perineuronais (RPNs), que segundo Golgi constitui ‘uma delicada cobertura, de estrutura reticular, mas também em formato de pequenos ladrilhos ou de um envelope ininterrupto, que circunda o corpo celular de todas as células nervosas e continua por suas extensões protoplasmáticas (dendritos) até arborizações de segunda e terceira ordem’.

Assim, essas RPNs são constituídas basicamente por agregados de macromoléculas de proteoglicanos, circundando o soma neuronal e seus dendritos proximais, e cuja distribuição e composição pode variar de acordo com a área estudada, ou mesmo entre as espécies (Miyata et al., 2005). O neocórtex contém um grande número de redes perineuronais nas áreas motoras e sensoriais, enquanto que essas redes são bem menos numerosas no córtex límbico e em áreas associativas (Bruckner et al., 1994, Hausen et al., 1996).

Os componentes da MEC sofrem significantes mudanças durante o desenvolvimento do SNC. Em camundongos, as redes perineuronais são inicialmente observadas a partir do 4º dia pós-natal no tronco encefálico, e apenas a partir do 14º dia no córtex cerebral. Entretanto, ao se aproximarem do término do período crítico, por volta do 21º dia de vida, o padrão de marcação atinge sua maturidade (Bruckner et al., 2000).

No cérebro de mamíferos, inicialmente uma forma juvenil da MEC é sintetizada durante a fase tardia do desenvolvimento embrionário e período crítico pós-natal. Por exemplo, o neurocan e versican (V0 e V1) são constituintes proeminentes da matriz durante essa fase, no entanto, ao atingirem a fase adulta, esses componentes são gradativamente substituídos por outros glicosaminoglicanos como o brevican, versican

V2, agregam fosfacan e tenascina-R (Milev et al., 1998, Carulli et al., 2007, Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). A distribuição e regulação dos diferentes tipos de glicosaminoglicanos que constituem a cadeia das redes perineuronais, é regulada tanto temporalmente durante as fases do período crítico, assim como, é dependente da região encefálica estudada, estando sua distribuição associada à maturação de vias específicas no SNC durante o período crítico (Lander et al., 1997).

Diversos métodos de marcação têm sido recentemente utilizados para a visualização das RPNs, entre eles, a aglutinina da *Wisteria floribunda* é um dos métodos mais frequentemente utilizados (Seeger et al., 1996). Wegner et al. (2003) demonstrou que a floribunda revela três tipos celulares com diferentes características morfológicas no córtex parietal: redes perineuronais não-piramidais, piramidais e redes difusas (Figura 1). As redes envolvendo células não-piramidais, constituem o maior grupo de RPNs no córtex (67% na área Par1 em ratos). Essas redes envolvem o soma celular, porções proximais dos dendritos e o segmento inicial dos axônios de neurônios não-piramidais (Figura 1A). Circundam grupos de neurônio expressando marcadores específicos para interneurônios GABAérgicos, entre eles as células parvalbumina positivas. Aproximadamente 1/3 das RPNs (29% na área Par1) demonstrou uma estrutura morfológica de neurônios piramidais, principalmente nas camadas II-III e V. Essas redes formam uma fraca marcação delineando a forma da célula piramidal, incluindo o segmento inicial do axônio e a porção proximal do dendrito apical (Figura 1B), sendo células excitatórias, glutamato positivas. As redes perineuronais difusas, constituem um pequeno grupo, de aproximadamente 4%, encontradas principalmente na camada VI, acima da substância branca, e se caracterizam por não demonstrarem um claro contorno da morfologia celular, com uma intensa marcação pela floribunda (Figura 1C) (Wegner et al., 2003).

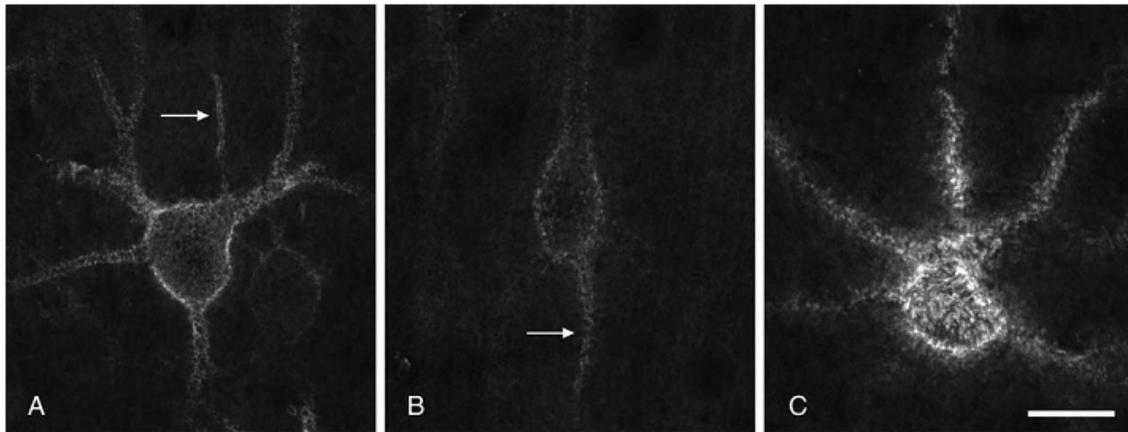


Figura 1. Três tipos de redes perineuronais mostrados pela marcação com *Wisteria floribunda*. A. Redes perineuronais contornando nitidamente um neurônio não-piramidal. A estrutura reticular é visivelmente identificada ao redor do corpo celular, das porções proximais dos dendritos e do segmento inicial do axônio; B. Redes perineuronais circundando uma célula piramidal da camada III do córtex parietal, caracterizada pela estrutura delicada e menor intensidade de marcação; C. Rede perineuronal do tipo difusa, na camada VIb. As setas indicam o segmento inicial do axônio. Escala: 20 μ m. Adaptado de Wegner et al., 2003

Assim, as redes perineuronais formam um envelope ao redor do corpo celular e definem um microambiente que se estende aos dendritos proximais e ao segmento inicial do axônio. Recentemente, hipóteses têm sido levantadas sobre o papel da matriz extracelular no sistema nervoso: moléculas-guia para axônios em crescimento; concentradores de fatores de crescimento ao redor de certos neurônios; manutenção das relações intercelulares e estabilização das sinapses formadas; e integração dos *inputs* sinápticos e propriedades elétricas da membrana (Hendry et al., 1988, Mulligan et al., 1989, Celio et al., 1998, Beneyto et al., 1999, Viggiano, 2000, Bruckner et al., 2006). De fato, em cérebros embrionários e jovens, a MEC é mais permissiva a processos como neurogênese, gliogênese, migração celular, crescimento axonal, sinaptogênese e reorganizações na circuitaria sináptica (Bandtlow and Zimmermann, 2000, Faissner et al., 2010), enquanto que em cérebros adultos, a MEC atua como um fator inibitório à regeneração e à grandes reorganizações no SNC adulto (Fawcett, 2009).

1.3 Organização e Laminação do Córtex Visual

Durante muitos anos, o estudo do córtex visual de camundongos foi negligenciado a favor do estudo do sistema visual de um de seus maiores predadores, o

gato. Apenas recentemente, com o avanço da tecnologia envolvendo animais transgênicos, o interesse pelo sistema visual desses animais aumentou, principalmente em pesquisas sobre desenvolvimento, plasticidade e função do córtex visual.

O córtex visual primário do camundongo (área 17 ou córtex estriado) é citoarquitectonicamente uma zona distinta na porção dorsal do pólo occipital, com aproximadamente 2 mm de largura e 2.5 mm de comprimento, que contem uma representação retinotopicamente organizada do campo visual contralateral (Caviness, 1975). O campo visual superior é representado caudalmente e o campo nasal representado lateralmente. Entre 30-40°, na representação nasal, há uma pequena expansão na representação cortical, que corresponde a um aumento na densidade das células ganglionares na porção central da retina (Wagor et al., 1980, Drager and Olsen, 1981).

Uma notável diferença entre as células dos córtices visuais de camundongos, gatos e macacos é o tamanho do campo receptivo, que correspondem, respectivamente à 14°, 1° e menos do que 1° de diâmetro de campo receptivo. Em camundongos, essas células se dividem funcionalmente em dois grupos: àquelas que são ativadas quanto à orientação do estímulo visual; e aquelas que compõem uma população de células não-orientadas (cerca de 60%), cujo campo visual pode ser caracterizado como centro-periferia ou campos que respondem à estímulos com movimentos rápidos (para revisão ver Hubener, 2003).

Devido à posição lateralizada dos olhos, o campo de visão binocular é relativamente pequeno em camundongos e é encontrado preferencialmente entre 30-40° na representação nasal do campo visual (Wagor et al., 1980). Apenas uma fração das células ganglionares da retina, aproximadamente 10%, não decussam para o hemisfério contralateral no quiasma óptico (Drager and Olsen, 1980). Assim, a região binocular ocupa cerca de 30% da área do córtex visual primário, e a maioria dos neurônios nessa região podem ser estimulados por ambos os olhos, apesar de haver uma forte dominância pelo olho contralateral (Gordon and Stryker, 1996) (Figura 2).

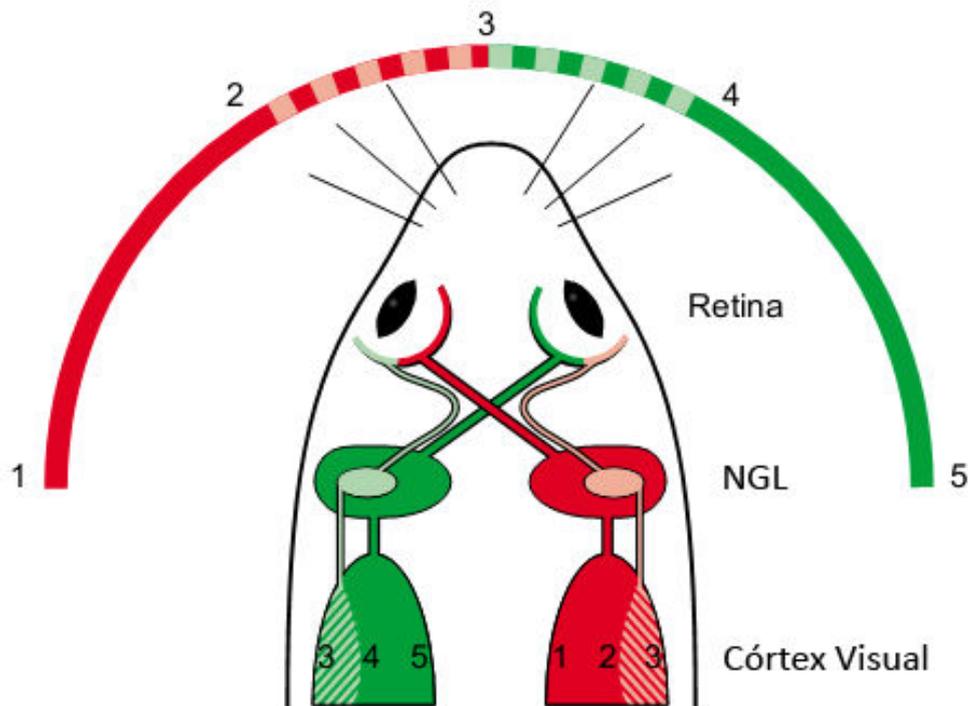


Figura 2. Desenho esquemático do sistema visual do camundongo. Os hemisférios visuais esquerdo e direito são representados em vermelho e verde, respectivamente. O campo visual binocular na região central é visto pelas retinas temporais de ambos os olhos. Fibras da porção temporal de cada retina (vermelho claro e verde claro) projetam para o núcleo geniculado lateral (NGL) ipsilateral. A grande maioria das células ganglionares da retina (mais de 90%) decussam no quiasma óptico. No córtex visual primário, respostas binoculares são encontradas no terço lateral. Os números no campo visual e no córtex representam a organização retinotópica. Adaptado de Gordon e Stryker, 1996.

Outra característica marcante da arquitetura funcional do córtex visual em mamíferos é sua organização colunar, que responde às propriedades como orientação ou dominância ocular (Hubel and Wiesel, 1977). Entretanto, em camundongos, técnicas de injeção com traçadores transneurais e imageamento óptico, falharam até o momento em revelar a presença de tais colunas de dominância (Antonini et al., 1999, Schuett et al., 2002). Assim, supõe-se que em camundongos, ou as colunas são muito pequenas para serem detectadas por tais técnicas ou a segregação entre as propriedades receptivas das colunas são incompletas.

Tal como o córtex de outros mamíferos, o do camundongo é constituído por uma distinta estrutura laminar, cujas camadas celulares são separadas por zonas preenchidas por axônios e dendritos. Muito da literatura do córtex visual de roedores

foi produzida em ratos e por sua semelhança organizacional com o do camundongo, ela será aqui utilizada como referência para descrição da laminação e conexões corticais.

Como mostrado na figura abaixo (Figura 3), as seis camadas corticais são mais facilmente visualizadas através da coloração de Nissl, no plano coronal. A camada I, mais externa, é conhecida por sua escassez de neurônios. Abaixo, a camada II, possui uma faixa mais externa com neurônios mais compactados seguida de uma região onde os corpos celulares se tornam mais espaçados, estendendo-se por aproximadamente 1/3 do córtex, até o limite inferior da camada 3. Não existe um limite preciso entre as camadas II e III, e elas são frequentemente referidas como camada II/III. O limite entre a camada III e a camada IV é nítido, uma vez que os corpos celulares dos neurônios da camada IV são menores e densamente compactados. Por esta razão, a camada IV é conhecida como camada granular. A borda inferior da camada IV localiza-se aproximadamente na metade do córtex. Abaixo dela a camada V, facilmente identificável por possuir corpos celulares de tamanhos grande e médio, dispersos pelo córtex. A camada V é bem distinta da porção superior da camada VI, onde os neurônios possuem corpos menores mais densamente compactados, semelhantes às células da camada IV. A porção superior da camada VI, conhecida como VIa, estende-se até aproximadamente a camada de substância branca, onde forma uma fina camada composta de neurônios alongados, que constituem a camada VIb (Peters, 1985).

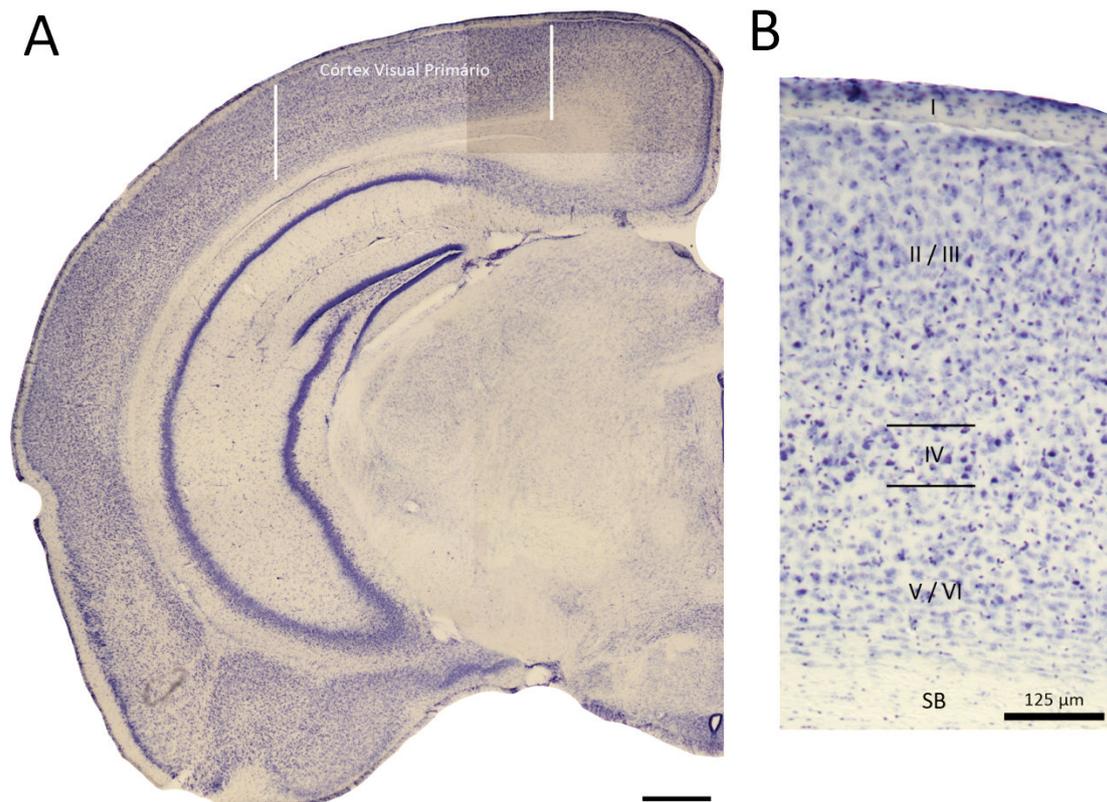


Figura 3. A. Fotomicrografia de uma secção coronal de cérebro de camundongo corada com Nissl, evidenciando os limites do córtex visual primário (V1). Escala: 500 μ m. B. Fotomicrofotografia em maior aumento de V1, identificando as seis camadas celulares que o compõe. SB: Substância Branca. Escala: 125 μ m.

As células do córtex visual se distribuem laminarmente de acordo com o tipo do seu campo receptivo. As camadas II/III contêm grande parte das células ativadas quanto à orientação espacial do estímulo, enquanto que os neurônios da camada IV são preferencialmente aqueles que possuem campo receptivo circular tipo centro-periferia (Mangini and Pearlman, 1980). Na camada V encontram-se as células com grandes campos receptivos, ativadas principalmente por estímulos em rápido movimento e que possuem projeções para o colículo superior (Lemmon and Pearlman, 1981).

Além do córtex visual primário, existem os chamados córtices periestriatais ou áreas visuais extraestriatais, onde são codificadas funções superiores do sistema visual, como reconhecimento de objetos, faces, movimento e profundidade (Orban, 2008). No rato, essa citologia foi inicialmente descrita por Schober e Winkelmann (1975) (áreas 18 e 18a). A área 18 localiza-se medialmente à área 17, enquanto que a área 18a

lateralmente, sendo sua principal distinção do córtex estriado a ausência de uma camada IV bem definida.

Mais recentemente, estudos utilizando métodos ópticos inovadores, registro eletrofisiológico e o uso de neurotraçadores, identificaram as diversas subdivisões corticais em camundongos. Wang e Burkhalter (2007), identificaram um detalhado mapa funcional com quinze áreas de projeção a partir de V1, sendo que pelo menos nove dessas áreas corticais possuem mapas com a completa representação e organização do hemisfério visual. Em outro trabalho, Marshel et. al. (2011) identificaram através de registros em camundongos anestesiados que seis dessas áreas estão relacionadas com ajustes espaço-temporais (Figura 4).

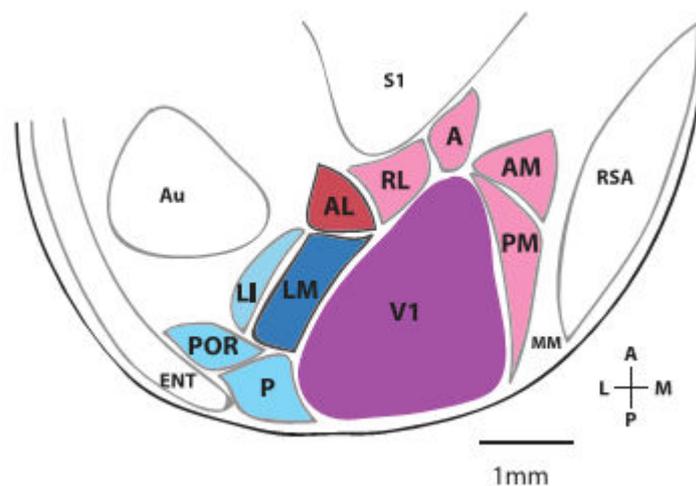


Figura 4. Áreas visuais no córtex do camundongo, mostrando nove áreas extraestriadas circunscritas ao córtex visual primário (V1). A: Área anterior; AL: Área anterolateral; AM: Área anteromedial; Au: Córtex auditivo; ENT: córtex entorhinal; LI: Área laterointermediária; LM: Área lateromedial; P: Área posterior; PM: Área posteriomedial; POR: Área posrinal; RL: Área rostrolateral; RSA: Córtex agranular retrosplenial; S1: Área somatosensorial primária; V1: Área visual primária. Adaptado de Wang and Burkhalter, 2007

1.4 Aferências e Eferências do Córtex Visual

O padrão da representação do campo visual no córtex estriado é definido pelo arranjo das fibras aferentes que chegam ao córtex a partir do tálamo. O tálamo contém os núcleos de retransmissão que transferem as informações da retina ao córtex.

Ribak e Peters (1975) demonstraram que a porção lateral do núcleo geniculado (NGL) projeta para a área 17 ipsilateral e para áreas de transição entre o córtex visual primário e as áreas periestriatais (18 e 18a), sendo a camada IV o principal alvo desses aferentes. Essas regiões periestriatais, no entanto, recebem seus principais aferentes do núcleo lateral posterior (NLP) do tálamo, projetando para as camadas IV, camada III profunda, camada I e camada VI das áreas 18 e 18a (Hughes, 1977).

Existe dessa forma um processamento paralelo da informação visual que chega ao córtex. A principal via projeta do NGL para a área 17, e a partir dessa para as demais áreas periestriatais, enquanto que a outra via é proveniente do NLP, que recebe *inputs* do colículo superior e projeta para o córtex periestriado (Figura 5).

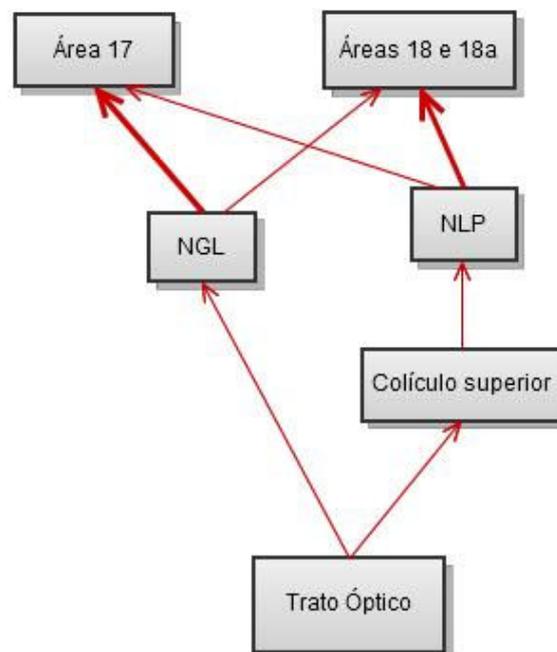


Figura 5. Aferências talâmicas do córtex visual de ratos (Peters, 1975).

É evidente também que o núcleo geniculado lateral recebe conexões recíprocas do córtex visual primário, assim como a área 17 também projeta para o núcleo reticular talâmico (Leong, 1980), colículo superior e para o núcleo geniculado lateral, na sua porção ventral (Nauta and Bucher, 1954, Goodman and Horel, 1966, Montero and Guillery, 1968).

O córtex visual possui um sistema de aferências calosas, que conecta os dois córtices entre os hemisférios. Essas conexões são mais proeminentes nos limites da área 17 com as áreas periestriatais, com poucos aferentes se originando na porção central de V1. Esse *input* é mais intenso no limite da área 17 com a área 18a (lateral) onde está a representação do meridiano vertical em torno do qual se organiza a representação do campo binocular, e assim como na área 18, esses aferentes projetam preferencialmente para duas camadas: parte deles localiza-se entre a camada I e a porção superior da camada IV, enquanto que outros projetam-se preferencialmente para as camadas V e VI (Heimer et al., 1967, Jacobson, 1970, Cipolloni and Peters, 1979).

1.5 Enriquecimento Ambiental

Nas últimas décadas, um relevante progresso tem sido realizado no estudo da influência da experiência ambiental sobre o desenvolvimento, refinamento, plasticidade e manutenção das conexões neurais. O enriquecimento ambiental, proporcionado pelo aumento na qualidade e na intensidade da estimulação dentro das gaiolas, possui promove mudanças estruturais e funcionais no SNC (Renner and Rosenzweig, 1987).

Um conceito moderno de plasticidade neuronal proposto por Hebb (1949), afirma que: *“ao supor que a persistência ou repetição de uma atividade reverberatória tende a induzir mudanças celulares duradouras que promovem estabilidade. (...) quando um axônio da célula A esta próxima o suficiente para excitar a célula B e repetidamente ou persistentemente segue fazendo com que a célula dispare, algum processo de crescimento ou alteração metabólica ocorre em uma ou ambas as células, de forma que aumente a eficácia de A, como uma das células capazes de fazer com que B dispare.”*

Essa teoria hebbiana descreve um mecanismo básico de plasticidade sináptica no qual um aumento na eficiência sináptica surge da estimulação repetida e persistente da célula pós-sináptica. Sua visão de plasticidade foi estendida para diversos outros substratos anatômicos, como sinapses e neuritos, cujas modificações são resultado de mudanças bioquímicas e moleculares.

Ainda no final da década de 40, Hebb foi um dos pioneiros a propor o enriquecimento ambiental como um modelo experimental. Já na década de 60, Hubel e Wiesel iniciaram os experimentos baseados em protocolos de redução ou alteração da experiência sensorial (Wiesel and Hubel, 1965, Hubel and Wiesel, 1970), enquanto que os trabalhos pioneiros de Rosenzweig demonstraram relevante progresso no uso do ambiente enriquecido como modelo de plasticidade (Rosenzweig et al., 1962, Rosenzweig, 1966).

Definido como “uma combinação de complexas estimulações inanimadas e sociais” (Rosenzweig et al., 1978, Sztainberg and Chen, 2010), o ambiente enriquecido consiste em grandes gaiolas, com animais mantidos em grandes grupos, com a oportunidade de desenvolver interações sociais mais complexas. Suas gaiolas possuem ambientes estimulantes com uma grande variedade de objetos, que são modificados frequentemente. O objetivo do ambiente enriquecido é aumentar a qualidade de vida do animal, dando-lhe diferentes oportunidades de estimulações sensório/cognitivas, maior atividade física, maior interação social e aumento do seu comportamento exploratório natural (van Praag et al., 2000).

Kempermann (2002) defende que manter uma vida ativa possui efeitos benéficos sobre a função cerebral, inclusive sob condições patológicas. Para esse autor, o ambiente enriquecido, mantidas as proporções devidas, reproduz em animais experimentais o mesmo tipo de interação que é encontrada na natureza, com um meio em constante mudança, estimulando a atividade exploratória dos animais, buscando comida, água, abrigo e companheiros. Nesse trabalho, Kempermann mostra que em camundongos adultos criados em um ambiente enriquecido, há um aumento em cinco vezes nos fenótipos neuronais, à custa principalmente de astrócitos, estando esse aumento associado a um melhor desempenho nos testes de aprendizado, comportamento exploratório e atividade locomotora. Em nosso laboratório acrescentou-se a essas informações o fato de que a plasticidade astrogliar da formação hipocampal sob influência do ambiente enriquecido estende-se a animais velhos e que esses animais preservam funções cognitivas hipocampo-dependentes (Diniz et al., 2010).

No sistema visual, Sale et. al (2007) demonstraram que ratos adultos submetidos à privação monocular por um longo período, foram capazes de recuperar sua acuidade visual quando criados em ambientes enriquecidos. Esse efeito do enriquecimento ambiental é associado a uma redução da inibição GABAérgica no córtex visual primário, acompanhada de um aumento na expressão de BDNF e redução da densidade das redes perineuronais. Em outro trabalho, Mainardi et. al (2010), mostraram que o ambiente enriquecido potencializa a transmissão tálamo-cortical e a plasticidade no córtex visual primário de ratos adultos, através do aumento na LTP (Long-term Potentiation) nos aferentes tálamo-corticais, acompanhada de um aumento no marcador sináptico Glut-1 e da redução na expressão de proteína vesicular transportadora de GABA (vGAT) (Mainardi et al., 2010). Mais recentemente Cooper e Bear em 2012 reviram as evidências experimentais em camundongos das últimas duas décadas que revelam que a perda inicial da resposta visual na área 17 após a privação monocular é consequência de depressão a longo prazo (LTD) associada à ativação de receptores de NMDA e que as mesmas sinapses dão suporte a LTD ou LTP sendo portanto modificáveis bidirecionalmente (Cooper and Bear, 2012).

Apesar desse progresso notável permanece por ser investigado em detalhe, empregando metodologias sem viés, possíveis relações entre acuidade visual e alterações quantitativas da matriz extracelular do córtex visual primário, subsequentes à privação monocular e a período prolongado de enriquecimento ambiental. Com ênfase nas redes perineuronais de cuja integridade esses fenômenos de potenciação e depressão de longo prazo dependem (Hensch, 2005a), o presente trabalho emprega o fracionador óptico para estimar o número de RPNs nas camadas granular (tálamo-recipiente), supra- (cortico-recipiente) e infragranulares (corticofugais) dos hemisférios visuais primário ipsi e contra-lateral à privação monocular, após período de três meses de enriquecimento ambiental.

1.6 Morfologia Quantitativa

No estudo morfológico, secções histológicas são utilizadas para definir a aparência normal ou anormal do tecido nervoso e características como ‘grande’, ‘pequeno’, ‘muitos’, ‘poucos’, ‘presente’ ou ‘ausente’ são termos frequentemente utilizados para suas descrições. Apesar de muito úteis, tais termos não são suficientes

para testar diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais, particularmente, se tais diferenças forem sutis. Quando utilizada com propriedade, a estereologia é uma ferramenta muito útil para validar ou rejeitar hipóteses experimentais.

Originalmente, o termo estereologia foi cunhado para descrever métodos matemáticos e estatísticos que nos permite extrapolar informações de estruturas tri-dimensionais a partir de secções bi-dimensionais. Entretanto, atualmente os diferentes métodos estereológicos ‘design-based’ (utilizando sondas estereológicas) empregam secções que são analisadas em suas três dimensões. Uma sonda ‘design-based’ indica que tanto as sondas quanto os esquemas de amostragem são definidos *a priori*, de tal maneira que não são levados em consideração fatores como tamanho, forma, orientação e distribuição espacial das células a serem investigadas (West, 2002).

A eliminação da necessidade de informações sobre a geometria das células investigadas nos fornece dados mais consistentes, uma vez que potenciais fontes de erros sistemáticos são eliminados (Gundersen et al., 1988, West, 1993, 2002).

Na maioria dos modelos experimentais não é possível, dependendo do objeto a ser contado e da região de interesse (RI), contar todas as células. Para isso, o método estereológico do fracionador óptico, que combina as propriedades do disector e do fracionador óptico, pode ser utilizado para estimar o número total de neurônios dentro da região a partir de um processo amostral. Espaços virtuais de contagem são plotados de forma sistemática (igualmente espaçados) e randômica (posição da matriz de contagem dentro da secção) dentro das secções eleitas para compor a amostra, e que contêm a região de interesse, todas com a mesma probabilidade de serem amostradas, e então os objetos de interesse são contados baseados em criterios de identificação inequívoca (sem ambiguidade).

Pelo método do fracionador óptico, a estimativa do número total de células dentro de uma região de interesse, pode ser obtida multiplicando-se o número de objetos contados dentro de cada bloco pelos valores de probabilidade da amostra (para revisão ver Schmitz and Hof, 2005). Esses valores dependem de: 1) do número de secções investigadas comparadas com o número total de secções que contem a região

de interesse (“section sampling fraction”); 2) da área dos blocos de contagem comparada a área da matriz de contagem (“area sampling fraction”); e 3) da altura do bloco de contagem comparada a média da espessura da secção após os procedimentos histológicos (“thickness sampling fraction”). A fórmula aplicada é então: $N = \Sigma Q * 1/ssf * 1/asf * 1/tsf$. Onde:

N – número total de objetos;

ΣQ – número de objetos contados;

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

asf – “area sampling fraction” (área do bloco/área da matriz)

tsf – “thickness sampling fraction” (altura do bloco/espessura da secção)

Apesar de diversos trabalhos discutirem alterações corticais decorrentes de manipulações na via visual, como privação monocular, ‘dark-rearing’ ou lesões mecânicas, e de benefícios decorrentes do enriquecimento ambiental, apenas alguns trabalhos utilizaram abordagens quantitativas estereológicas para determinar alterações do número celular decorrente da manipulação experimental (Hilbig et al., 2002, Pizzorusso et al., 2002, Ciucci et al., 2007, Sale et al., 2007).

Entre esses, Cerutti e Chadi (2000) utilizaram um modelo de lesão mecânica no córtex visual primário de ratos e demonstraram um aumento no número de células S100+ no córtex occipital, núcleo geniculado e hipocampo, ipsilaterais à lesão, sugerindo que após lesões traumáticas, a proteína astrogliar S100 pode participar de mecanismos de plasticidade nas vias visuais lesionadas. Em outro trabalho, Miki et. al. (1997), utilizou a estereologia para determinar o número de neurônios e a densidade de sinapses no córtex visual de ratos, reafirmando que a aplicação de métodos estereológicos é mais acurada e consome um menor tempo.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Verificar o papel do enriquecimento ambiental sobre a organização laminar do córtex visual primário, com ênfase na distribuição das redes perineuronais e sobre a

acuidade visual em modelo murino de privação monocular durante o período crítico pós-natal.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Aferir a acuidade visual de animais submetidos à privação monocular durante o período crítico pós-natal e criados em ambientes padrão ou enriquecido;
- Descrever e quantificar estereologicamente a distribuição das redes perineuronais no córtex visual primário, de animais submetidos à privação monocular, sendo eles criados em ambiente padrão ou enriquecido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Animais*

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram conduzidos de acordo com as recomendações contidas na publicação “Principles of Laboratory Animal Care” (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>, 2011) e aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Camundongos suíços albinos fêmeas, com aproximadamente 15 dias de gestação foram doados pela colônia do Instituto Evandro Chagas (Ananindeua, PA) e transportados para o biotério do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará. Os animais foram monitorados diariamente e o dia do nascimento da ninhada era determinado como D0. No sexto dia de vida (D6) os animais eram separados por sexo, e para cada nutriz foram formadas ninhadas com seis filhotes fêmeas. Todos os animais eram mantidos em gaiolas de plástico, em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12:12h e acesso *ad libitum* à água e comida.

3.2 Formação dos Grupos Experimentais

No 10º dia de vida (D10), quando os olhos ainda não estão abertos, 16 filhotes foram submetidos ao procedimento de sutura da pálpebra do olho direito para constituírem o grupo com privação monocular (*M*). Para tal, os animais foram anestesiados com uma solução de Avertina (2,2,2-tribromoetanol) na dose de 0,08ml/5g de peso corpóreo, via intraperitoneal, e quando os reflexos nociceptivos não eram mais observados à estimulação, era realizada a limpeza com álcool 75% e tricotomia da região periocular direita, seguida pela ressecção da musculatura periorbicular e sutura das bordas remanescentes das pálpebras com fio de sutura nylon 5-0. Para evitar a incidência de infecções, uma gota de colírio antibiótico (sulfato de neomicina 3,5mg/fosfato dissódico de dexametasona 0,1%) era administrado no olho suturado de 12/12 h durante um período de 3 dias após a sutura. Após o procedimento, os animais eram mantidos em gaiolas individuais para recuperação pós-anestésica e retornavam para a gaiola com a sua nutriz aproximadamente 8 h após a anestesia, quando apresentavam completa recuperação. Os animais eram monitorados diariamente para assegurar que as pálpebras permaneceriam fechadas e caso fosse verificada alguma abertura até o 21º dia pós-natal (D21), os animais eram anestesiados novamente para correção da sutura. Aqueles animais que após o período de desmame apresentaram mínima abertura palpebral foram excluídos do experimento (Figura 6).

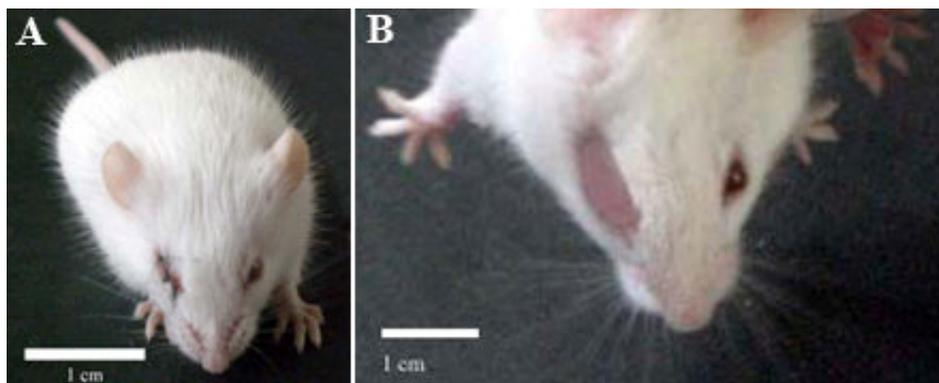


Figura 6. A. Animal com 10 dias de vida, imediatamente após a sutura da pálpebra direita. B. Animal com 21 dias de vida, 11 dias após o procedimento de privação monocular. Escala: 1 cm.

Para a constituição do grupo controle, os demais animais não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico durante esse período, e constituíram o grupo binocular (*B*, $n = 16$).

O desmame foi realizado no 21º dia pós-natal (D21) e os animais foram então reagrupados da seguinte forma: binocular/ambiente padrão (*B.AP*, $n = 06$), binocular/ambiente enriquecido (*B.AE*, $n = 10$), monocular/ambiente padrão (*M.AP*, $n = 06$) e monocular/ambiente enriquecido (*M.AE*, $n = 06$).

O ambiente padrão refere-se à gaiolas plásticas brancas de PVC (dimensões: 12.3 x 17.3 x 27.7 cm) em que eram mantidos apenas dois animais por gaiola, sem qualquer tipo de enriquecimento para que houvesse o menor estímulo físico e/ou cognitivo possível. Enquanto que nas gaiolas do ambiente enriquecido (dimensões: 16 x 31.1 x 46 cm) eram mantidos cinco animais por gaiola, equipadas com uma variedade de brinquedos coloridos, rodinhas de correr, escadas, cordas e túneis para estimulação visual, somatossensorial, motora e da atividade exploratória (Figura 7). Semanalmente, os objetos do ambiente enriquecido eram trocados, no intuito de manter a novidade na estimulação ambiental dos animais.

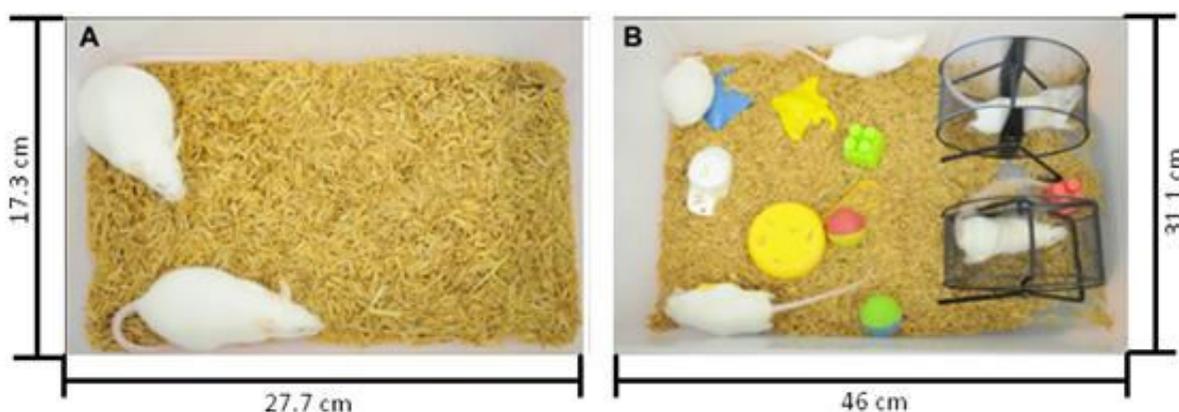


Figura 7. Fotografias de gaiolas de alojamento dos animais, com suas dimensões. A. Ambiente padrão; B. Ambiente enriquecido

Os animais eram mantidos por um período de três meses nas diferentes condições de alojamento (ambiente padrão ou enriquecido). Ao término desse período, os animais do grupo *M* (Figura 8) eram anestesiados e submetidos à reabertura da pálpebra direita. Após a recuperação pós-operatória e tratamento durante 3 dias com

colírio antibiótico profilático para evitar processos infecciosos, todos os animais foram submetidos ao teste de acuidade visual e posteriormente perfundidos (ver abaixo).



Figura 8. Animal com três meses de vida, 80 dias após a sutura da pálpebra direita.

A figura 9 abaixo sumaria as etapas de formação dos grupos experimentais e procedimentos relacionados ao protocolo empregado.

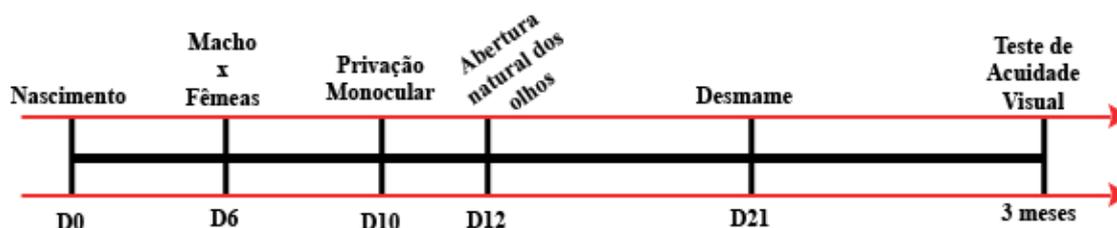


Figura 9. Esquema de linha do tempo ilustrado as diversas etapas durante a formação dos grupos e procedimentos experimentais.

3.3 *Teste de Acuidade Visual*

A acuidade visual é um dos testes mais amplamente utilizados na avaliação oftalmológica, onde são fornecidas informações a cerca das bases anatômicas e fisiológicas do sistema visual. Associada às situações clínicas, existem regras rigorosamente enquadradas em leis da física, as quais todos os sistemas ópticos devem estar aderidos: teorias relativas à transmissão de informações de objetos para imagens, a estrutura ocular como um dispositivo óptico e os fotoreceptores retinianos como a primeira camada de transferência de informações para o fluxo neural.

Questionamentos sobre a resolução espacial e a acuidade visual emergem quando dois alvos são adjacentes o suficiente para que suas funções de difração se sobreponham – em uma determinada localização da imagem, um fóton capturado tem a probabilidade de ter sido originado de um ou outro alvo, proporcionalmente à altura da sua função de difração. Essa incerteza, distribuída por todo o espaço da imagem, pode ser utilizada para estimar a probabilidade de uma dada distribuição ser resultado de um único objeto ou de um par de objetos muito próximos, de mesma luminância (Harris, 1964).

Dessa forma, geralmente refere-se à acuidade visual como a função que exprime a capacidade discriminativa entre duas formas ou o método com que se mede o reconhecimento da separação angular entre dois pontos no espaço. Para revisão ver Westheimer, G. (2009)

No presente trabalho, para avaliação da acuidade visual dos animais experimentais, foi realizado o teste visual aquático de escolha forçada, que consiste em uma tarefa visual discriminativa de escolha forçada com duas alternativas, descrito inicialmente por Prusky e colaboradores (2000). O teste é baseado em uma combinação dos princípios de funcionamento dos testes da caixa de Thompson e do labirinto aquático de Morris.

3.3.1 O Aparato

O aparato é formado por um tanque de forma trapezoidal (Figura 10**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), no qual uma das extremidades é separada por uma parede divisora de 46 cm em dois braços (direito e esquerdo). Na parede oposta do tanque, são posicionadas duas telas digitais de 10.4" (Powerpack, DPF-1040) onde são projetadas as pistas visuais. Em uma das telas a imagem é composta por barras claras e escuras verticais, de frequência espacial conhecida, indicadora da posição de uma plataforma escondida sob a água em um dos braços. A função de distribuição espacial de luminância para as barras claras e escuras reproduz aquela de uma onda quadrada. Na outra tela, é projetada uma imagem cinza, de mesma luminância da pista visual (0.93 cd/m^2). A luminância foi aferida através do de um espectrofotômetro (Tektronix J17).

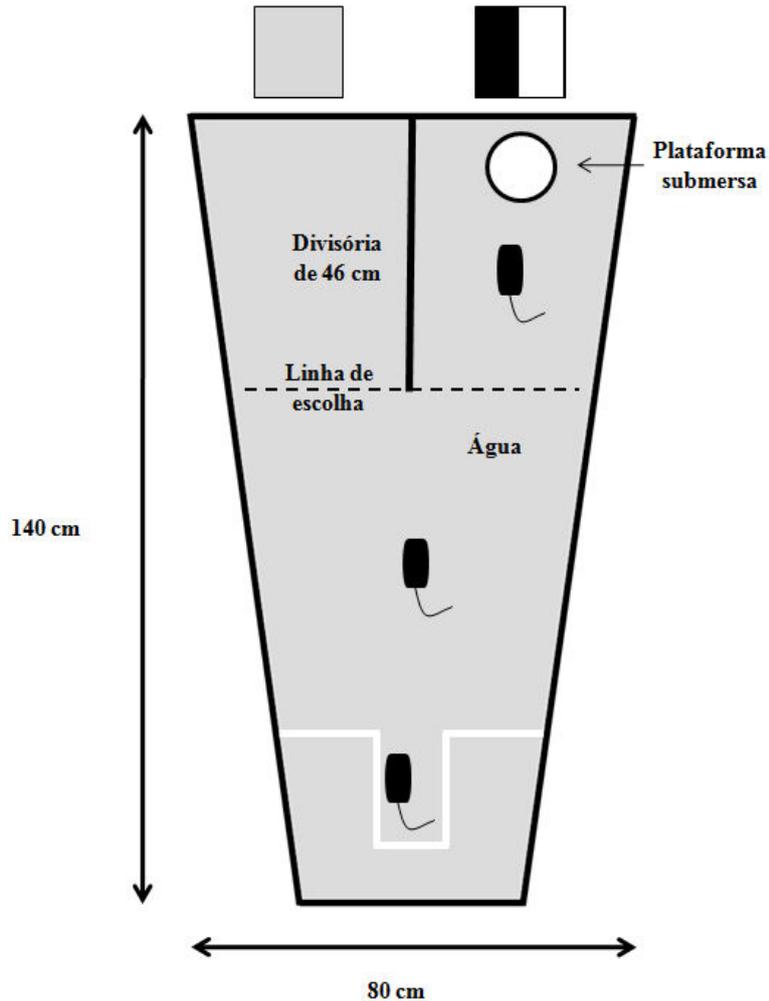


Figura 10. Desenho esquemático e componentes do teste visual aquático de escolha forçada (adaptado de Prusky et al., 2000).

3.3.2 A Tarefa

O teste consiste em três fases: fase de modelagem, fase de treinamento e a fase de teste.

- Fase de Modelagem

Na primeira fase, os animais são modelados gradualmente a localizar a plataforma escondida sob a tela que projeta a imagem de menor frequência espacial (0.06 ciclos/grau). Na primeira tentativa, o animal é liberado, de frente para a tela, a apenas alguns centímetros distante da plataforma. Após ser liberado, a maioria dos

animais nadou diretamente para frente, tocando a plataforma, e então subindo nela. Eles permaneciam na plataforma por aproximadamente 5 segundos e então retornavam para suas gaiolas. Nas tentativas seguintes, a localização da plataforma e da pista visual era alternada entre lado direito e esquerdo do aparato, sempre juntas, sendo que o animal era liberado a distâncias gradativamente maiores. Cada animal foi submetido a 15 entradas, sendo que ao final do primeiro dia, o animal era liberado da extremidade oposta do aparato e quase sempre nadava diretamente em direção à plataforma.

- Fase de Treinamento

Nessa etapa, o animal era condicionado a distinguir entre a pista visual de menor frequência espacial (~ 0.06 ciclos/grau) e uma imagem homogênea em tom de cinza, de mesma luminância. A posição da pista visual e da plataforma foi determinada de forma pseudo-randômica, onde não era permitido mais do que três tentativas consecutivas no mesmo lado do aparato. Em todas as tentativas o animal era liberado da extremidade oposta e tinha que nadar em direção à pista visual. Caso ele ultrapassasse o plano perpendicular à divisória e explorasse o lado do tanque que continha a imagem cinza, essa tentativa era considerada como um erro. Todos os animais realizaram no máximo 20 tentativas por dia, sendo que ao obterem uma porcentagem de acerto maior ou igual 70%, eles poderiam então ser submetidos à terceira fase do teste.

- Fase de Teste

Para essa fase, foi adotado um método de limitação do procedimento para minimizar o número de respostas incorretas pelo animal: a cada acerto, eram realizados pequenos aumentos na frequência espacial da pista, até que a habilidade do animal de distinguir entre a imagem cinza e a pista visual alcançasse o padrão de aleatoriedade ou 50% de acerto. Outra sequência pseudo-randômica para determinar qual monitor iria projetar a pista visual foi gerada. O animal era liberado da extremidade oposta e tinha que nadar até a plataforma localizada sob a pista visual. O tempo máximo de cada tentativa era de 60 segundos. Caso o animal fizesse uma escolha correta (entrasse diretamente no lado que continha a pista visual/plataforma), a frequência espacial do

estímulo era aumentada na tentativa seguinte. Esse procedimento continuava para as demais frequências espaciais até que um erro fosse cometido.

Caso o animal errasse, tentativas adicionais eram executadas até que o animal realizasse quatro acertos consecutivos ou sete escolhas corretas em um bloco de dez tentativas. Se o animal não alcançasse esse critério, era então determinado o seu limite de identificação da pista visual, e conseqüentemente sua acuidade visual. Em torno de 15 frequências espaciais diferentes foram utilizadas nesse teste (variando de ~ 0.06 à ~ 1.56 ciclos/grau).

3.4 Perfusão e Procedimentos Histológicos

Ao fim do teste comportamental, todos os camundongos foram pesados e anestesiados com Avertina (2,2,2-tribromoetanol, 0.8 ml/5 g peso corpóreo, intraperitoneal), perfundidos por via transcardíaca com solução salina heparinizada (5.000.000 UI/litro) por 10 minutos, seguido por paraformaldeído 4% em tampão fosfato, 0.1M, pH 7.2-7.4 por 30 minutos. Seguiu-se a craniotomia para retirada do encéfalo e seccionamento coronal em vibrátomo a 70 µm de espessura, sendo os cortes coletados serialmente (1:5) para a realização da técnica histoquímica.

3.4.1 Histoquímica para Lectina Wisteria floribunda (LWF)

Um grupo de secções de cada animal foi selecionado para ser reagido para a lectina de *Wisteria floribunda* (Vector Laboratories[®]), segundo o protocolo a seguir: as secções selecionadas foram lavadas 3 vezes em tampão Tris Triton 5% por 5 minutos e incubadas por 20 minutos na mesma solução. Em seguida, as secções foram incubadas por 12 horas em solução de lectina diluída em Tris Triton 5% (1:222). Após 3 lavagens em tampão Tris 0,1M de 2 minutos, as secções foram incubadas em ABC (Avidin-Biotin Peroxidase Complex, Vector Laboratories[®]) por uma hora e em seguida lavadas 3 vezes em tampão Tris 0,1M por 2 minutos. A peroxidase foi então revelada seguindo protocolo da glicose oxidase-diaminobenzidina-níquel (Solução GND: 0,6 mg/ml DAB (3,3 Diaminobenzidina), 2,5 mg/dl Cloreto de Níquel-Amônio e glucose oxidase). Todas as etapas do procedimento foram realizadas sob suave e constante agitação. Após as lavagens para interromper a reação, as secções foram montadas em lâminas

gelatinizadas, desidratadas em álcool e xileno e seladas com lamínula e meio de inclusão (Entelan, Merck).

3.5 Quantificação Estereológica

As análises estereológicas no córtex visual primário, ipsi- e contralateral à privação ocular, foram realizadas no Laboratório de Investigação em Neurodegeneração e Infecção, Hospital João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, através do programa StereoInvestigator (MicroBrightField[®], Williston, VT, USA) integrado à um microscópio óptico Nikon Eclipse 80i, com platina motorizada para os eixos X, Y e Z e conectado à um computador, onde os dados das coordenadas tri-dimensionais foram armazenadas e os métodos estereológicos aplicados.

Toda investigação estereológica é iniciada com a identificação inequívoca dos limites da região de interesse. Em camundongos, os limites das camadas granular, supragranular e infragranular do córtex visual primário (V1) podem ser facilmente identificados e delineados em secções marcadas pela lectina *Wisteria floribunda* (Figura 11).

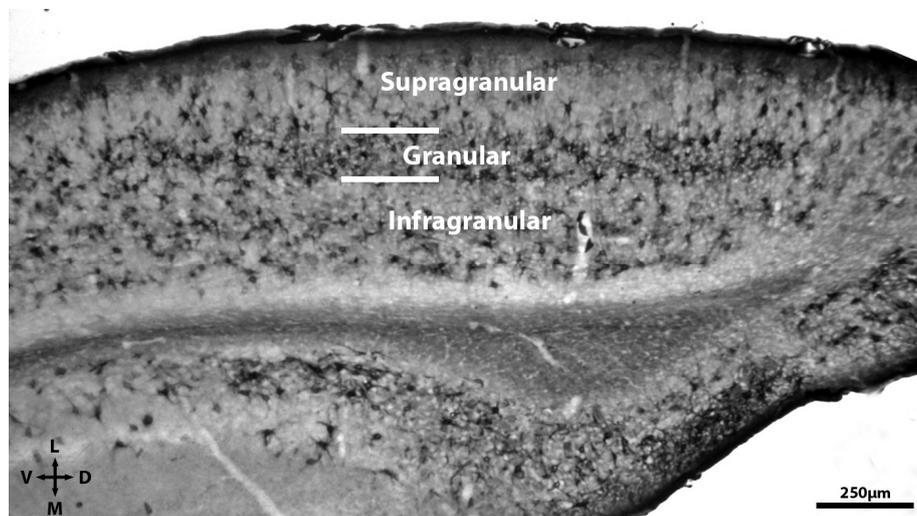


Figura 11. Fotomicrografia do córtex visual primário de camundongos reagidos para lectina *Wisteria floribunda* evidenciando os limites de V1 e sua organização laminar. Camada supragranular: I, II e III; Camada granular: IV; Camada infragranular: V e VI. L: Lateral; V: Ventral; D: Dorsal; M: Medial. Escala: 250 µm.

Ao iniciarmos o método de contagem, em uma objetiva de grande aumento (objetiva planapocromática 60X N.A. 1.4; D.F. 0,75 μ m), os blocos de contagem são gerados automaticamente pelo software, em cada um dos pontos de intersecção com a matriz superposta à região de interesse previamente delimitada.

Devido a variações no processamento histológico (microtomia, desidratação, coloração, etc.), podemos encontrar variações de espessura dentro do mesmo corte e para corrigir esse erro, é definida uma zona de guarda, ou seja, a distância entre o topo da superfície da secção e o início do bloco de contagem.

No presente trabalho, os parâmetros estereológicos aplicados para determinar o número total de redes perineuronais no córtex visual primário ipsi- e contralateral à privação monocular estão apresentados abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Protocolo estereológico do método do fracionador óptico, adotado para estimativa de redes perineuronais no córtex visual primário de animais submetidos à privação monocular

<i>Parâmetros Estereológicos</i>	<i>Lectina Wisteria floribunda</i>
Intervalo de contagem (ssf)	1:5
a (caixa) (μ m)	60 x 60
A (Matriz) (X, Y) (μ m)	90 x 90
asf	0,44
Zona de guarda	2 μ m
Altura do bloco de contagem (h)	12 μ m

ssf, “section sampling fraction”, fração amostral do número de secções; a (caixa), área do bloco de contagem (μ m x μ m); A (X,Y), dimensões X, Y da matriz de contagem (μ m x μ m); asf, “área sampling fraction”, fração amostral da área da matriz [a(caixa)/A(X, Y)]; h, altura do bloco de contagem (μ m).

O tamanho da matriz de contagem foi adaptado para alcançar um coeficiente de erro (CE) aceitável. O CE expressa a acurácia da estimativa do número de células, e um valor de $CE \leq 0.05$ foi escolhido como ideal para o presente estudo, uma vez que a variância introduzida pelo metodologia contribui muito pouco para a variância observada no grupo (Slomianka and West, 2005).

3.6 Análise Estatística

A análise estatística paramétrica foi utilizada para avaliar o grau de significância entre os grupos, empregando-se a Análise de Variância (ANOVA) dois critérios e

análises pós-teste Bonferroni, aceitando-se como significantes diferenças com intervalo de confiança $\geq 95\%$ ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1 Acuidade Visual

O teste de acuidade visual demonstrou que tanto durante a fase de modelagem quanto de treinamento, os animais aprenderam a associar a presença da plataforma com a pista visual de menor frequência (0.06 ciclos/grau), e o escape da água.

A acuidade foi determinada pela frequência máxima que cada animal era capaz de identificar, apresentando erros significativos ou acertos aleatórios baseados nos critérios de eliminação do protocolo. Os animais do grupo binocular criados em ambiente padrão (*B.AP*) apresentaram uma acuidade visual de 0.48 ciclos/grau (± 0.1482), enquanto que os animais *B.AE* apresentaram acuidade máxima de 0.996 ciclos/grau (± 0.214).

Os animais submetidos à privação monocular mantidos no ambiente empobrecido das gaiolas padrão (*M.AP*) apresentaram acuidade visual de 0.18 ciclos/grau (± 0.041) e aqueles com privação e criados em ambiente enriquecido (*M.AE*) tiveram acuidade de 0.4 ciclos/grau (± 0.188) (Figura 12).

A análise de variância dois critérios demonstrou que tanto o efeito da condição ocular quanto da condição ambiental são significativos entre os grupos, não havendo no entanto interação entre essas duas variáveis. A condição ocular é responsável por aproximadamente 24.97% da variância total ($F = 7.95$; $p < 0.0114$) e o tipo de ambiente corresponde à 16.85% da variância ($F = 5.36$; $p < 0.0326$).

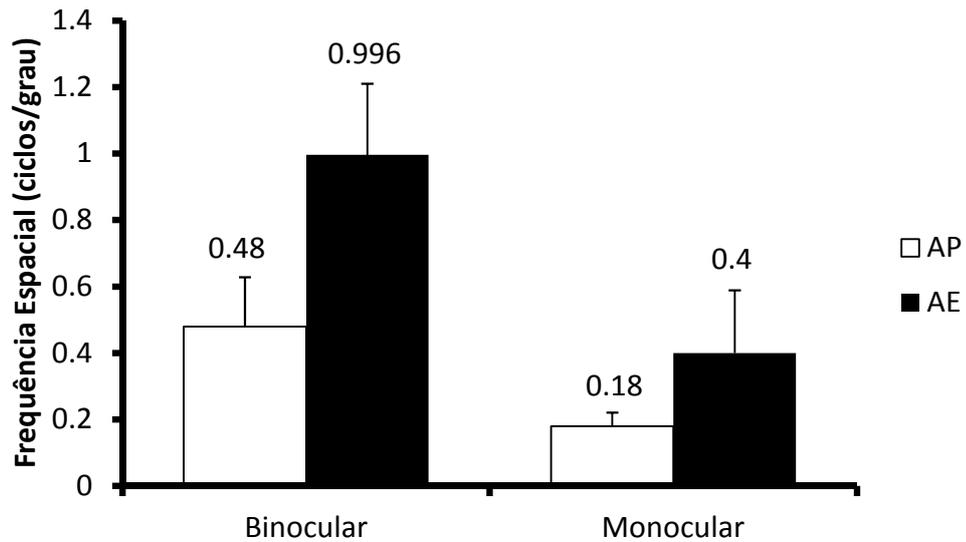


Figura 12. Frequência espacial (ciclos/grau) máxima dos grupos experimentais no Teste de Acuidade Visual. *B.AP* – Binocular.Ambiente Padrão; *B.AE* – Binocular.Ambiente Enriquecido; *M.AP* – Monocular.Ambiente Padrão; *M.AE* – Monocular.Ambiente Enriquecido.

4.2 Redes Perineuronais

Para determinar até que ponto a melhora no desempenho no teste de acuidade visual está associada com a maturação da matriz extracelular no córtex visual primário, o número de células marcadas pela lectina *Wisteria floribunda* foi quantificado nos córtices ipsi- e contralateral de animais submetidos à privação monocular.

A marcação histoquímica para a lectina da *Wisteria floribunda* revelou dois padrões morfológicos de marcação celular no córtex visual (Figura 13): redes envolvendo grandes células, com intensa marcação no corpo e nas ramificações de segunda ordem ou superiores (cabeça de seta) e células fracamente marcadas no seu corpo e apresentando apenas discretas marcações dendríticas de primeira ordem (seta). Esses dois padrões de marcação, foram denominados de Tipo 1 e Tipo 2, respectivamente e quantificados individualmente através do método do fracionador óptico.

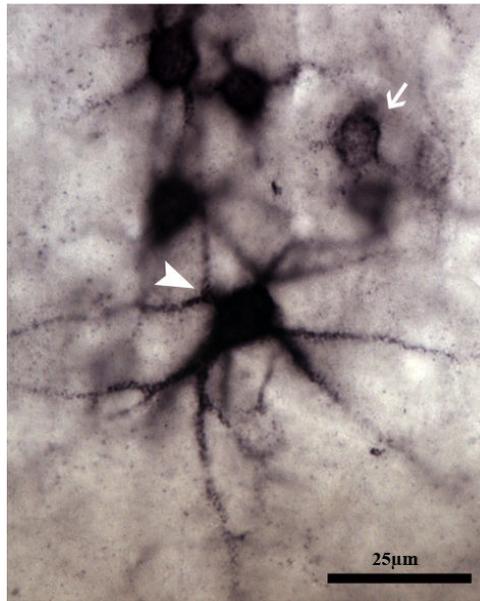


Figura 13. Fotomicrografia da marcação histoquímica para a lectina de *Wisteria floribunda*, identificando os dois tipos de redes perineuronais quantificadas no córtex visual. A cabeça de seta, indica as redes perineuronais Tipo 1, com intensa marcação no corpo celular e ramificações de segunda ordem ou superior; A seta indica as redes perineuronais Tipo 2, com discreta marcação no corpo celular e ramificações primárias. Escala: 25 μm .

4.2.1 Quantificação Estereológica

A análise estereológica dos córtices visuais primários, ipsi- e contralaterais à privação monocular revelou que o ambiente enriquecido aumenta o número de redes perineuronais tipo 1 e de redes totais, em ambos os hemisférios, quando comparados com animais criados em ambiente padrão (ANOVA dois critérios, $p < 0.05$) (Figura 14).

Análises pós-teste demonstraram que os animais do grupo *M.AE* possuem um maior número de RPNs tipo 1 no hemisfério direito (ipsilateral à privação monocular), quando comparados com os animais do grupo *M.AP* (Bonferroni pós-teste, $p < 0.05$).

A quantidade das redes do tipo 2 não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais (ANOVA dois critérios, $p > 0.05$) e não houve diferenças significativas quando analisada a interação entre os hemisférios e a condição ambiental (ANOVA dois critérios, $p > 0.05$).

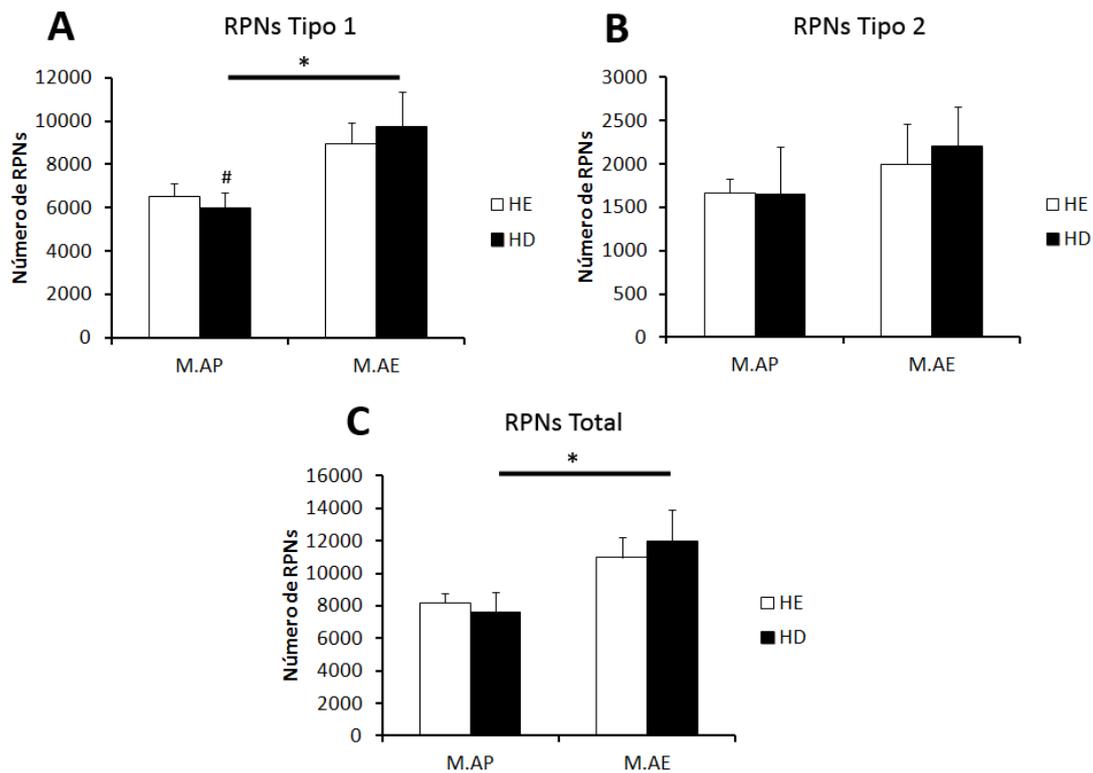


Figura 14. Quantificação estereológica (média \pm erro padrão) das redes perineuronais (RPNs) Tipo 1 (A), Tipo 2 (B) e redes Totais (C) nos córtices ipsi- e contralateral (direito e esquerdo, respectivamente) à privação monocular. *ANOVA dois critérios, $p < 0.05$; # Bonferroni pós-teste $p < 0.05$. *M.AP*, Monocular.Ambiente Padrão; *M.AE*, Monocular.Ambiente Enriquecido; HE, Hemisfério Esquerdo; HD, Hemisfério Direito.

As tabelas abaixo resumiriam os valores de probabilidade do teste ANOVA dois critérios e a porcentagem da variação total para cada uma das variáveis analisadas (

Tabela 2), e as estimativas individuais do fracionador óptico nos dois hemisférios (Tabela 3-4)

Tabela 2. Valores de p e % da variação total no teste ANOVA dois critérios para RPNs tipo 1, tipo 2 e totais, analisando cada uma das variáveis (condição ambiental, hemisfério cerebral e interação).

	Valor de p			% da variação total		
	Interação	Ambiente	Hemisfério	Interação	Ambiente	Hemisfério
RPNs Tipo 1	0.5319	0.0108*	0.9098	1.93	42.20	0.06
RPNs Tipo 2	0.7975	0.3185	0.8217	0.52	8.20	0.40
RPNs Totais	0.5743	0.0215*	0.8738	1.72	36.09	0.14

* $p < 0.05$. O impacto dessa condição experimental é considerado significativo (ANOVA dois critérios).

Tabela 3. Estimativas individuais e coeficientes de variação do número de RPNs nos córtices visuais primário ipsi- e contralateral à privação monocular (direito e esquerdo, respectivamente) dos animais do grupo *M.AP* (Monocular. Ambiente Padrão).

Animal	Hemisfério Esquerdo						Hemisfério Direito					
	<i>N</i> (Tipo 1)	<i>CE</i> (Tipo 1)	<i>N</i> (Tipo 2)	<i>CE</i> (Tipo 2)	<i>N</i> (Total)	<i>CE</i> (Total)	<i>N</i> (Tipo 1)	<i>CE</i> (Tipo 1)	<i>N</i> (Tipo 2)	<i>CE</i> (Tipo 2)	<i>N</i> (Total)	<i>CE</i> (Total)
M.AP 2	6484.1	0.050	2131	0.089	8615.2	0.046	6718.4	0.056	1948.7	0.094	8667.2	0.047
M.AP 3	8032.7	0.048	1502.7	0.0100	9535.4	0.042	4465.2	0.066	555.75	0.175	5020.9	0.062
M.AP 5	5037	0.067	1601.5	0.129	6638.5	0.057	5165.9	0.057	1058.3	0.132	6224.1	0.052
M.AP 6	6513.7	0.049	1424.3	0.105	7938	0.043	7536.7	0.056	3041.8	0.079	10578	0.045
Média	6516.8	0.053	1664.8	0.106	8181.7	0.047	5971.5	0.059	1651.1	0.120	7622.6	0.0521
D.P.	1223.2	0.0091	319.11	0.0169	1219.4	0.007	1405.4	0.0048	1091.4	0.0427	2486.8	0.0073
$CV^2=(D.P./Média)^2$	0.187		0.1916		0.149		0.235		0.661		0.3262	
CE^2		0.0028		0.0112		0.0022		0.0034		0.0144		0.0027
CE^2/CV^2	0.0149		0.0584		0.0147		0.0144		0.0217		0.0082	
$VB^2=(CV^2-CE^2)$	0.1842		0.1804		0.1468		0.2316		0.6466		0.3235	
VB^2 (% of CV^2)	98.51		94.16		98.57		98.56		97.83		99.2	

$VB^2=CV^2-CE^2$ (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheaffer); VB^2 , coeficiente de variação biológica). N, número total de Redes Perineuronais estimado pelo Fracionador Óptico; D.P., Desvio Padrão.

Tabela 4. Estimativas individuais e coeficientes de variação do número de RPNs nos córtices visuais primário ipsi- e contralateral à privação monocular (direito e esquerdo, respectivamente) dos animais do grupo *M.AE* (Monocular. Ambiente Padrão).

Animal	Hemisfério Esquerdo						Hemisfério Direito					
	<i>N</i> (Tipo 1)	<i>CE</i> (Tipo 1)	<i>N</i> (Tipo 2)	<i>CE</i> (Tipo 2)	<i>N</i> (Total)	<i>CE</i> (Total)	<i>N</i> (Tipo 1)	<i>CE</i> (Tipo 1)	<i>N</i> (Tipo 2)	<i>CE</i> (Tipo 2)	<i>N</i> (Total)	<i>CE</i> (Total)
M.AE 1	8961.6	0.0473	2690.5	0.085	11652	0.0405	11045	0.0429	3228.6	0.0766	14274	0.0373
M.AE 2	11646	0.0463	2490.5	0.0958	14136	0.0399	13353	0.0378	2398.6	0.0869	15751	0.0339
M.AE 6	7762.1	0.0502	667.51	0.1753	8429.6	0.0473	6020.2	0.0555	1024	0.1302	7044.1	0.0503
M.AE 9	7482.2	0.0525	2149.8	0.0921	9632.1	0.0443	8571.3	0.0471	2194.7	0.085	10766	0.0416
Média	8962.9	0.0491	1999.59	0.1120	10962.5	0.0430	9747.36	0.0458	2211.45	0.0947	11958.8	0.0408
D.P.	1900.27	0.0028	915.67	0.0424	2499	0.0035	3160.08	0.0075	909.21	0.0241	3886.6	0.0071
$CV^2=(D.P./Média)^2$	0.2120		0.4579		0.2279		0.3241		0.4111		0.32499	
CE^2		0.00241		0.01254		0.00184		0.00209		0.0089		0.00166
CE^2/CV^2	0.0193		0.0273		0.0080		0.00644		0.02164		0.00510	
$VB^2=(CV^2-CE^2)$	0.20959		0.44536		0.22606		0.32201		0.4022		0.3233	
VB^2 (% of CV^2)	98.07		97.27		92.8		93.6		97.84		99.49	

$VB^2=CV^2-CE^2$ (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheaffer); VB^2 , coeficiente de variação biológica). N, número total de Redes Perineuronais estimado pelo Fracionador Óptico; D.P., Desvio Padrão.

Para confirmar a reprodutibilidade e a precisão do procedimento estereológico utilizado, foi determinado o coeficiente de erro (CE), que estima o erro intra-animal; o coeficiente de variação (CV) que estima a variação inter-animal; e o coeficiente de variação biológica (VB) que indica a precisão da estimativa, de tal forma que as diferenças entre os grupos de animais são atribuídas exclusivamente à manipulação experimental e que a variação biológica contribua com menos de 50% da variação total (Slomianka and West, 2005, Hosseini-Sharifabad and Nyengaard, 2007).

4.2.2 *Quantificação Estereológica Laminar*

As análises comparativas da quantificação laminar do número de RPNs revelou que o ambiente enriquecido aumenta significativamente o número de redes tipo 1 (Tabela 5) e redes totais (Tabela 6) nas camadas supragranular e granular em ambos os hemisférios, de camundongos submetidos a privação monocular (ANOVA dois critérios, $p < 0.05$). Análises pós-teste revelaram que esse impacto sobre a camada granular é decorrente principalmente do aumento da matriz extracelular no hemisfério direito desses animais (Bonferroni pós-teste, $p < 0.05$).

Na camada infragranular, os animais do grupo *M.AE* apresentaram um aumento bilateral apenas no número de RPNs tipo 1. O número total de redes nessa camada possui uma grande tendência a apresentar significância estatística, possuindo valor de $p = 0.061$. É possível que o simples aumento do número de animais amostrados confirme essa tendência.

Não houve diferenças significativas quando analisada a interação entre os hemisférios e a condição ambiental (ANOVA dois critérios, $p > 0.05$).

Tabela 5. Valores de p e % da variação total no teste ANOVA dois critérios para RPNs tipo 1, analisando cada uma das variáveis (condição ambiental, hemisfério cerebral e interação), nas camadas supragranular, granular e infragranular.

<i>Camada</i>	<i>RPNs Tipo 1</i>			% da variação total		
	Valor de p					
	Interação	Ambiente	Hemisfério	Interação	Ambiente	Hemisfério
Supragranular	0.9755	0.014*	0.078	0.00	40.58	0.37
Granular	0.475	0.005*	0.603	2.27	46.51	1.19
Infragranular	0.562	0.039*	0.859	2.00	30.11	0.19

* $p < 0.05$. O impacto dessa condição experimental é considerado significativo (ANOVA dois critérios).

Tabela 6. Valores de p e % da variação total no teste ANOVA dois critérios para RPNs Totais, analisando cada uma das variáveis (condição ambiental, hemisfério cerebral e interação), nas camadas supragranular, granular e infragranular.

<i>Camada</i>	<i>RPNs Tipo Total</i>			% da variação total		
	Valor de p					
	Interação	Ambiente	Hemisfério	Interação	Ambiente	Hemisfério
Supragranular	0.847	0.010*	0.986	0.18	42.97	0.00
Granular	0.497	0.015*	0.475	2.34	37.7	2.59
Infragranular	0.614	0.061	0.078	1.61	25.57	0.48

* $p < 0.05$. O impacto dessa condição experimental é considerado significativo (ANOVA dois critérios).

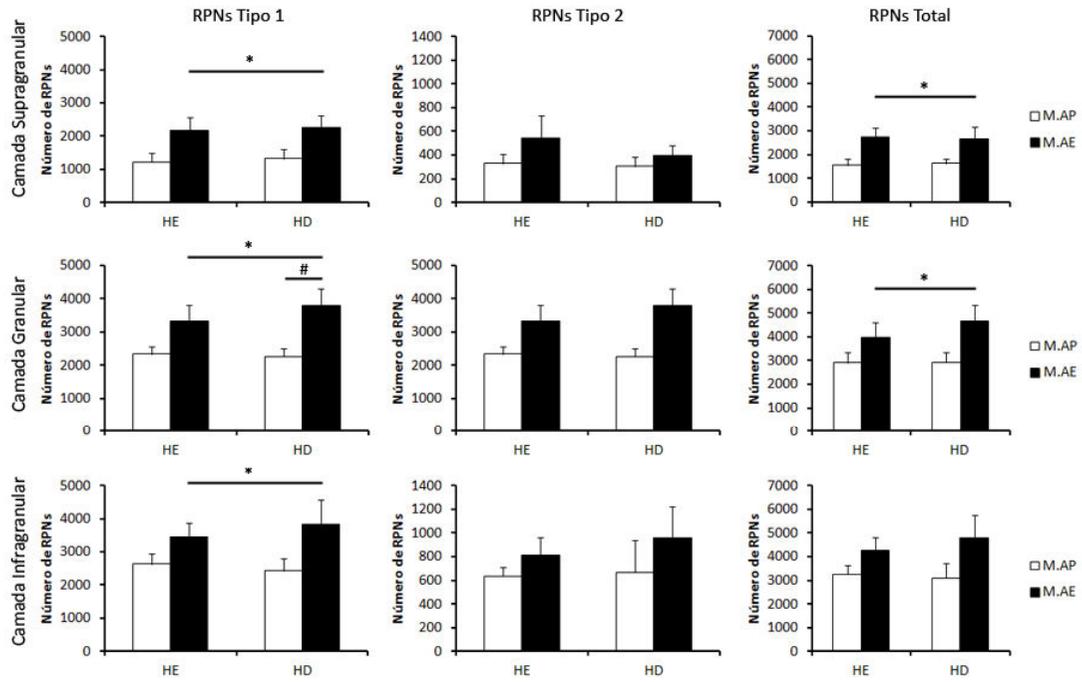
A quantidade das redes do tipo 2 não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de p e % da variação total no teste ANOVA dois critérios para RPNs Tipo 2, analisando cada uma das variáveis (condição ambiental, hemisfério cerebral e interação), nas camadas supragranular, granular e infragranular.

<i>Camada</i>	<i>RPNs Tipo 2</i>			% da variação total		
	Valor de p					
	Interação	Ambiente	Hemisfério	Interação	Ambiente	Hemisfério
Supragranular	0.607	0.223	0.482	1.92	11.40	3.64
Granular	0.685	0.446	0.341	1.25	4.50	7.11
Infragranular	0.775	0.284	0.668	0.63	9.28	1.42

O painel abaixo ilustra as representações gráficas dos resultados estereológicos e fotomicrografias de animais com valores médio dos grupos *M.AP* e *M.AE* evidenciando as diferenças na quantificação das RPNs no córtex visual primário, entre os grupos analisados (Figura 15).

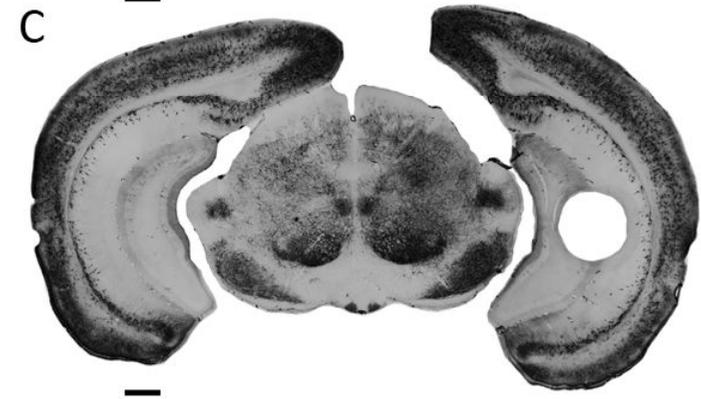
A



B



C



D

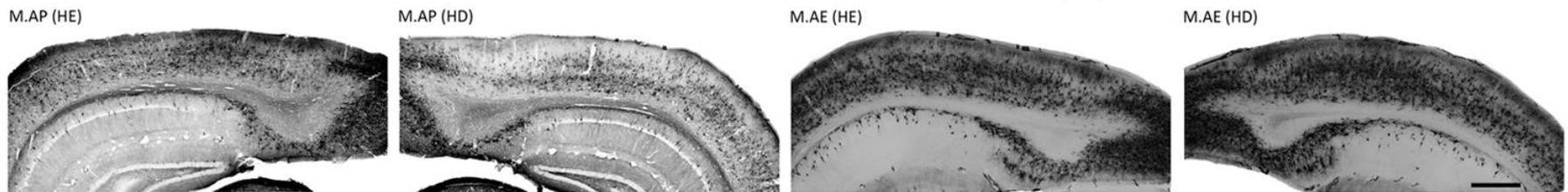


Figura 15. A. Quantificação estereológica (média \pm erro padrão) das redes perineuronais (RPNs) Tipo 1, Tipo 2 e redes totais, reveladas pela lectina da *Wisteria floribunda*, nas camadas supragranular, granular e infragranular dos hemisférios direito e esquerdo, de camundongos submetidos a privação monocular. *ANOVA dois critérios, $p < 0.05$; # Bonferroni pós-teste $p < 0.05$. B. Fotomicrografia de secção coronal do encéfalo de camundongo do grupo *M.AP* (orifício no tronco cerebral indica o lado do hemisfério direito). Escala: 500 μm . C. Fotomicrografia de secção coronal do encéfalo de camundongo do grupo *M.AE* (orifício no tronco cerebral indica o lado do hemisfério direito). Escala: 500 μm . D. Fotomicrografia em maior aumento dos córtices visuais primários direito e esquerdo de animais dos grupos *M.AP* e *M.AE*. Escala: 125 μm . *M.AP*, Monocular. Ambiente Padrão; *M.AE*, Monocular, Ambiente Enriquecido; HE, Hemisfério Esquerdo; HD, Hemisfério Direito.

Abaixo, as estimativas individuais da quantificação estereológica do número total de redes perineuronais, para cada uma das três camadas (supragranular, granular e infragranular), nos córtices ipsi- e contralateral (direito e esquerdo, respectivamente) dos animais dos grupos *M.AP* e *M.AE* (Tabela 8-11).

Tabela 8. Estimativas individuais e coeficientes de variação do número de RPNs total para cada camada do córtex visual primário esquerdo dos animais do grupo *M.AP* (Monocular. Ambiente Padrão).

Animal	<i>Supragranular</i>						<i>Granular</i>						<i>Infragranular</i>					
	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>
M.AP 2	969	0.123	559	0.170	1528	0.097	2466	0.079	785.7	0.158	3252	0.073	3105	0.071	792.0	0.135	3834	0.068
M.AP 3	1486	0.105	204.4	0.272	1691	0.098	3535	0.070	627.3	0.152	4163	0.063	3006	0.079	666.0	0.150	3672	0.067
M.AP 5	567.3	0.167	283.6	0.233	851.0	0.132	1284	0.109	409.5	0.228	1694	0.094	1750	0.092	447.0	0.196	2197	0.080
M.AP 6	1833	0.095	270.2	0.240	2103	0.084	2034	0.088	513.2	0.179	2547	0.076	2648	0.077	638.5	0.155	3286	0.067
Média	1213	0.122	329.3	0.228	1543	0.102	2329	0.086	583.9	0.179	2914	0.07	2627	0.079	635.8	0.159	3247	0.070
D.P.	558.3	0.031	156.9	0.042	521.0	0.020	940.2	0.016	161.2	0.034	1048	0.012	616.8	0.008	142.5	0.026	736.9	0.006
CV ² =(D.P./Média) ²	0.460		0.476		0.337		0.403		0.276		0.359		0.234		0.224		0.226	
CE ²		0.014		0.051		0.010		0.007		0.032		0.004		0.006		0.025		0.004
CE ² /CV ²	0.030		0.107		0.029		0.017		0.115		0.011		0.025		0.111		0.017	
VB ² =(CV ² -CE ²)	0.446		0.425		0.327		0.396		0.244		0.355		0.228		0.199		0.222	
VB ² (% of CV ²)	97		89.3		97.1		98.3		88.5		98.9		97.5		88.9		98.3	

VB²=CV²-CE² (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheaffer); VB², coeficiente de variação biológica). N, número total de Redes Perineuronais estimado pelo Fracionador Óptico; D.P., Desvio Padrão.

Tabela 9. Estimativas individuais e coeficientes de variação do número total de RPNs total para cada camada do córtex visual primário direito dos animais do grupo *M.AP* (Monocular. Ambiente Padrão).

Animal	<i>Supragranular</i>						<i>Granular</i>						<i>Infragranular</i>					
	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>
M.AP 2	1415	0.117	294.0	0.237	1709	0.105	2245	0.100	784.9	0.148	3030	0.082	3060	0.084	868.9	0.142	3929	0.069
M.AP 3	931.5	0.135	228.1	0.281	1159	0.126	2129	0.098	287.8	0.234	2417	0.09	1507	0.110	38.18	0.657	1546	0.108
M.AP 5	1286	0.117	176.1	0.344	1462	0.11	1739	0.104	439.4	0.209	2179	0.089	2135	0.083	444.9	0.200	2580	0.079
M.AP 6	1633	0.112	525.5	0.196	2158	0.096	2896	0.086	1205	0.124	4101	0.07	3002	0.097	1314	0.120	4317	0.074
Média	1316	0.120	305.9	0.264	1622	0.109	2252	0.097	679.2	0.178	2931	0.082	2426	0.093	666.4	0.279	3093	0.082
D.P.	293.8	0.010	154.1	0.063	422.2	0.012	480.6	0.007	407.5	0.051	857.9	0.009	744.5	0.012	548.9	0.253	1271	0.017
$CV^2=(D.P./Média)^2$	0.223		0.503		0.260		0.213		0.599		0.292		0.306		0.823		0.410	
CE^2		0.014		0.069		0.011		0.009		0.031		0.006		0.008		0.077		0.006
CE^2/CV^2	0.062		0.137		0.042		0.042		0.051		0.020		0.026		0.093		0.014	
$VB^2=(CV^2-CE^2)$	0.209		0.434		0.249		0.204		0.568		0.286		0.298		0.746		0.404	
VB^2 (% of CV^2)	93.8		86.3		95.8		95.8		94.9		98		97.4		90.7		98.6	

$VB^2=CV^2-CE^2$ (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheaffer); VB^2 , coeficiente de variação biológica). N, número total de Redes Perineuronais estimado pelo Fracionador Óptico; D.P., Desvio Padrão.

Tabela 10. Estimativas individuais e coeficientes de variação do número total de RPNs total para cada camada do córtex visual primário esquerdo dos animais do grupo *M.AE* (Monocular. Ambiente Enriquecido).

Animal	<i>Supragranular</i>						<i>Granular</i>						<i>Infragranular</i>					
	<i>N</i>		<i>CE</i>		<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>		<i>CE</i>		<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>		<i>CE</i>		<i>N</i>	<i>CE</i>
	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>			<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>			<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>		
M.AE 1	2114	0.092	1007	0.135	3121	0.071	3092	0.086	767.5	0.166	3859	0.075	3759	0.069	904.7	0.144	4664	0.063
M.AE 2	3240	0.087	352.2	0.277	3592	0.081	3902	0.082	994.2	0.147	4896	0.068	4499	0.072	1147	0.138	5647	0.061
M.AE 6	1596	0.104	131.4	0.391	1728	0.101	3408	0.075	135.5	0.395	3544	0.073	2760	0.085	397.0	0.225	3157	0.076
M.AE 9	1781	0.105	681.7	0.158	2463	0.081	2871	0.087	685.8	0.170	3557	0.072	2824	0.075	786.8	0.147	3611	0.066
Média	2182	0.097	543.0	0.240	2726	0.083	3318	0.082	645.7	0.219	3964	0.072	3460	0.075	809.1	0.163	4269	0.066
D.P.	736.7	0.008	383.1	0.118	810.5	0.012	447.2	0.005	364.3	0.117	638.1	0.002	829.3	0.006	313.1	0.041	1114	0.006
CV ² =(D.P./Média) ²	0.337		0.705		0.297		0.134		0.564		0.160		0.239		0.386		0.260	
CE ²		0.009		0.057		0.006		0.006		0.047		0.005		0.005		0.026		0.004
CE ² /CV ²	0.026		0.080		0.020		0.044		0.083		0.031		0.020		0.067		0.015	
VB ² =(CV ² -CE ²)	0.328		0.648		0.291		0.128		0.517		0.155		0.234		0.319		0.256	
VB ² (% of CV ²)	97.4		92		98		95.6		91.7		96.9		98		93.3		98.5	

VB²=CV²-CE² (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheffer); VB², coeficiente de variação biológica). N, número total de Redes Perineuronais estimado pelo Fracionador Óptico; D.P., Desvio Padrão.

Tabela 11. Estimativas individuais e coeficientes de variação do número total de RPNs total para cada camada do córtex visual primário direito dos animais do grupo *M.AE* (Monocular. Ambiente Enriquecido).

Animal	<i>Supragranular</i>						<i>Granular</i>						<i>Infragranular</i>					
	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>	<i>N</i>	<i>CE</i>
	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Tipo 2</i>	<i>Total</i>	<i>Total</i>
M.AE 1	1744	0.106	360.3	0.237	2104	0.096	4438	0.067	1187	0.130	5625	0.058	4863	0.063	1670	0.101	6533	0.053
M.AE 2	3323	0.070	396.5	0.204	3719	0.066	4786	0.064	1050	0.132	5837	0.055	5234	0.061	955.1	0.137	6190	0.054
M.AE 6	1292	0.119	209.5	0.301	1502	0.107	2612	0.083	408.7	0.195	3021	0.075	2112	0.094	404.8	0.212	2517	0.084
M.AE 9	2698	0.080	614.7	0.154	3313	0.068	3367	0.074	868.0	0.138	4235	0.068	3142	0.078	815.9	0.128	3958	0.060
Média	2264	0.093	395.2	0.224	2659	0.084	3800	0.072	878.4	0.148	4679	0.064	3837	0.074	961.4	0.144	4799	0.062
D.P.	917.4	0.022	167.2	0.061	1032	0.020	996.3	0.008	339.3	0.031	1314	0.009	1467	0.015	526.9	0.047	1902	0.014
$CV^2=(D.P./Média)^2$	0.405		0.423		0.388		0.262		0.386		0.028		0.382		0.548		0.396	
CE^2		0.008		0.050		0.007		0.005		0.021		0.004		0.005		0.020		0.003
CE^2/CV^2	0.019		0.118		0.018		0.019		0.054		0.142		0.013		0.036		0.007	
$VB^2=(CV^2-CE^2)$	0.397		0.373		0.381		0.257		0.365		0.024		0.377		0.528		0.393	
VB^2 (% of CV^2)	98.1		88.2		98.2		98.1		94.6		85.8		98.7		96.4		99.3	

$VB^2=CV^2-CE^2$ (CV, coeficiente de variação; CE, coeficiente de erro estimado (Scheffer); VB^2 , coeficiente de variação biológica). N, número total de Redes Perineuronais estimado pelo Fracionador Óptico; D.P., Desvio Padrão.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou a influência do enriquecimento ambiental sobre a acuidade visual e a distribuição das redes perineuronais no córtex visual primário de camundongos suíços albinos submetidos à privação monocular durante o período crítico pós-natal.

Os resultados comportamentais corroboraram estudos prévios que demonstraram que, tanto no teste visual aquático de escolha forçada quanto no registro eletrofisiológico dos potenciais visuais evocados (VEPs), a exposição ao ambiente enriquecido promove uma completa recuperação da acuidade visual em animais submetidos à privação monocular, quando comparados aos animais criados em um ambiente padrão (Sale et al., 2007). Por outro lado, os animais binoculares (não submetidos à privação monocular) não apresentaram alterações na acuidade quando submetidos ao ambiente enriquecido, durante um período de apenas duas semanas. No presente trabalho, entretanto, animais do grupo *B.AE* apresentaram um melhor desempenho no teste visual, quando comparados aos animais binoculares criados em um ambiente padrão (*B.AP*). Essa divergência nos resultados comportamentais dos animais binoculares pode ser decorrente de diferenças metodológicas, como por exemplo, o período de exposição ao ambiente enriquecido (2 semanas x 3 meses), o modelo experimental (ratos x camundongos) e a fase da vida do animal em que o experimento foi realizado (adultos x jovens).

As análises quantitativas revelaram que essa melhora no desempenho no teste de acuidade visual induzida pelo enriquecimento ambiental pode estar relacionada com um aumento do número de redes perineuronais no córtex visual primário bilateral.

Apesar de trabalhos prévios correlacionarem alterações quantitativas da matriz extracelular com o enriquecimento ambiental e a acuidade visual, suas abordagens não foram baseadas em quantificações estereológicas (Pizzorusso et al., 2002, Sale et al., 2007, Carulli et al., 2010). No presente trabalho, o número total de redes perineuronais no córtex visual foi estimado através do fracionador óptico, um método estereológico quantitativo de acurada precisão, que combina as propriedades do dissecor e do fracionador óptico, e tem sido utilizado em diversos estudos para determinar o número

de células em diferentes estruturas cerebrais (West, 2002, de Sousa et al., 2011). O fracionador óptico é um método que não é afetado por alterações histológicas, retração ou lesão induzida por expansões, um fator que é particularmente importante ao estudar alterações no sistema nervoso central (West et al., 1991). Essa acurácia no uso de técnicas de estereologia nos permite afirmar, com elevado grau de precisão estatística, que animais submetidos à privação monocular durante o período crítico e criados em um ambiente com diversos estímulos sociais e sensorio-motores, possuem um maior número de redes perineuronais tipo 1 e redes totais, quando comparados com aqueles animais criados em um ambiente empobrecido.

A quantificação das RPNs tipo 2 apresentou uma limitação metodológica, no que concerne a escolha dos parâmetros estereológicos. A determinação da matriz de contagem foi idealizada para produzir coeficientes de erro com variação inferior a 10% para as RPNs tipo 1, as mais abundantes no córtex visual. No entanto, após a aplicação do procedimento estereológico e análise estatística, tornou-se evidente que a amostragem foi inadequada para a quantificação das RPNs tipo 2, que apresentaram média de coeficientes de erros superior a 15%. Esse erro pode ser corrigido através da aplicação de novos parâmetros em um novo ensaio estereológico, com uma maior amostragem da área de interesse (maior área do bloco de contagem relativa ao tamanho da matriz de contagem) para que se possa assegurar que as diferenças estatísticas são decorrentes apenas da manipulação experimental do trabalho.

Essa matriz extracelular, e seus diferentes componentes, estão estreitamente relacionados com o desenvolvimento e maturação pós-natal do sistema nervoso central. Diversos desses componentes, como a tenascina-C, ácido hialurônico e o neurocan, possuem papéis específicos nos processos de remodelagem. O neurocan, especificamente, um glicosaminoglicano sulfatado, interage tanto com a tenascina quanto com o hialurônio, e está geralmente associado a barreiras funcionais (Rauch, 2004). A lectina *Wisteria floribunda* se liga especificamente a cadeias desses glicosaminoglicanos que compõe as RPNs, e os diferentes padrões de marcação identificados no presente trabalho, aqui denominadas RPNs tipo 1 e RPNs tipo 2, com esparsas marcações no corpo e ramificações primárias e células com corpos

intensamente marcados, até arborizações de segunda e terceira ordem, respectivamente, podem ser atribuídos a diferentes estágios de maturação da matriz extracelular.

Bruckner (2003) demonstrou que a localização desses componentes da matriz revela a presença das redes perineuronais exclusivamente em neurônio de fenótipos não-piramidais na formação hipocampal murina. Em ratos, essas RPNs estão associadas a interneurônios parvalbumina-positivos, na vizinhança das células piramidais e granulares, do hipocampo e giro denteado, respectivamente (Para revisão ver Nitsch et al., 1990, Freund and Buzsaki, 1996).

A interação entre a maturação das redes perineuronais, com os circuitos GABAérgicos e algumas neurotrofinas, como o BDNF está estritamente relacionada com a regulação da plasticidade cortical durante o desenvolvimento (Huang et al., 1999, Hensch, 2005b). Sale, Maya Vetencourt et al. (2007), demonstraram que ratos adultos submetidos à privação monocular e posterior sutura reversa, apresentaram uma redução na densidade de redes perineuronais no córtex visual contralateral à privação, acompanhada por uma redução dos níveis basais de GABA e aumento na expressão de BDNF quando submetidos ao enriquecimento ambiental. Em outro trabalho, Pizzorusso et al. (2002) demonstrou que em animais submetidos à privação de luz durante uma fase pós-natal precoce, há um retardo na maturação da matriz no córtex visual primário, com uma diminuição da imunoreatividade para o neurocan e uma redução na densidade de redes perineuronais, principalmente nas camadas infra e supragranular. Evento que pode ser revertido, após a reexposição desses animais à luz.

No presente trabalho, entretanto, animais submetidos à privação monocular e criados em um ambiente enriquecido, apresentaram um aumento no número de redes perineuronais no córtex visual primário bilateralmente, associado com um melhor desempenho no teste de acuidade visual. Essa divergência entre os resultados pode ser decorrente das diferenças nas janelas temporais após o período em que os animais são submetidos ao enriquecimento ambiental, e na quantificação das redes, uma vez que esses autores não distinguem claramente os diferentes fenótipos de redes (tipo 1 e tipo 2).

Em animais adultos, as redes perineuronais da matriz extracelular condensam ao redor de neurônios parvalbumina-positivos, cuja maturação de suas conexões está estreitamente relacionada com eventos plásticos no córtex cerebral (Celio et al., 1998, Pizzorusso et al., 2002). Mais recentemente, a identificação de fatores de transcrição, como a homeoproteína Otx2, têm sido identificados como importantes determinantes moleculares na regulação da plasticidade no sistema visual (Butt et al., 2007). O transporte e a acumulação do Otx2 dentro das células parvalbuminérgicas são dependentes da experiência ambiental do indivíduo, e a persistência ou o encerramento de eventos plásticos no córtex (Cancedda et al., 2004), pode ser então alterada de acordo com o meio ambiente ao qual o animal é submetido, através da regulação desses fatores morfogênicos (Sugiyama et al., 2008).

Esses interneurônios inibitórios constituem cerca de 20% da população total de neurônios corticais e possuem várias propriedades morfofisiológicas na circuitaria cortical, principalmente na regulação da atividade das células piramidais, através da liberação de GABA (DeFelipe and Farinas, 1992, Kawaguchi and Kubota, 1997, Somogyi et al., 1998).

A consolidação e o aumento no número dessas redes perineuronais tardiamente ao período crítico, pode estar então relacionada com fases distintas da maturação da matriz extracelular, que ocorrem continuamente ao longo da vida do animal. O ambiente enriquecido está associado à formação, envelopamento, estabilização e dissolução de novas redes, como parte do processo de plasticidade estrutural necessária à remodelação e estabilização de novos circuitos sinápticos, induzidos pela intensa e persistente estimulação multissensorial, social e motora promovidas pelo enriquecimento ambiental. Esse efeito do ambiente enriquecido é evidente principalmente sobre as redes perineuronais tipo 1, ainda em processo de maturação funcional e estrutural, e na camada granular (IV), a camada das aferências talâmicas do sistema visual.

A figura abaixo (Figura 16) ilustra a circuitaria cortical, no campo visual binocular, e a distribuição desses interneurônios inibitórios, regulando a atividade das células granulares. A camada IV, que recebe os inputs provenientes dos núcleos

talâmicos, parece ser mais suscetível às alterações provocadas pela privação monocular precoce, pois é onde se encontram as grandes células em cesto, parvalbumina-positivas.

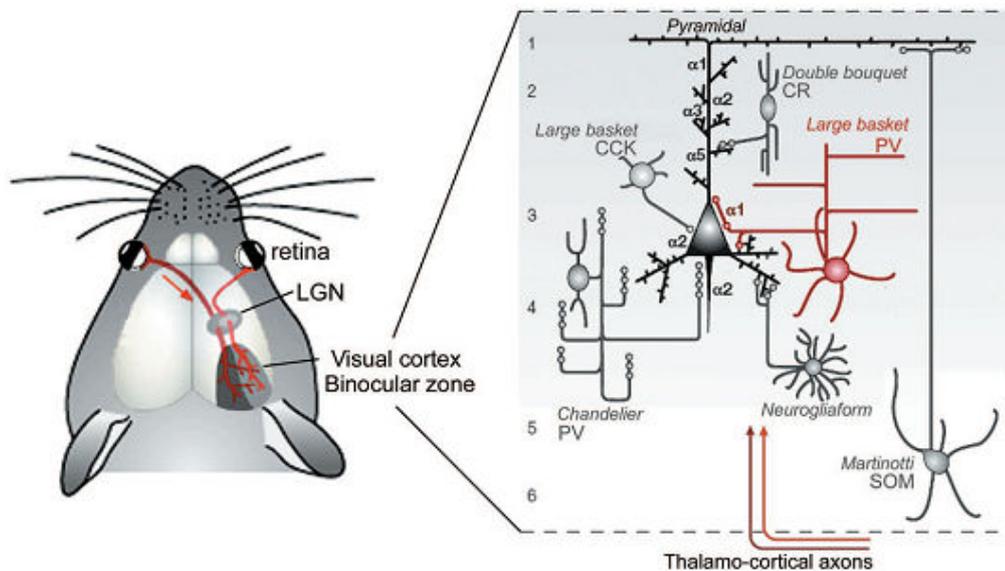


Figura 16. Interneurônios GABAérgicos durante o período crítico no córtex visual de camundongos. As aferências dos dois olhos convergem para o campo binocular no córtex visual primário, através de inputs provenientes do núcleo geniculado lateral do tálamo (LGN). Interações competitivas entre os dois olhos refinam a circuitaria cortical durante o período crítico. Receptores GABA_a contendo a subunidade $\alpha 1$ estão aumentados nas sinapses somáticas das grandes células em cesto com as células piramidais. CCK: Colecistoquinina; CR: Calretinina; PV: Parvalbumina; SOM: Somatostatina. Adaptado de Sugiyama et al. (2009).

Consistente com os nossos resultados, em animais envelhecidos, a perda senescente das redes perineuronais no córtex somatosensorial pode ser prevenida pelo enriquecimento ambiental, que induz alterações plásticas funcionais nesses animais (Hilbig et al., 2002). Adicionalmente, as RPNs no cérebro adulto são essenciais para a manutenção da potenciação de longo termo (LTP) nas células colaterais de Schaffer, em CA1 no hipocampo, modulando diversas formas de plasticidade sináptica (Bukalo et al., 2001). A experiência visual, proporcionada no ambiente enriquecido, induz potenciações de longo termo no córtex visual primário, e as redes perineuronais são essenciais para a sua manutenção (Cooke and Bear, 2010).

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o enriquecimento ambiental, em uma fase precoce da vida e por um período prolongado, melhora a acuidade visual em animais adultos e naqueles submetidos à privação monocular durante o período crítico pós-natal, estando associado esse melhor desempenho visual, com um aumento no número de redes perineuronais no córtex visual primário.

Os resultados confirmam que o enriquecimento ambiental, com uma diversificação de estímulo sensório-motores e sociais possui um potencial terapêutico não-invasivo que pode contribuir para a recuperação funcional cortical após alterações patológicas e que pode ser utilizado para reverter ou prevenir doenças neurológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. vol. 2012 Washington, D.C.: The National Academies Press.
- Antonini A, Fagiolini M, Stryker MP (1999) Anatomical correlates of functional plasticity in mouse visual cortex. *J Neurosci* 19:4388-4406.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000) Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80:1267-1290.
- Barth M, Hirsch HV, Meinertzhagen IA, Heisenberg M (1997) Experience-dependent developmental plasticity in the optic lobe of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 17:1493-1504.
- Bartoletti A, Medini P, Berardi N, Maffei L (2004) Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. *Nat Neurosci* 7:215-216.
- Bavelier D, Levi DM, Li RW, Dan Y, Hensch TK (2010) Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci* 30:14964-14971.
- Beneyto M, Rueda J, Merchan JA, Prieto JJ (1999) Specific staining of nonpyramidal cell populations of the cerebral cortex by lectin cytochemistry on semithin sections. *Brain Res Bull* 49:251-262.
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (2000) Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* 10:138-145.
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L (2003) Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci* 26:369-378.
- Bruckner G, Grosche J, Hartlage-Rubsamen M, Schmidt S, Schachner M (2003) Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J Chem Neuroanat* 26:37-50.
- Bruckner G, Grosche J, Schmidt S, Hartig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M (2000) Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol* 428:616-629.
- Bruckner G, Seeger G, Brauer K, Hartig W, Kacza J, Bigl V (1994) Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the Mongolian gerbil and rat. *Brain Res* 658:67-86.

- Bruckner G, Szeoke S, Pavlica S, Grosche J, Kacza J (2006) Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience* 138:365-375.
- Bukalo O, Schachner M, Dityatev A (2001) Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* 104:359-369.
- Butt SJ, Cobos I, Golden J, Kessaris N, Pachnis V, Anderson S (2007) Transcriptional regulation of cortical interneuron development. *J Neurosci* 27:11847-11850.
- Cancedda L, Putignano E, Sale A, Viegi A, Berardi N, Maffei L (2004) Acceleration of visual system development by environmental enrichment. *J Neurosci* 24:4840-4848.
- Carulli D, Pizzorusso T, Kwok JC, Putignano E, Poli A, Forostyak S, Andrews MR, Deepa SS, Glant TT, Fawcett JW (2010) Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133:2331-2347.
- Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW (2007) Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 501:83-94.
- Caviness VS, Jr. (1975) Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J Comp Neurol* 164:247-263.
- Celio MR, Spreafico R, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L (1998) Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 21:510-515.
- Cerutti SM, Chadi G (2000) S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. *Cell Biol Int* 24:35-49.
- Cipolloni PB, Peters A (1979) The bilaminar and banded distribution of the callosal terminals in the posterior neocortex of the rat. *Brain Res* 176:33-47.
- Ciucci F, Putignano E, Baroncelli L, Landi S, Berardi N, Maffei L (2007) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PLoS One* 2:e475.
- Cooke SF, Bear MF (2010) Visual experience induces long-term potentiation in the primary visual cortex. *Journal of Neuroscience* 30:16304-16313.
- Cooper LN, Bear MF (2012) The BCM theory of synapse modification at 30: interaction of theory with experiment. *Nat Rev Neurosci* 13:798-810.
- de Sousa AA, Reis R, Bento-Torres J, Trevia N, Lins NA, Passos A, Santos Z, Diniz JA, Vasconcelos PF, Cunningham C, Perry VH, Diniz CW (2011) Influence of

enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. *PLoS One* 6:e15597.

DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.

Domenici L, Cellerino A, Berardi N, Cattaneo A, Maffei L (1994) Antibodies to nerve growth factor (NGF) prolong the sensitive period for monocular deprivation in the rat. *Neuroreport* 5:2041-2044.

Drager UC, Olsen JF (1980) Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol* 191:383-412.

Drager UC, Olsen JF (1981) Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 20:285-293.

Faissner A, Pyka M, Geissler M, Sobik T, Frischknecht R, Gundelfinger ED, Seidenbecher C (2010) Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev* 63:26-38.

Fawcett J (2009) Molecular control of brain plasticity and repair. *Prog Brain Res* 175:501-509.

Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.

Golgi C (1893) Intorno all'origine del quarto nervo cerebrale e una questione istofisiologica che a questo argomento si collega. *Rend R Acc Lincei* 2:379-389.

Goodman DC, Horel JA (1966) Sprouting of optic tract projections in the brain stem of the rat. *J Comp Neurol* 127:71-88.

Gordon JA, Stryker MP (1996) Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci* 16:3274-3286.

Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857-881.

Harris JL (1964) Resolving power and decision make. *J Opt Soc Am* 54:606-611.

Hausen D, Bruckner G, Drlicek M, Hartig W, Brauer K, Bigl V (1996) Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. *Neuroreport* 7:1725-1729.

Hebb DO (1949) *The Organization of Behaviour*. New York: Wiley.

- Heimer L, Ebner FF, Nauta WJ (1967) A note on the termination of commissural fibers in the neocortex. *Brain Res* 5:171-177.
- Hendry SH, Jones EG, Hockfield S, McKay RD (1988) Neuronal populations stained with the monoclonal antibody Cat-301 in the mammalian cerebral cortex and thalamus. *J Neurosci* 8:518-542.
- Hensch TK (2003) Controlling the critical period. *Neuroscience Research* 47:17-22.
- Hensch TK (2004) Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci* 27:549-579.
- Hensch TK (2005a) Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr Top Dev Biol* 69:215-237.
- Hensch TK (2005b) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877-888.
- Hilbig H, Bidmon HJ, Steingruber S, Reinke H, Dinse HR (2002) Enriched environmental conditions reverse age-dependent gliosis and losses of neurofilaments and extracellular matrix components but do not alter lipofuscin accumulation in the hindlimb area of the aging rat brain. *J Chem Neuroanat* 23:199-209.
- Hosseini-Sharifabad M, Nyengaard JR (2007) Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. *J Neurosci Methods* 162:206-214.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98:739-755.
- Hubel DH, Wiesel TN (1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol* 206:419-436.
- Hubel DH, Wiesel TN (1977) Ferrier lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society* 198:1-59.
- Hubener M (2003) Mouse visual cortex. *Curr Opin Neurobiol* 13:413-420.
- Hughes HC (1977) Anatomical and neurobehavioral investigations concerning the thalamo-cortical organization of the rat's visual system. *J Comp Neurol* 175:311-336.
- Jacobson S (1970) Distribution of commissural axon terminals in the rat neocortex. *Exp Neurol* 28:193-205.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476-486.

- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002) Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52:135-143.
- Lander C, Kind P, Maleski M, Hockfield S (1997) A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. *J Neurosci* 17:1928-1939.
- Lazarus MS, Huang ZJ (2011) Distinct maturation profiles of perisomatic and dendritic targeting GABAergic interneurons in the mouse primary visual cortex during the critical period of ocular dominance plasticity. *J Neurophysiol* 106:775-787.
- Lemmon V, Pearlman AL (1981) Does laminar position determine the receptive field properties of cortical neurons? A study of corticotectal cells in area 17 of the normal mouse and the reeler mutant. *J Neurosci* 1:83-93.
- Leong SK (1980) Plasticity and interaction after ablations of visual or somatosensory motor cortex or retina in neonatal rats. *J Neurol Sci* 45:87-102.
- Lewis TL, Maurer D (2009) Effects of early pattern deprivation on visual development. *Optom Vis Sci* 86:640-646.
- Mainardi M, Landi S, Gianfranceschi L, Baldini S, De Pasquale R, Berardi N, Maffei L, Caleo M (2010) Environmental enrichment potentiates thalamocortical transmission and plasticity in the adult rat visual cortex. *J Neurosci Res* 88:3048-3059.
- Mangini NJ, Pearlman AL (1980) Laminar distribution of receptive field properties in the primary visual cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 193:203-222.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Marshall JH, Garrett ME, Nauhaus I, Callaway EM (2011) Functional specialization of seven mouse visual cortical areas. *Neuron* 72:1040-1054.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:295-318.
- Miki T, Fukui Y, Itoh M, Hisano S, Xie Q, Takeuchi Y (1997) Estimation of the numerical densities of neurons and synapses in cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Protoc* 2:9-16.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK, Margolis RU (1998) Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 247:207-212.

- Miyata S, Nishimura Y, Hayashi N, Oohira A (2005) Construction of perineuronal net-like structure by cortical neurons in culture. *Neuroscience* 136:95-104.
- Montero VM, Guillery RW (1968) Degeneration in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat following interruption of the retinal or cortical connections. *J Comp Neurol* 134:211-242.
- Mulligan KA, van Brederode JF, Hendrickson AE (1989) The lectin *Vicia villosa* labels a distinct subset of GABAergic cells in macaque visual cortex. *Vis Neurosci* 2:63-72.
- Nauta WJ, Bucher VM (1954) Efferent connections of the striate cortex in the albino rat. *J Comp Neurol* 100:257-285.
- Nitsch R, Soriano E, Frotscher M (1990) The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus. *Anat Embryol (Berl)* 181:413-425.
- Orban GA (2008) Higher order visual processing in macaque extrastriate cortex. *Physiol Rev* 88:59-89.
- Peters A (1985) The Visual Cortex of The Rat. In: *Cerebral Cortex*, vol. 2 (Jones, E. G. and Peters, A., eds) New York: Plenum Press.
- Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L (2002) Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298:1248-1251.
- Prusky GT, West PW, Douglas RM (2000) Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats. *Vision Res* 40:2201-2209.
- Rauch U (2004) Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. *Cell Mol Life Sci* 61:2031-2045.
- Renner MJ, Rosenzweig MR (1987) *Enriched and Impoverished Environments: Effects on Brain and Behaviour*. New York: Springer.
- Ribak CE, Peters A (1975) An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Res* 92:341-368.
- Rosenzweig MR (1966) Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *The American psychologist* 21:321-332.
- Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H (1978) Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* 153:563-576.
- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1962) Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol* 55:429-437.

- Ruoslahti E (1996) Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 6:489-492.
- Sale A, Maya Vetencourt JF, Medini P, Cenni MC, Baroncelli L, De Pasquale R, Maffei L (2007) Environmental enrichment in adulthood promotes amblyopia recovery through a reduction of intracortical inhibition. *Nat Neurosci* 10:679-681.
- Schmitz C, Hof PR (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130:813-831.
- Schober W, Winkelmann E (1975) Der visuelle kortex der ratte: Cytoarchitektonik und Stereotaktische Parameter. *Z Mikrosk Anat Forsch* 89.
- Schuett S, Bonhoeffer T, Hubener M (2002) Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci* 22:6549-6559.
- Seeger G, Luth HJ, Winkelmann E, Brauer K (1996) Distribution patterns of Wisteria floribunda agglutinin binding sites and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human visual cortex: a double-labelling study. *J Hirnforsch* 37:351-366.
- Slomianka L, West MJ (2005) Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. *Neuroscience* 136:757-767.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26:113-135.
- Sugiyama S, Di Nardo AA, Aizawa S, Matsuo I, Volovitch M, Prochiantz A, Hensch TK (2008) Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134:508-520.
- Sugiyama S, Prochiantz A, Hensch TK (2009) From brain formation to plasticity: insights on Otx2 homeoprotein. *Dev Growth Differ* 51:369-377.
- Sztainberg Y, Chen A (2010) An environmental enrichment model for mice. *Nat Protoc* 5:1535-1539.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1:191-198.
- Viggiano D (2000) The two faces of perineuronal nets. *Neuroreport* 11:2087-2090.
- Wagor E, Mangini NJ, Pearlman AL (1980) Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the mouse. *J Comp Neurol* 193:187-202.
- Wang Q, Burkhalter A (2007) Area map of mouse visual cortex. *J Comp Neurol* 502:339-357.

- Wegner F, Hartig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W, Bruckner G (2003) Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 184:705-714.
- West MJ (1993) New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 14:275-285.
- West MJ (2002) Design-based stereological methods for counting neurons. *Prog Brain Res* 135:43-51.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482-497.
- Westheimer G (2009) Visual acuity: information theory, retinal image structure and resolution thresholds. *Prog Retin Eye Res* 28:178-186.
- Wiesel TN, Hubel DH (1963) Single-Cell Responses in Striate Cortex of Kittens Deprived of Vision in One Eye. *J Neurophysiol* 26:1003-1017.
- Wiesel TN, Hubel DH (1965) Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. *J Neurophysiol* 28:1060-1072.
- Yamaguchi Y (2000) Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57:276-289.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT (2008) Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* 130:635-653.