



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

OTAVIO AUGUSTO DE ARAUJO COSTA FOLHA

**EFEITO DO AMBIENTE SOBRE O PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE DO
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS**

Belém
2013

OTAVIO AUGUSTO DE ARAUJO COSTA FOLHA

**EFEITO DO AMBIENTE SOBRE O PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE DO
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS ADOLESCENTES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade

Orientador: Antônio Pereira Júnior

Co-orientador: Carlomagno Pacheco Bahia

Belém

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Folha, Otavio Augusto de Araujo Costa, 1986-

Efeito do ambiente sobre o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal de ratos /

Otavio Augusto de Araujo Costa Folha. - 2012.

Orientador: Antônio Pereira Júnior;

Coorientador: Carlomagno Pacheco Bahia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2012.

1. Cortex cerebral. 2. Sistema nervoso. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Neurônios. I. Título.

CDD 22. ed. 573.85

OTAVIO AUGUSTO DE ARAUJO COSTA FOLHA

EFEITO DO AMBIENTE SOBRE O PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE DO
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Neuroplasticidade

Orientador: Antônio Pereira Júnior

Co-orientador: Carlomagno Pacheco Bahia

BANCA EXAMINADORA:

_____ - Orientador e Presidente da Banca
Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

_____ - Co-orientador
Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia
Instituto de Ciências da Saúde/ Universidade Federal do Pará

_____ - Membro Titular
Prof^a. Dra. Lucídia Fonseca Santiago
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Pará

_____ – Membro Titular
Prof.Dr. Ghislain Jean André Saunier
Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Pará

DEDICATÓRIA

À minha companheira Débora, pelo amor, carinho, dedicação, paciência e inspiração de cada dia.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Antônio Pereira, pela oportunidade, paciência e confiança, por compreender minhas dificuldades, compartilhar e trilhar comigo por novos caminhos;

Ao co-orientador Prof. Carlomagno Bahia, pela credibilidade e incentivo em alcançar os melhores resultados sempre;

Ao Laboratório de Neuroendocrinologia (ICB/ UFPA), coordenado pelo Prof. Anderson Herculano, pela colaboração material com este projeto;

Ao Laboratório de Endocrinologia Comportamental (UFRN), coordenado pela Prof^o Bernadete, e em especial ao aluno Victor Shiramizu, pela essencial colaboração material e prática com este projeto;

A todos os integrantes do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE/ UFPA), professores e alunos, por todos os momentos que possibilitaram a minha formação enquanto pesquisador.

Ao apoio financeiro da CAPES por incentivar a formação na pós-graduação;

Aos meus pais Rosa e Otavio e aos irmãos André e Patrícia, por acreditarem no meu potencial, principalmente nas horas mais difíceis;

Aos amigos da vida Victor, Silvia, Lucivaldo, Ingrid, Sabrina, Oscar, Bruno, Rafael pelo apoio constante.

À Deus e à Nossa Senhora de Nazaré, pela fé, pela força e pela esperança de que tudo pode dar certo.

“O cérebro é como um bloco de pedra bruta que contém em si *todas* as esculturas possíveis [...]. No que ele se tornará depende do cinzel empunhado pela vida, pelo ambiente, pelas escolhas que o próprio cérebro faz no caminho.”

Suzana Herculano-Houzel

RESUMO

O período crítico de plasticidade do córtex cerebral é a etapa do desenvolvimento pós-natal do sistema nervoso onde os circuitos neurais são mais suscetíveis à mudanças influenciadas por informações oriundas do ambiente. No córtex pré-frontal de humanos, responsável pelas funções executivas, o período crítico de plasticidade estende-se desde o nascimento até o final da adolescência e início da vida adulta. Isto é definido, entre outros fatores, pelo amadurecimento das redes perineuronais, uma estrutura especializada da matriz extracelular, localizada em volta do corpo celular e dendritos proximais de interneurônios inibitórios. O objetivo desta pesquisa foi verificar o efeito do ambiente em etapas distintas da adolescência sobre a estrutura e a função do córtex pré-frontal de ratos e a distribuição da expressão espacial e temporal das redes perineuronais sob estas condições. As funções executivas foram avaliadas através de testes comportamentais medindo a capacidade de memória operacional e a inibição comportamental. Observamos que estímulos estressores crônicos imprevisíveis provocam alterações no período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal e, conseqüentemente, influenciam o amadurecimento das funções executivas. Observamos também que o estresse crônico induz modificação no padrão de amadurecimento das redes perineuronais no córtex pré-frontal. Estes resultados indicam a vulnerabilidade do córtex pré-frontal de ratos adolescentes para os efeitos negativos de estímulos ambientais estressores sobre o período crítico de plasticidade.

Palavras-Chave: Período Crítico de Plasticidade. Córtex Pré-frontal. Funções Executivas. Adolescência. Redes Perineuronais.

ABSTRACT

The critical period of plasticity is a period of postnatal brain development in which neural circuits are most susceptible to environmental influence. The critical period of plasticity of the human prefrontal cortex, which is responsible for executive functions, extends from birth to the end of adolescence and early adulthood. The critical period is defined, among other factors, by the maturation of perineuronal nets, a specialized structure of the extracellular matrix, which surrounds cell bodies and proximal dendrites of inhibitory interneurons. The aim of the present work was to ascertain the effects of environmental, through different adolescence phases, on the morphofunctional structure of the prefrontal cortex of rats and the spatial and temporal distribution of perineuronal nets. Executive functions were also evaluated by testing working memory capacity and behavioral inhibition. We observed that the chronic exposure to unpredictable stressors cause changes the critical period of plasticity in the prefrontal cortex and thereby influence the maturation of executive functions. We also observed that chronic stress induces changes in the spatial and temporal expression of perineuronal nets in the prefrontal cortex. More specifically, it induces the early maturation of these structures in adolescent rat brain. These results indicate the vulnerability of the adolescent brain to the negative effects of chronic stressors present in the environment.

Key-words: critical periods, prefrontal cortex, executive functions, adolescence, perineuronal nets.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: LOBOS DO CÓRTEX CEREBRAL.....	12
FIGURA 2: O PARCELAMENTO VERTICAL E HORIZONTAL DO CÓRTEX	14
FIGURA 3: AS SUB-REGIÕES DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	16
FIGURA 4: FUNÇÕES EXECUTIVAS.....	17
FIGURA 5: PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE EM MODELO	24
FIGURA 6: REDES PERINEURONAIS.....	26
FIGURA 7: NEURÔNIOS MARCADOS COM VICIA VILLOSA.....	28
FIGURA 8: REFINAMENTO SINÁPTICO.....	29
FIGURA 9: CURSO TEMPORAL DE DESENVOLVIMENTO.....	30
FIGURA 10: DIAGRAMA MOSTRANDO UM AMBIENTE ENRIQUECIDO.....	32
FIGURA 11: EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL.....	34
FIGURA 12: FOTOGRAFIA DO ALOJAMENTO COM AMBIENTE ENRIQUECIDO	41
FIGURA 13: DIAGRAMA DO APARATO EXPERIMENTAL	43
FIGURA 14: ALTERNÂNCIA ESPONTÂNEA.	45
FIGURA 15: EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL	50
FIGURA 16: VALORES DE DOSAGEM DE CORTICOESTERONA.....	52
FIGURA 17: EFEITOS SOBRE A REDE PERINEURONAL.....	53
FIGURA 18: EFEITOS SOBRE A REDE PERINEURONAL.....	54
FIGURA 19: REAÇÃO HISTOQUÍMICA PARA VICIA VILLOSA.....	55
FIGURA 20: REAÇÃO HISTOQUÍMICA PARA VICIA VILLOSA.....	56
FIGURA 21: REAÇÃO HISTOQUÍMICA PARA VICIA VILLOSA.....	57
FIGURA 22: EFEITOS SOBRE A MEMÓRIA OPERACIONAL.....	58
FIGURA 23: EFEITOS SOBRE A INIBIÇÃO COMPORTAMENTAL.....	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 ORGANIZAÇÃO DO CÓRTEX CEREBRAL COM ENFASE NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	12
1.1.1 O córtex cerebral	12
1.1.1.1 O córtex pré-frontal.....	14
1.1.1.1.1 <i>Anatomia</i>	15
1.1.1.1.2 <i>Funções do córtex pré-frontal</i>	16
1.1.1.1.2.1 <i>Funções executivas</i>	16
1.2 PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	19
1.2.1 Desenvolvimento do sistema nervoso e o início do período crítico	19
1.2.2 Períodos Críticos de Plasticidade	21
1.2.2.1 Papel da matriz extracelular	24
1.2.2.1.1 <i>Proteoglicanos de sulfato de condroitina</i>	25
1.2.2.1.2 <i>As redes perineuronais</i>	26
1.2.3 Período crítico de plasticidade no córtex pré-frontal	28
1.3 EFEITOS DO AMBIENTE SOBRE A PLASTICIDADE DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	30
1.3.1 Ambiente Enriquecido	31
1.3.2 Ambiente Estressor	32
1.4 HIPÓTESE EXPERIMENTAL.....	36
1.5 OBJETIVOS	37
1.5.1 Objetivo Geral	37
1.5.2 Objetivos Específicos	37
2 MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1 O MODELO EXPERIMENTAL	39
2.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	39
2.3 AMBIENTAÇÃO DOS ANIMAIS.....	40
2.3.1 Monitoramento dos efeitos do ambiente sobre o peso corporal	41
2.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL	42
2.4.1 Inibição comportamental	42
2.4.1.1 Tigmotaxia.....	42
2.4.1.1.1 <i>Aparato Experimental e Procedimento</i>	42
2.4.2 Memória operacional	43

2.4.2.1 Teste de Alternância Espontânea	43
2.4.2.1.1 <i>Aparato e Procedimento</i>	44
2.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	45
2.3.1 Perfusão e preparação dos cortes histológicos	45
2.3.2 Procedimento histoquímico	46
2.3.3 Lavagem, Desidratação e Montagem das Lâminas	46
2.3.4 Método de contagem de células	46
2.4 ANÁLISE SOROLÓGICA PARA O HORMÔNIO CORTICOSTERONA.....	47
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
3 RESULTADOS	49
3.1 MASSA CORPORAL.....	49
3.2 CORTICOESTERONA	51
3.3 A DISTRIBUIÇÃO ESPAÇOTEMPORAL DA REDE PERINEURONAL.....	52
3.4 MEMÓRIA OPERACIONAL	58
3.5 INIBIÇÃO COMPORTAMENTAL	59
4 DISCUSSÃO	60
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DO MODELO EXPERIMENTAL	60
4.2 EFEITO DO AMBIENTE SOBRE O PESO CORPORAL E SOBRE OS NÍVEIS DE CORTICOESTERONA	62
4.3 EFEITO DO AMBIENTE SOBRE AS REDES PERINEURONAIS.....	63
4.4 EFEITO DO AMBIENTE SOBRE AS FUNÇÕES EXECUTIVAS	66
5 CONCLUSÃO	69
REFERENCIAS	71
ANEXO	83

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do presente trabalho é compreender os efeitos do ambiente sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central, mais especificamente do córtex pré-frontal. Esta região cortical é responsável pelas funções executivas que controlam e implementam os comportamentos orientados para realização de objetivos (GILBERT; BURGUESS, 2008).

Neste trabalho, utilizamos como estratégia a exposição de animais experimentais (ratos) a ambientes que diferem na presença de estímulos estressores crônicos durante o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal. O período crítico é uma janela temporal do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) no qual os circuitos neurais estão mais susceptíveis a modificações em sua estrutura e função em decorrência de estímulos ambientais (HENSCH, 2005).

Em mamíferos, o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal ocorre durante a adolescência. Ao mesmo tempo em que proporciona um grau de plasticidade adequado para a formação de circuitos neurais adaptados ao ambiente externo ao animal, o período crítico também os torna mais vulneráveis a insultos. Esse período especial do desenvolvimento do sistema nervoso está associado à diversos comportamentos característicos da adolescência em humanos, como a maior instabilidade emocional, a maior exposição aos riscos, e à maior prevalência de doenças psiquiátricas que surgem na adolescência, como a esquizofrenia, por exemplo.

Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que 20% dos adolescentes possuem algum problema de saúde mental, sendo a depressão e a ansiedade os problemas mais comuns, com o suicídio despontando como uma das principais causas de morte nos jovens (WHO, 2012). Este risco é aumentado pela exposição a ambientes associados com a pobreza e a violência. Como resultado, cerca de 16 milhões de adolescentes se tornam mães a cada ano, 40% das novas infecções por HIV em todo o mundo são em adolescentes e estima-se que milhares de jovens morram todos os dias vítimas de violência interpessoal (WHO, 2012).

Nossa expectativa é que este trabalho contribua para uma compreensão melhor sobre o papel das influências ambientais no desenvolvimento e maturação do córtex pré-frontal durante a adolescência. Essa contribuição é importante no

contexto atual, no qual brotam polêmicas sobre as políticas públicas voltadas para crianças e adolescentes, sejam aquelas voltadas para a promoção e prevenção de riscos e agravos à saúde, ao desenvolvimento de programas de proteção social, à discussão da maioridade penal, à elaboração de estratégias de ensino, entre outras.

1.1 ORGANIZAÇÃO DO CÓRTEX CEREBRAL, COM ÊNFASE NA REGIÃO PRÉ-FRONTAL

1.1.1 O córtex cerebral

O córtex cerebral é a região que mais se expandiu no curso da evolução humana, sendo associado com um repertório vasto de comportamentos complexos (DEFELIPE, 2011). Em primatas e outros animais, esta expansão imprimiu na organização cortical a presença de sulcos e giros que conferem a esta estrutura uma geometria peculiar. A área de superfície do córtex humano é cerca de 2.200 a 2.400 cm², mas cerca de dois terços desta área estão confinados nos sulcos (ABOITIZ, MONTIEL, 2008; DEFELIPE, 2011; LENT, 2008; RAKIC, 2000).

O córtex cerebral é organizado em lobos (Figura1): frontal, parietal, temporal, occipital e insular. Os quatro primeiros são visíveis externamente, enquanto o último é normalmente encoberto (FUSTER, 2002).

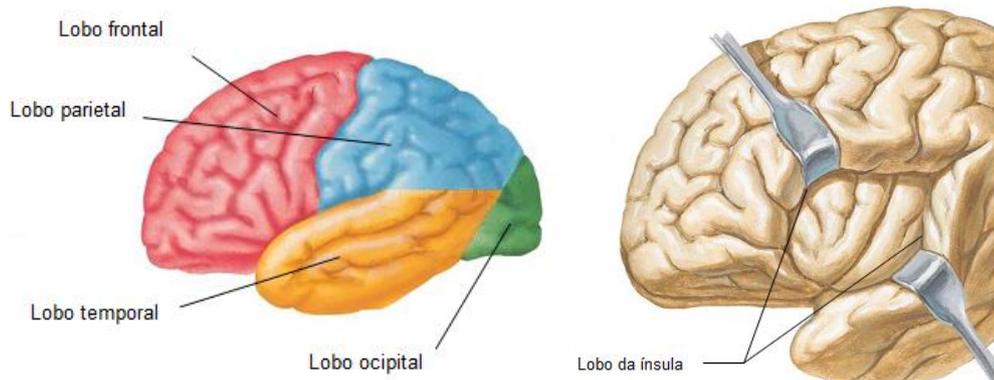


Figura1: **Lobos do córtex cerebral.** Adaptado de Netter et al.(2002) e Purves et al.(2009)

Os neurônios do córtex cerebral apresentam uma variedade de formas e tamanhos. Em geral, podem ser definidos como neurônios de projeção e interneurônios. Os primeiros são geralmente excitatórios, possuem um corpo celular em forma de pirâmide e seus axônios projetam-se por longas distâncias e usam o glutamato como seu neurotransmissor principal. Os interneurônios são principalmente células inibitórias, de corpo pequeno e estrelado, com axônios curtos,

de projeção local e utilizam principalmente o neurotransmissor inibitório ácido gama-amino-butírico (GABA) (DEFELIPE; ALONSO-NANCLARES; ARELLANO, 2002).

No córtex cerebral estas células organizam-se em camadas de células densamente empacotadas (Tabela 1). O número de camadas varia ao longo do córtex (DEFELIPE; ALONSO-NANCLARES; ARELLANO, 2002). As variações nesse padrão de organização laminar produzem diferenças citoarquitetônicas que permitem a identificação de pelo menos 52 subdivisões do córtex cerebral (DEFELIPE; ALONSO-NANCLARES; ARELLANO, 2002), conforme podemos observar na Figura 2, abaixo.

Tabela 1: Descrição das camadas corticais.

Camada	Descrição
I	Camada molecular. Ocupada por dendritos e axônios.
II	Camada granular externa. Composta de células esféricas granulares.
III	Camada piramidal externa. Contém uma variedade de tipos celulares e neurônios piramidais.
IV	Camada granular interna. Contém células granulares.
V	Camada piramidal interna. Contém neurônios piramidais.
VI	Camada multifome. Região heterogênea que mistura-se à substância branca.

As células com funções semelhantes tendem a se arranjar em colunas, que atingem todas as camadas corticais (Figura 2) (MOUNTCASTLE, 1997). As camadas corticais podem ser caracterizadas pela sua estrutura histológica e neuroquímica, pelo padrão de conexões (aférentes e eferentes) e pelas suas propriedades funcionais (DEFELIPE; ALONSO-NANCLARES; ARELLANO, 2002).

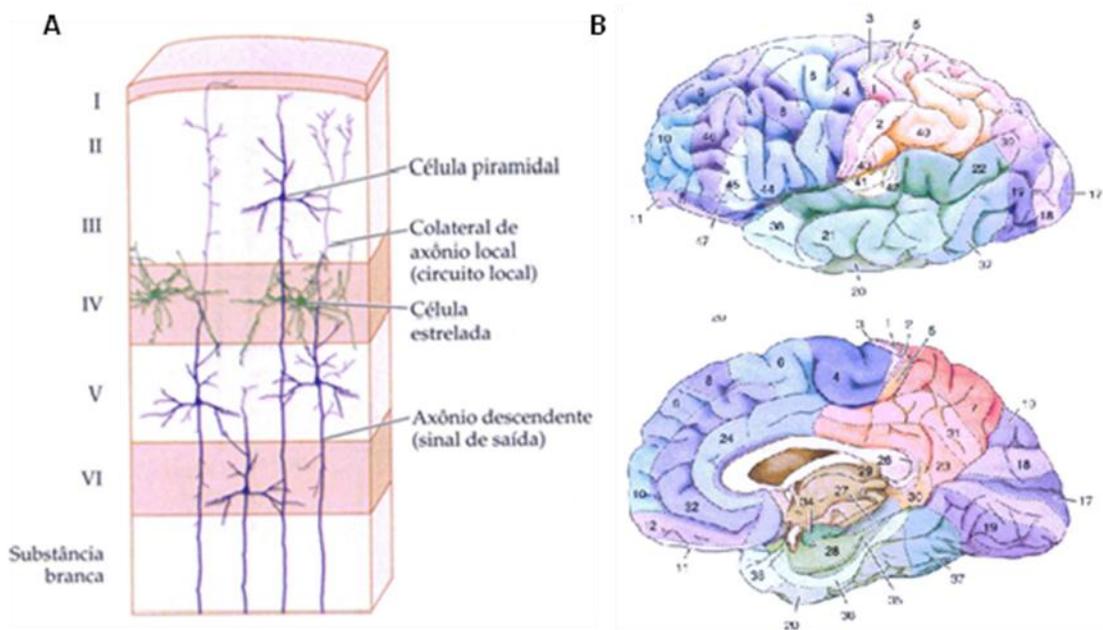


Figura 2: **O parcelamento vertical e horizontal do córtex cerebral.** **A.** Descrição da composição e organização celular das camadas do neocórtex. **B.** Mapa citoarquitetônico descrito por Korbinian Brodmann, um importante neuroanatomista alemão no início do século XX, baseado nas diferenças das colunas corticais. Adaptado de Purves et al.(2009).

1.1.1.1 O córtex pré-frontal

O lobo frontal compreende cerca de um terço do córtex cerebral humano. Sua expansão durante a evolução está associada ao surgimento de competências cognitivas cada vez mais complexas (DEFELIPE, 2011; FUSTER, 2002). Em humanos o lobo frontal é segregado anatomicamente do lobo parietal pelo sulco central. O sulco lateral separa os lobos frontal e temporal. O lobo frontal inclui várias áreas motoras, além do córtex pré-frontal, que ocupa a sua porção mais anterior (FUSTER, 2002; NETTER et al., 2002; SMITH; JONIDES, 1999).

O córtex pré-frontal tem sido foco de um número crescente de trabalhos científicos publicados nos últimos anos, devido a sua associação com desordens psiquiátricas com tendência de aumento na prevalência em todo o mundo: transtorno de déficit de atenção e hiperatividade; esquizofrenia, autismo, depressão, etc. (BENNETT, 2011; DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004; SPEAR, 2000b).

A maioria dos conhecimentos sobre esta região do córtex cerebral são oriundos de estudos de casos clínicos, de experimentos com roedores e primatas e, mais recentemente, através de estudos de imageamento com ressonância

magnética funcional, que permite a visualização das áreas cerebrais durante a realização de tarefas específicas (GIEDD et al., 1999; WISE, 2008).

O caso clínico de comprometimento da função pré-frontal mais conhecido é o do capataz de construção civil Phineas Gage, que com 25 anos de idade sofreu um acidente de trabalho no qual uma barra de ferro transfixou a porção anterior de sua cabeça. Após este episódio, o Sr. Gage que era considerado um cidadão exemplar na sua comunidade, passou a demonstrar diversos problemas no controle e na regulação de seu comportamento (DAMÁSIO, 1996). Recentemente, no Brasil, um operário da construção civil sofreu um acidente semelhante com um vergalhão (OPERÁRIO...,2012). Seria interessante acompanhar a evolução do seu caso, para comparar com o ocorrido com Phineas Gage.

1.1.1.1.1 Anatomia

Em mamíferos, o córtex pré-frontal está conectado a regiões motoras, perceptuais e límbicas, além de outras estruturas corticais e subcorticais, notadamente o núcleo medial dorsal do tálamo (FUSTER, 2002; GOLDMAN-RAKIC; PORRINO, 1985; ONGUR; PRICE, 2000). Em primatas, o córtex pré-frontal consiste de vários campos anatomicamente diferentes, associados com as regiões dorsolateral, medial e orbital (Figura 3). Estas três regiões são extensas e recebem aferências do núcleo medial dorsal do tálamo em sua camada granular. Essa característica distingue o córtex pré-frontal do córtex motor e pré-motor que são agranulares (FUSTER, 1997, 2002; SAPER; IVERSEN; FRANCKOWIAK, 2000).

Embora a organização do córtex pré-frontal apresente variação significativa entre as espécies, existem muitas similaridades na distribuição de áreas e conexões das áreas mediais e orbitais (ONGUR; PRICE, 2000; WISE, 2008). Em roedores, especialmente em ratos, a característica citoarquitetônica mais evidente é que o córtex pré-frontal é composto de algumas áreas corticais agranulares (UYLINGS; VAN EDEN, 1990).

Existe uma tentativa de divisão do córtex pré-frontal de ratos em três sub-regiões distintas (Figura 3). Em primeiro lugar, uma região cortical localizada medialmente, o córtex pré-frontal medial, que constitui a maior parte da parede medial do hemisfério anterior e se localiza em uma posição dorsal ao joelho do corpo caloso. Em segundo lugar, uma região cortical localizada ventralmente,

denominada córtex pré-frontal ventral (orbital), que se encontra na parte dorsal da extremidade caudal do bulbo olfatório na margem dorsal do sulco rinal (HEIDBREder; GROENEWEGEN, 2003). Por último, uma região cortical localizada lateralmente, o córtex pré-frontal lateral, que também é referido como córtex insular agranular e está localizado na parte anterior do sulco rinal (DIVAC; MOGENSON, 1985; GROENEWEGEN, 1988; SESACK et al., 1989).

Achados recentes sugerem que processos cognitivos distintos ocorrem nessas sub-regiões do córtex pré-frontal, tanto em roedores como em primatas e que a sub-região medial de ratos é homóloga ao córtex pré-frontal dorsolateral em primatas (CERQUEIRA et al., 2005; DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004; ONGUR; PRICE, 2000; UYLINGS, GROENEWEGEN; KOLB, 2003; WISE, 2008).

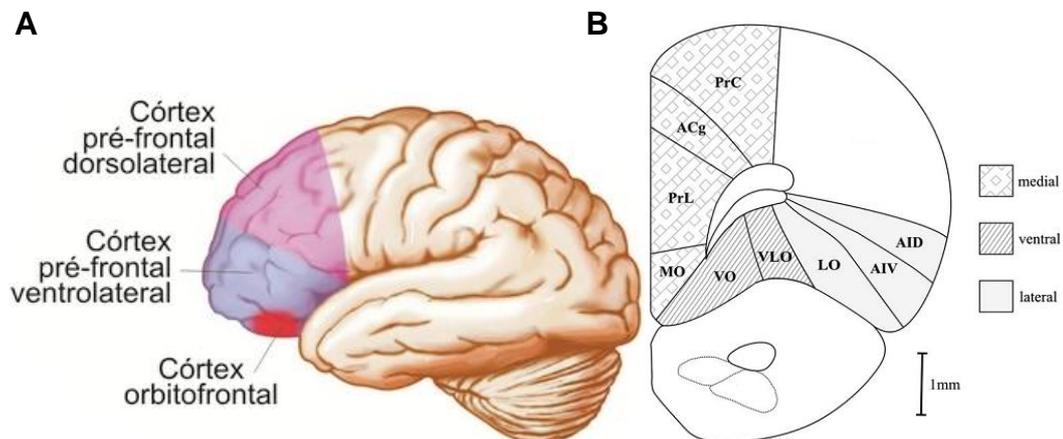


Figura 3: **As sub-regiões do córtex pré-frontal.** Desenho esquemático mostrando regiões que fazem parte do córtex pré-frontal de humanos e ratos. **A.** Perspectiva lateral do córtex pré-frontal em humanos (região dorsolateral, ventrolateral e orbitofrontal); **B.** Seção coronal unilateral de ratos, aproximadamente 3.5 mm do Bregma. As diferentes marcações demonstram as três principais subdivisões do pré-frontal de ratos (medial, ventral e lateral). Adaptado de Lent (2010), e Dalley, Cardinal e Robbins (2004).

1.1.1.1.2 Funções do Córtex Pré-Frontal

1.1.1.1.2.1 Funções executivas

Frequentemente, o cotidiano apresenta desafios e situações imprevistas que demandam o recurso a habilidades cognitivas complexas. Um exemplo de situação corriqueira (Figura 4) em que é necessário a orquestração de um repertório cognitivo complexo pode ser o seguinte: imagine um homem, pai de dois filhos em idade

escolar e que planeja organizar um jantar para a festa de aniversário de casamento com sua esposa. Ele decide, então, que sairá do trabalho mais cedo para comprar um presente, precisará ir ao supermercado para fazer as compras necessárias, em seguida, buscará os filhos na escola e então irá para casa preparar o jantar. É possível observar neste exemplo a existência de uma estratégia comportamental global, com subtarefas que devem ser distribuídas em uma sequência temporal de forma ordenada e mantidas na memória até que o objetivo final seja atingido.

No entanto, devido a uma ocorrência emergencial de última hora, o homem fica retido um pouco mais no local de trabalho e, ao sair, encontra um tráfego intenso. Esta conjuntura, provavelmente, vai exigir uma flexibilização de suas ações. Mudar a rota para evitar o trânsito ou arriscar ultrapassar alguns semáforos no sinal vermelho? Ou ainda, trafegar em cima do acostamento para abreviar o tempo de percurso? Estes são comportamentos inadequados socialmente e, portanto, devem ser inibidos.

Talvez deixar de comprar um presente ou abreviar a ida ao supermercado para não perder a hora de saída da escola? ou inverter a ordem das ações? No supermercado, um ingrediente inadequado para o cardápio planejado pode ser colocado no carrinho de compras. Se ele estiver monitorando adequadamente suas ações, vai detectar o erro e providenciar sua correção. Todos esses processos mentais devem ser gerenciados adequadamente para que o objetivo final seja realizado: organizar o jantar.



Figura 4: **Funções Executivas.** Comportamento orientado a um objetivo envolve raciocínio lógico, elaboração de estratégias, tomada de decisões, memória, monitoramento de erros e inibição de comportamentos inapropriados.

O exemplo acima denota um conjunto de funções cognitivas necessárias para o desempenho de uma tarefa normal do cotidiano. Estas funções incluem raciocínio lógico, elaboração de estratégias e tomada de decisões, flexibilidade cognitiva, memória operacional e inibição de comportamento, entre outras. Estas funções possuem papel central na organização do comportamento e são conhecidas como funções executivas (ARDILA, 2008; GILBERT; BURGUESS, 2008; HUIZINGA; DOLAN; VAN DER MOLEN, 2006). As funções executivas são um conjunto de operações que organizam e direcionam o comportamento para que o mesmo funcione de maneira biologicamente adaptativa (OLIVEIRA-SOUZA et al., 2008; GILBERT; BURGUESS, 2008). Neste trabalho, focalizamos em duas funções executivas específicas: a memória operacional e a inibição comportamental.

a) Memória Operacional

A memória operacional (ou de trabalho) está relacionada com o armazenamento e manipulação, por um curto período de tempo, das informações necessárias para realizar uma determinada tarefa. Deve ser diferenciada da memória de curta duração, já que além do armazenamento de informações relevantes às tarefas, envolve processos relacionados com a manipulação dessa informação (FUSTER, 1995;; KOLB, 1990; OLIVEIRA-SOUZA et al., 2008). Para Baddeley e Logie (1999) a memória operacional possibilita a compreensão e representação mental do ambiente imediato e a integração de informações sobre experiências prévias, possibilitando a aquisição de novos conhecimentos e a resolução de problemas atuais.

Em roedores, a memória operacional é comumente avaliada através de testes comportamentais simples, como o labirinto radial a alternância espontânea, entre outros (DALLEY, CARDINAL; ROBBINS, 2004; LALONDE, 2002).

b) Inibição comportamental

A inibição comportamental é a capacidade cognitiva de atenuar ou cessar uma resposta prepotente inadequada (ARON et al., 2004; CHRIST et al., 2001). Esta função executiva é necessária em muitas situações do cotidiano (WILLIAMS et al.,

1999). A inibição de comportamentos inadequados para a realização de uma determinada tarefa é uma competência crítica para o sucesso acadêmico, profissional e o ajuste na sociedade em geral (MOFFIT et al., 2011).

Esta função executiva é um tipo de controle de impulsos de interesse particular devido sua relação com disfunções cognitivas associadas ao desenvolvimento cerebral, como o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, o autismo e a esquizofrenia (MIKA et al., 2012). Entre os métodos experimentais disponíveis para investigar esta função cognitiva, existe um paradigma que associa a capacidade de inibição de respostas com o nível de ansiedade do animal (MARTINEZ; MORATO, 2004).

Por exemplo, em roedores, alguns estudos utilizam testes comportamentais baseados no tigmotatismo, a tendência natural destes animais quando confrontados com novos ambientes de procurar proteção próximo a superfícies verticais. À medida em que se habitua aos novos ambientes estes animais passam a explorar mais. Este comportamento natural é influenciado pelo nível de ansiedade do animal (PELLOW et al., 1985; SIMON; DUPUIS; CONSTANTIN, 1994; TREIT; FUNDYTUS, 1988).

1.2 PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

1.2.1 Desenvolvimento do sistema nervoso e o início do período crítico.

A diversidade comportamental e cognitiva dos seres humanos é determinada pela interação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais que agem durante o desenvolvimento do SNC (DEFELIPE, 2011; TAU; PERTESON, 2010; UZIEL, 2008). O amadurecimento do cérebro não é homogêneo, algumas regiões amadurecem antes do que as outras e alguns dos eventos associados ao fenótipo comportamental adulto estão finalizados antes do nascimento, enquanto outros continuam até a idade adulta (LENROOT; GIEDD, 2006).

O sistema nervoso deriva da camada embrionária mais externa de células germinativas, o ectoderma. As células desta camada se proliferam e se transformam no tubo neural. Vários eventos morfogenéticos que ocorrem no tubo neural culminam com a formação das vesículas precursoras do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (LENROOT; GIEDD, 2006; TAU; PERTESON, 2010; UZIEL, 2008)

O desenvolvimento do SNC ocorre em uma sequência de etapas, até a formação do cérebro adulto. Em nível celular, ocorrem os seguintes eventos que podemos dividi-las da seguinte forma: proliferação das células nervosas, migração neuronal, diferenciação morfofuncional, formação de circuitos neurais e a eliminação programada de células nervosas (LENROOT; GIEDD, 2006; TAU; PERTESON, 2010).

Quanto à gênese do córtex cerebral, a formação de suas camadas ocorre de “dentro para fora”: as primeiras células diferenciadas a sair do ciclo de divisão mitótica na camada germinativa da zona subventricular migram ao longo da glia radial e finalizam seu movimento na parte inferior da placa cortical, que posteriormente se transformará nas camadas profundas do córtex cerebral. As células com diferenciação posterior na zona subventricular irão povoar camadas corticais cada vez mais superficiais (ABOITIZ; MONTIEL, 2008; DEFELIPE; ALONSO-NANCLARES; ARELLANO, 2002; RAKIC, 2006, 2000; TAU; PERTESON, 2010).

Um dos principais eventos do desenvolvimento do sistema nervoso é a definição do padrão de conexão neural. Diversos estudos demonstram que os circuitos neurais dependem de mecanismos celulares que promovem o crescimento de neuritos (axônios e dendritos em desenvolvimento) e culminam na formação de sinapses (TAU; PERTESON, 2010). Uma vez que as sinapses são estabelecidas, os neurônios se tornam dependentes da presença de fatores tróficos (neurotrofinas) para sobrevivência (FELDMAN, 2009).

Depois de formarem os circuitos neurais, os axônios são progressivamente mielinizados, num processo que se estende pelo período de desenvolvimento pós-natal, conferindo maior velocidade na propagação do impulso nervoso (TAU; PERTESON, 2010). Ao mesmo tempo, ocorrem processos celulares regressivos como a morte neuronal programada e a poda de processos dendríticos e axonais, que dependem de influências ambientais. Desde o período pré-natal até a adolescência há um refinamento intenso das conexões neurais (HENSCH, 2004; TAU; PERTESON, 2010; UZIEL, 2008; ZHANG, 2006).

A mielinização do córtex cerebral ocorre de acordo com um gradiente espaço-temporal que inicia em áreas sensoriais primárias e termina no córtex pré-frontal e no córtex parietal posterior (CRONE; RIDDERINKHOF, 2011; FELDMAN, 2009; TAU; PERTESON, 2010; ZHANG, 2006).

A plasticidade sináptica cortical provavelmente ocorre por um mecanismo que depende da sincronização da atividade pré- e pós-sináptica, de acordo com o postulado por Donald Hebb (1949). De acordo com essa proposta, quando a atividade dos neurônios pré e pós-sinápticos está correlacionada ocorre um fortalecimento das sinapses. A dessincronização da atividade nesses elementos causa o enfraquecimento da conexão sináptica. Esse mecanismo é conveniente para explicar a maneira como o ambiente determina o padrão de conexão de populações neurais no córtex (DEFELIPE, 2011; FELDMAN, 2009; ZHANG, 2006). Essa influência ambiental é mais eficiente durante certas janelas temporais, denominadas de períodos críticos de plasticidade (FELDMAN, 2009; SENGPIEL, 2007).

1.2.2 Períodos Críticos de Plasticidade

A plasticidade do sistema nervoso refere-se à sua capacidade de modificação adaptativa em resposta às influências ambientais. A interação entre as contribuições genéticas, epigenéticas e ambientais são os fatores que contribuem, com pesos diferenciados, na construção do cérebro maduro dos indivíduos e a fonte mais importante da variabilidade individual no comportamento. A plasticidade neuronal é essencial para o aprendizado e a transmissão cultural da espécie humana (FELDMAN, 2009; LENT, 2008b).

A plasticidade pode manifestar-se de três maneiras: morfológica, ou seja, mediante alterações nos axônios, nos dendritos e nas sinapses; funcional, mediante alterações na fisiologia neuronal e sináptica; e comportamental, em decorrência de alterações relacionadas com os fenômenos de aprendizagem e memória (LENT, 2008b).

O conceito de períodos críticos de desenvolvimento foi proposto pioneiramente por pesquisadores como Konrad Lorenz, em meados de 1930. Lorenz estudou o processo de *imprinting*, onde os filhotes de gansos recém-nascidos podem desenvolver apego social a uma variedade de objetos. Ele descobriu que este processo está limitado a um período curto de tempo, que chamou de período crítico (COLOMBO, 1982).

As evidências neurobiológicas para a proposta de Lorenz vieram, inicialmente, de estudos sobre o desenvolvimento do sistema visual de mamíferos, como os experimentos de David Hubel e Torsten Wiesel realizados na década de 1960 (BAVELIER, 2010; WIESEL; HUBEL, 1963a). Estes pesquisadores demonstraram que a privação monocular em gatos, durante o período crítico de desenvolvimento do córtex visual primário, faz com que as células que normalmente responderiam ao olho privado passem a responder ao olho não privado. Essa modificação ocorre de maneira mais evidente em manipulações realizadas dentro do período crítico (WIESEL, 1982; WIESEL; HUBEL, 1964). Os estudos iniciais de Hubel e Wiesel sugeriram que a plasticidade, principalmente durante os períodos críticos, dependia da ação de neurônios excitatórios (WIESEL; HUBEL, 1963a; WIESEL; HUBEL, 1963b; WIESEL; HUBEL, 1964).

No entanto, outras evidências começaram a surgir, no fim da década de 1980, sobre a importância dos neurônios inibitórios na determinação dos períodos críticos (FELDMAN, 2009; HENSCH, 2003). Por exemplo, Reiter e Stryker (1988) demonstraram que a administração de substâncias inibitórias tornaram células do córtex visual resistentes à privação monocular durante o período crítico. Esses autores demonstraram também que a redução da plasticidade cortical observada em camundongos que expressavam níveis reduzidos de GABA pode ser revertida com a administração de agonistas GABAérgicos (REITER; STRYKER, 1988).

As evidências para a existência de períodos críticos em outros sistemas têm se acumulado em diversas espécies (HENSCH, 2005). Por exemplo, Bahia e colaboradores (2008) demonstraram a existência de períodos críticos de plasticidade no córtex somestésico primário de ratos. Os interneurônios GABAérgicos representam cerca de 25% da população de neurônios corticais em primatas (DEFELIPE; ALONSO-NANCLARES; ARELLANO, 2002; RAKIC, 2006). Um subgrupo de interneurônios gabaérgicos expressam uma proteína ligante de Ca^{++} chamada de parvalbumina. Ao longo do desenvolvimento, as células parvalbumina positivas (células PV) são associadas com formas especializadas de matriz extracelular, as redes perineuronais, que controlam o microambiente em volta do corpo celular (FELDMAN, 2009; HENSCH, 2005; SENGPIEL, 2007; SUGIYAMA; PROCHIANTZ; HENSCH, 2009).

O desenvolvimento dos circuitos inibitórios corticais ocorre posteriormente ao dos circuitos excitatórios. Diversas evidências demonstram que o

amadurecimento de neurônios GABAérgicos determina o fim do período crítico, equilibrando as conexões excitatórias e inibitórias nos circuitos neurais (HENSCH, 2005; SENGPIEL, 2007). Outros estudos demonstram que quando a maturação dos interneurônios GABAérgicos é comprometida, ocorre um atraso no fechamento do período crítico. Do mesmo modo, o início do período crítico pode ser prematuramente alterado pelo tratamento com drogas que afetam a atividade GABAérgica (Figura 5) (BERARDI; PIZZORUSSO; MAFFEI, 2000; HENSCH, 2003, 2004, 2005).

Sugiyama e colaboradores (2008) descobriram que uma homeoproteína conhecida como Otx2, uma espécie de fator de transcrição comumente relacionada ao desenvolvimento embrionário, está envolvida na determinação do início do período crítico. Estes pesquisadores observaram que a Otx2 atua como um “mensageiro” que informa ao encéfalo sobre o nível de estímulos sensoriais relevantes no ambiente, acumulando-se em células PV. Esta homeoproteína é reduzida no córtex visual após a criação em ambientes sem estímulos visuais, indicando que sua emergência é dependente da experiência (SUGIYAMA et al., 2008; SUGIYAMA; PROCHIANTZ; HENSCH, 2009). A Otx2 é mais evidente dentro de células PV no pico do período crítico e na vida adulta. O acúmulo endógeno desta proteína está correlacionado com o aumento do número de células PV envolvidas por redes perineuronais. A infusão artificial desta homeoproteína aumentou a expressão de células PV e aumentou o número de células envolvidas por redes perineuronais (SUGIYAMA et al., 2008).

Outras evidências implicam a proteína Lnyx1 no desenvolvimento do período crítico de plasticidade (MORISHITA et al., 2010). Esta proteína inibe receptores colinérgicos nicotínicos e altera o equilíbrio entre excitação e inibição sináptica (HIGLEY; STRITTMATTER, 2010). Morishita e colaboradores (2010) encontraram um aumento gradativo da expressão desta proteína ao longo do período crítico no córtex visual e observaram que animais modificados geneticamente para não expressar Lnyx1 apresentaram uma plasticidade aumentada quando adultos. Esses autores observaram também que essas proteínas são expressadas em células PV e podem estar envolvidas com o fim do período crítico (MORISHITA et al., 2010).

Bavelier e colaboradores (2010) identificaram duas classes principais de fatores que atuam como “freios” do período crítico: 1) fatores funcionais e 2) fatores estruturais (Figura 5). Os primeiros envolvem mudanças no equilíbrio entre excitação

e inibição através de modificação na disponibilidade de neurotransmissores como a dopamina, a serotonina e a acetilcolina, entre outros. Já os fatores estruturais podem regular o crescimento de neuritos, como a mielina, a estabilização de conexões sinápticas, como as redes perineuronais.

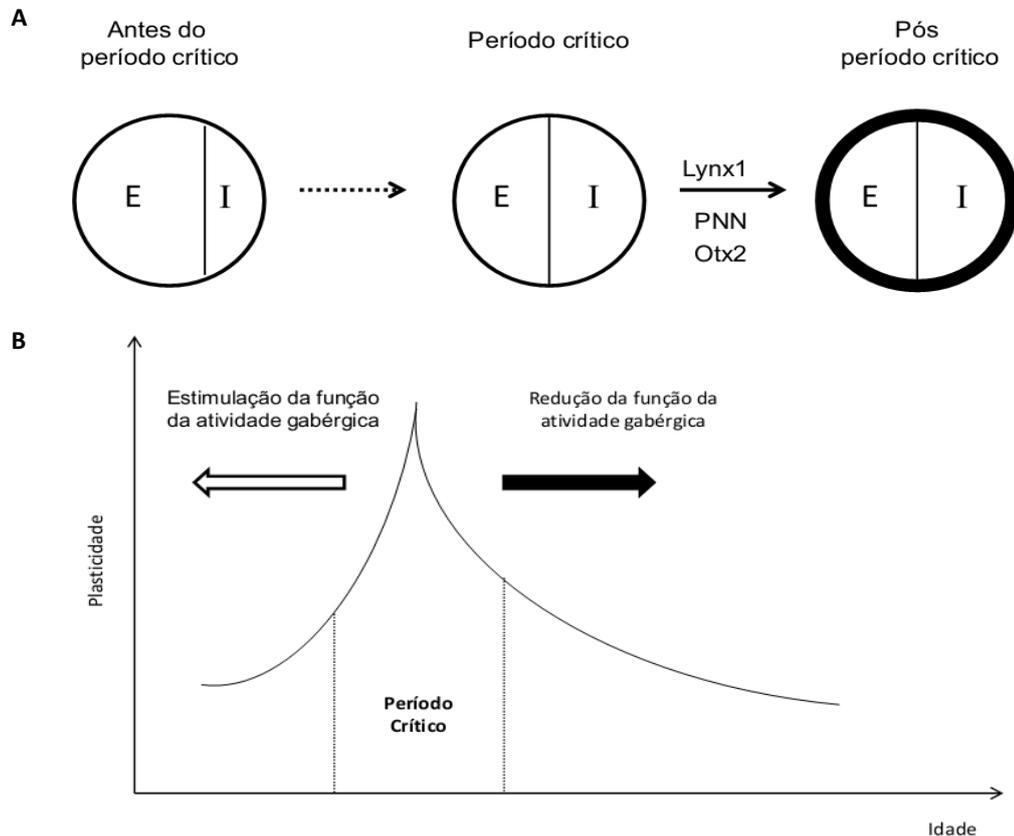


Figura 5: **Período crítico de plasticidade em modelo experimental do córtex visual.** **A.** Antes do período crítico observa-se um desequilíbrio das funções excitatórias e inibitórias (esquerda) que transita (seta pontilhada) para um equilíbrio durante o período crítico (centro) e é estabilizado por diversos fatores (seta preta) em um momento pós-período crítico (direita). **B.** Controle do período crítico mediado por GABA. Fatores que reduzem a função GABAérgica atrasam o período crítico e fatores que estimulam, aceleram o mesmo. Adaptado de Morishita; Hensch (2008) e Hensch (2005).

1.2.2.1 Papel da matriz extracelular

O tecido nervoso assim como outros tecidos do corpo não é constituído somente por células. Uma parte substancial deste tecido é constituído de matriz extracelular interposta entre as células neurais e da glia. A matriz extracelular é composta por uma ampla variedade de proteínas e de polissacarídeos secretados localmente (DITYATEV; SCHACHNER, 2003, 2006).

As principais classes de macromoléculas que compõem a matriz extracelular são: proteínas fibrosas (colágeno, elastina, fibronectina e laminina) e as cadeias de

polissacarídeos de glicosaminoglicanos ligadas a proteínas na forma de proteoglicanos (BERARDI; PIZZORUSSO; MAFFEI, 2004; DEEPA et al., 2006; DITYATEV; SCHACHNER, 2003; FAISSNER et al., 2010; YAMAGUCHI, 2000).

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos longos, lineares, compostos por cadeias e unidades dissacarídicas repetitivas. Um dos dois açúcares no dissacarídeo repetido é sempre uma amino açúcar (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina), que é, na maioria das vezes, sulfatado. O outro açúcar é tipicamente um ácido urônico (glicurônico ou idurônico). Em virtude dos açúcares geralmente serem sulfatados e também conterem grupos carboxila, eles apresentam carga negativa, logo atraem íons Na^+ e, por conseguinte, água (DEEPA et al., 2006; DITYATEV; SCHACHNER, 2003; KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012; YAMAGUCHI, 2000).

Os principais grupos de glicosaminoglicanos são: hialurona, sulfato de dermatan, sulfato de keratam, sulfato de heparan e sulfato de condroitina (KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012; LAABS et al., 2005). Com exceção da hialurona, todos os glicosaminoglicanos estão ligados covalentemente a uma proteína principal, formando os proteoglicanos (LAABS et al., 2005; RHODES; FAWCETT, 2004; YAMAGUCHI, 2000).

1.2.2.1.1 Proteoglicanos de sulfato de condroitina

Os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSC) são os principais componentes da matriz extracelular do sistema nervoso central. Existem pelo menos 16 tipos de PGSC. No entanto, os mais comuns pertencem à uma família conhecida como lecticanas: neurocan, brevican, versican, aggrecan, entre outras. As lecticanas neurocan e brevican são bem frequentes no SNC (DITYATEV; SCHACHNER, 2003; FAISSNER et al., 2010; KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012; LAABS et al., 2005; YAMAGUCHI, 2000).

Os PGSC são associados a diversas funções, entre elas o controle da plasticidade durante os períodos críticos (LAABS et al., 2005). A sua expressão espaço-temporal e a sua composição mudam ao longo do desenvolvimento, em um modo dependente de atividade (DITYATEV; SCHACHNER, 2003; KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012). Estas macromoléculas estabilizam sinapses perissomáticas, evitando mudanças substantivas no padrão de conexões, através das redes

perineuronais (DITYATEV; SCHACHNER, 2003; KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012; LAABS et al., 2005).

1.2.2.1.2 As redes perineuronais

As redes perineuronais foram descobertas por Camilo Golgi (Figura 6) (CELIO et al., 1998) e descritas como agregados de matriz, altamente organizados, que envolvem a superfície do soma e dos dendritos proximais de populações neuronais distintas (HARTIG et al., 1994; KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012; WANG; FAWCETT, 2012).

Estas redes foram visualizadas inicialmente através de técnicas histoquímicas com uso da prata. Atualmente, podem ser visualizadas através do uso de lectinas (Figura 6), tais como a *Wisteria floribunda agglutinin* e a *Vicia villosa*, que possuem afinidade por N-acetilgalactosamina e por anticorpos associados a marcadores específicos (BAHIA et al., 2008; KARETKO; SKANGIEL-KRAMSKA, 2009; RHODES; FAWCETT, 2004; WANG; FAWCETT, 2012).

As redes perineuronais são heterogêneas em estrutura e composição, incorporando moléculas secretadas tanto de neurônios quanto células gliais (KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012). Os principais componentes destas redes são a hialurona, proteínas de ligação, PGSC e tenascina-R (WANG; FAWCETT, 2012). As redes perineuronais envolvem os corpos celulares e os dendritos proximais em uma estrutura em forma de malha que interdigita com contatos sinápticos (BERARDI; PIZZORUSSO; MAFFEI, 2004; DEEPA et al., 2006; DITYATEV; SCHACHNER, 2003, 2006; WANG; FAWCETT, 2012).

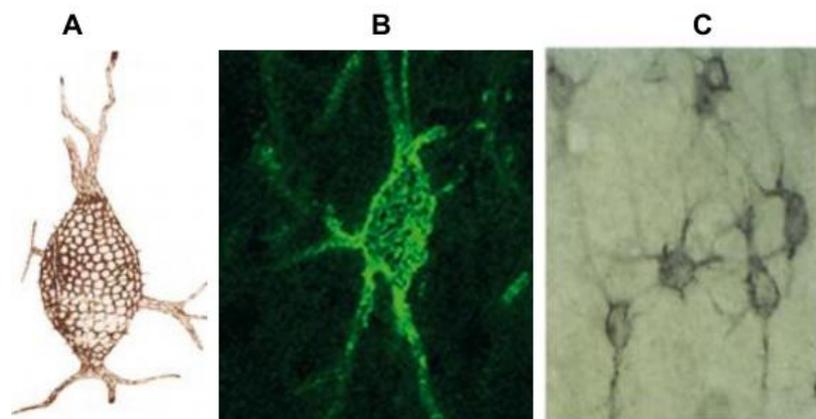


Figura 6: **Redes Perineuronais.** **A.** Desenho esquemático de Ramon y Cajal. **B.** Rede perineuronal marcada com *Wisteria Floribunda Agglutinin* no córtex somatosensorial de camundongos. **C.** Rede

perineuronal marcada com *Vicia villosa* no córtex parietal de ratos. Adaptado de Célio (1998), Karetko e Skangiel-Kramaska (2009) e Hartig et al. (1994).

As redes perineuronais estão presentes em circuitos glutamatérgicos e gabaérgicos (KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012). No entanto, esta forma especializada de matriz extracelular é mais frequente em interneurônios parvalbulmina positivos (FAISSNER et al., 2010; KARETKO; SKANGIEL-KRAMSKA, 2009).

As redes perineuronais podem agir como barreiras à difusão de moléculas de sinalização extracelular e podem estabilizar sinapses e controlar a plasticidade sináptica (FAISSNER et al., 2010; RHODES; FAWCETT, 2004). Existem evidências de que também atuam na neuroproteção e no suporte a homeostase iônica em volta de neurônios altamente ativos (DEEPA et al., 2006).

O envolvimento das redes perineuronais na plasticidade neuronal tem sido bastante estudado nos últimos anos (WANG; FAWCETT, 2012). Sua formação ocorre mais tardiamente durante o desenvolvimento e o curso temporal do seu amadurecimento coincide com os eventos definidores dos períodos críticos de plasticidade. As redes perineuronais surgem após os eventos de neurogênese, gliogênese e sinaptogênese no encéfalo em desenvolvimento e atuam para restringir o crescimento axonal, estabilizar conexões existentes e limitar a plasticidade (KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012).

A condensação de redes perineuronais em volta dos interneurônios inibitórios sinaliza o final do período crítico (BERARDI; PIZZORUSSO; MAFFEI, 2004; DEEPA et al., 2006; LAABS et al., 2005; WANG; FAWCETT, 2012). Por exemplo, no córtex de barris, na área somestésica primária de roedores (Figura 7), as redes perineuronais são expressas em um modo que é dependente de atividade neuronal. Nos animais com privação sensorial unilateral através da deaferentação das vibrissas existe um número menor de neurônios com redes perineuronais no córtex deaferentado (BAHIA et al., 2008). A importância destas redes em processos de memória têm sido demonstrada em estudos na amígdala e no hipocampo (GOGOLLA et al., 2009; WANG; FAWCETT, 2012).

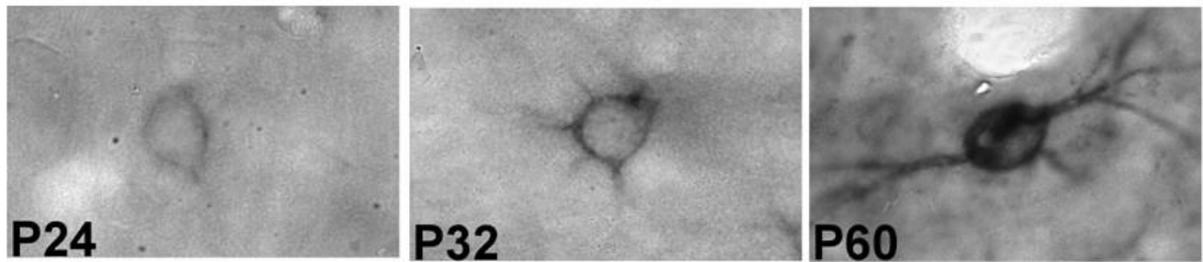


Figura 7: **Neurônios marcados com *Vicia villosa***. Fotomicrografia de neurônios representativos da camada IV do córtex de barris de ratos em diferentes idades (P24, P32 e P60). Adaptado de Bahia e colaboradores (2008).

1.2.3 Período crítico de plasticidade no córtex pré-frontal

Os eventos do período crítico de plasticidade no córtex pré-frontal ocorrem durante uma fase importante do desenvolvimento humano, a adolescência. Este período da vida é caracterizado por ser um estado de transição entre a infância e a idade adulta, marcado por aumento da capacidade física e mental, pela intensa expressão afetiva, por respostas impulsivas e avanços na capacidade cognitiva (CASEY; JONES; HARE, 2008; CREWS; HE; HODGE, 2007; SPEAR, 2000b). Esta fase da vida está associada com o amadurecimento lento das funções executivas (YURGELUN-TODD, 2007) e explica os comportamentos de risco típicos da adolescência, tais como a elevada atividade exploratória, a busca de novidades e o maior tempo despendido em situações sociais (CREWS; HE; HODGE, 2007).

A adolescência pode ser definida como o período entre 10 e 19 anos de idade, em humanos e entre 28 e 42 dias em roedores. É possível encontrar similaridades consideráveis nas características comportamentais, neurais e hormonais de adolescentes humanos e de outras espécies animais. Estas similaridades sugerem o valor adaptativo deste período da vida, uma vez que possibilita o desenvolvimento de habilidades e capacidades importantes para suprir as demandas na idade adulta (BRENHOUSE; ANDERSEN, 2011; CASEY; JONES; HARE, 2008; CREWS; HE; HODGE, 2007; SPEAR, 2000b; WHO, 2012).

Estudos realizados na década de 1970 e 1980 demonstraram que a estrutura do córtex pré-frontal passa por mudanças significativas durante a puberdade e a adolescência. Por exemplo, evidências histológicas em primatas demonstraram que o encéfalo passa por um processo dinâmico de mudanças progressivas e regressivas, comum período de superprodução de sinapses,

principalmente nas camadas infragranulares, no início da adolescência, seguido por um período de refinamento, conferindo uma maior eficiência ao funcionamento neural (BLAKEMORE; CHOUDHURY, 2006; CASEY et al., 2005). Outros estudos demonstraram que durante a adolescência, o volume da substância branca aumenta linearmente com a idade (mielinização), possibilitando uma comunicação mais eficiente entre os circuitos neurais (GIEDD et al., 1999; LENROOT; GIEDD, 2006).

Com relação ao volume de substância cinzenta, estes estudos identificaram que as mudanças não são lineares e são regionalmente específicas. Por exemplo, no lobo frontal, há maior quantidade de substância cinzenta em um período antes da adolescência e um declínio subsequente até atingir níveis adultos, conferindo ao desenvolvimento um padrão em forma de “U” invertido, com picos em diferentes períodos de tempo (CASEY, GALVAN; HARE, 2005; CHUGANI, 1998; GIEDD et al., 1999; LENROOT; GIEDD, 2006).

O processo de amadurecimento da substância cinzenta começa primeiro nas áreas sensoriais e motoras, prosseguindo para os lobos frontal e temporal. O amadurecimento do córtex pré-frontal dorsolateral coincide com o final da adolescência (GOGTAY et al., 2004) e parece ser uma das últimas regiões a amadurecer (LENROOT; GIEDD, 2006), particularmente o córtex pré-frontal dorsolateral (CASEY; GIEDD; THOMAS, 2000) (Figuras 8 e 9).

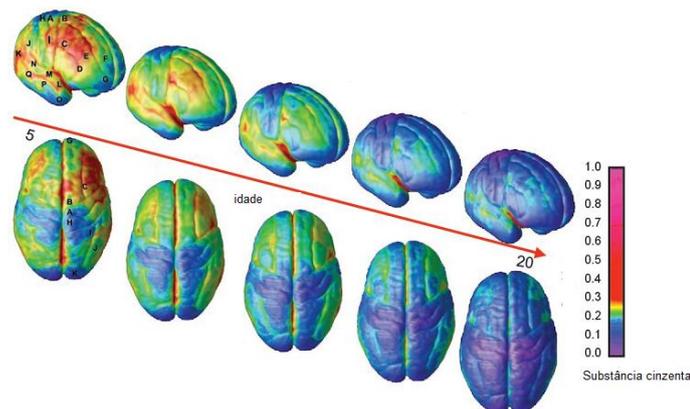


Figura 8: **Refinamento Sináptico.** Perspectiva lateral e superior da maturação da substância cinzenta sobre a superfície cortical. A barra lateral representa as unidades de cores relacionadas a maturação. À medida que as regiões amadurecem, a cor fica mais escura. Adaptado de Gogtay e colaboradores (2004).

O amadurecimento da vias de transmissão GABAérgica no córtex pré-frontal contribui para um refinamento dos circuitos inibitórios, permitindo mais eficiência no processamento da informação, o que se reflete no desenvolvimento dos processos cognitivos relacionados com as funções executivas (BRENHOUSE; ANDERSEN,

2011; CREWS; HE; HODGE, 2007). Por exemplo, estudos em roedores demonstram que animais adolescentes são mais impulsivos, buscam diferentes sensações e apresentam maior atividade locomotora induzida por novidade (SPEAR, 2000b; STURMAN; MOGHADDAN, 2011). Esse padrão comportamental muda com a chegada da vida adulta.

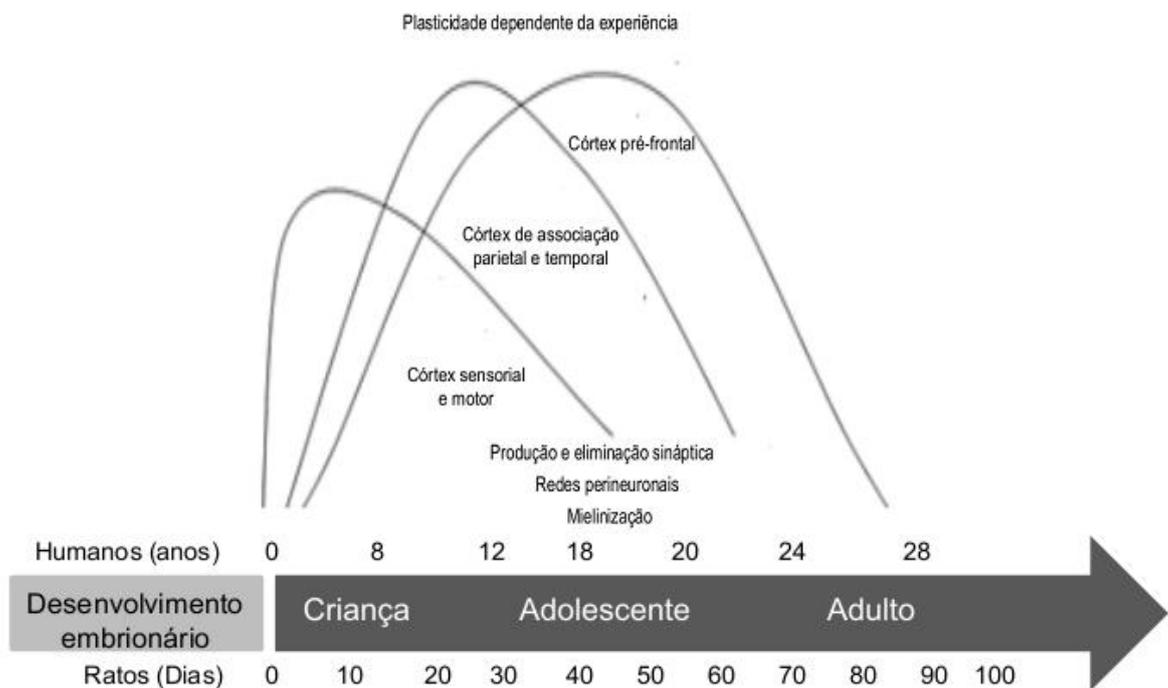


Figura 9: **Curso Temporal de desenvolvimento do sistema nervoso em humanos e ratos.** As regiões corticais apresentam diferentes períodos críticos de plasticidade. Adaptado de Casey e colaboradores (2005).

1.3 EFEITOS DO AMBIENTE SOBRE A PLASTICIDADE DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

A experiência ambiental ao longo do desenvolvimento pós-natal tem um papel importante no refinamento dos circuitos neurais (SALE; BERARDI; MAFFEI, 2009). Já em 1874, Charles Darwin observou que encéfalos de coelhos domesticados eram significativamente reduzidos em comparação a coelhos que viviam em ambientes selvagens e, em consequência, os animais domesticados não possuíam habilidades semelhantes as de animais selvagens (BENNETT et al., 1964; DIAMOND, 2001; KOLB et al., 1998). No entanto, apenas no início da década de 1950 é que surgiu a primeira proposta de mecanismo celular para explicar como a experiência sensorial pode influir na plasticidade sináptica, baseada no trabalho de

Donald Hebb realizado na década de 1940 (FELDMAN, 2009). Posteriormente, Hubel e Wiesel demonstraram a existência do período crítico de plasticidade no sistema visual de mamíferos (WIESEL; HUBEL, 1963a, 1964).

1.3.1 Ambiente Enriquecido

No final da década de 1940, junto com seu postulado acerca da plasticidade dependente da experiência, Hebb (1949) relatou que ratos criados em ambientes complexos, que possibilitavam maior liberdade, maior locomoção e atividade exploratória, bem como maior interação social, apresentaram melhor desempenho em tarefas comportamentais do que ratos mantidos em gaiolas de laboratório (PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

No entanto, foi apenas na década de 1960 que estudos experimentais demonstraram que animais expostos a ambientes com maior complexidade apresentavam modificações comportamentais e na estrutura do encéfalo (DIAMOND, 2001). Desde então, diversos estudos vêm identificando os mecanismos relacionados com os efeitos do ambiente enriquecido sobre o sistema nervoso (SIMPSON; KELLY, 2011).

O ambiente enriquecido criado em laboratório para estudo com roedores (Figura 10) decorre de uma combinação complexa de estímulos sociais e objetos inanimados, que possibilitam interações sociais, comportamentos exploratórios, exposição à novidade e maior atividade física, bem como favorecem uma maior expressão de comportamentos peculiares, quando comparados com o ambiente padrão de alojamento em laboratório, com gaiolas pequenas, contendo serragem, água e ração *ad libitum* e com uma população de reduzida de animais (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2009; SIMPSON; KELLY, 2011).

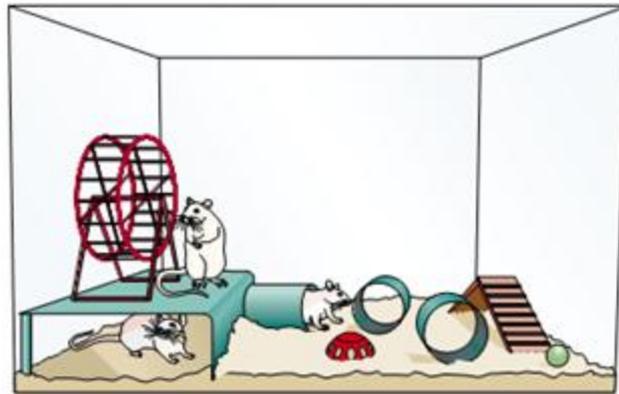


Figura 10: **Diagrama mostrando um ambiente enriquecido para roedores.** Adaptado de Dobrossy e Dunnet (2011).

Estudos recentes demonstram que o ambiente enriquecido aumenta o número de sinapses por neurônios, aumenta a complexidade da ramificação dendrítica de neurônios e causa um aumento significativo no número de espinhas dendríticas em neurônios piramidais nas camadas II/ III e V no córtex cerebral de animais experimentais (GELFO et al., 2009; LEGGIO et al., 2005; MONCEK et al., 2004).

No nível molecular, o ambiente enriquecido aumenta a expressão de fatores neurotróficos importantes para a sobrevivência das sinapses, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, sigla em inglês), bem como alterações na liberação de GABA (CANCEDDA et al., 2004; SALE et al., 2004). A criação de animais em ambientes privados de luz diminuiu a expressão de um precursor do neurotransmissor GABA, que está associado ao aparecimento de redes perineuronais no córtex visual (BARTOLETTI et al., 2004; BERARDI; PIZZORUSO; MAFFEI, 2000; PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

No que diz respeito aos efeitos do ambiente enriquecido sobre a estrutura e função do córtex pré-frontal, alguns estudos tem demonstrado que o enriquecimento ambiental melhora o desempenho de funções executivas, principalmente, em testes de memória espacial e inibição comportamental (HARRIS; D'EATH; HEALY, 2009; LÄCK; GILL; PORRINO, 2010; PIETROPAOLO et al., 2004).

1.3.2 Ambiente Estressor

O estresse é qualquer tipo de ameaça, tanto real ou perceptível, que exige respostas compensatórias para manutenção da homeostase do organismo

(RADLEY; MORRINSON, 2005). A maioria das experiências de estresse que ocorrem no nosso cotidiano são aquelas que operam cronicamente, frequentemente em baixo nível, e culminam com o desenvolvimento de adaptações fisiológicas e comportamentais específicas (MCEWEN, 2006).

As pesquisas iniciais sobre estresse revelaram que os organismos apresentavam um padrão de resposta comum, independente do agente causador. Este padrão de resposta foi denominado por Hans Selye, na década de 1950, como Síndrome de Adaptação Geral (SAG) (SELYE, 1950). A SAG é composta por uma gama de reações adaptativas integradas que se desenvolvem em três estágios: o primeiro é uma reação de alarme, o segundo um estágio de resistência e o terceiro de exaustão (FRANCI, 2005; OTTAVIANI; FRANCESCHI, 1996; SELYE, 1950).

A resposta ao estímulo estressor ocorre através da ativação de dois componentes:

a) um componente rápido, referido como resposta de luta, fuga ou cópula, que envolve a ativação do sistema nervoso autônomo simpático e da medula da glândula adrenal e a liberação de catecolaminas, que mobilizam reservas de energia e aumentam a atividade cardiovascular, redirecionando o fluxo sanguíneo das vísceras para os músculos periféricos, proporcionando condições para que o organismo possa desenvolver meios de eliminar ou suprimir determinado agente estressor e manter a homeostase (DE KLOET, 2004; JOËLS et al., 2007; LUPIEN et al., 2009); e

b) um componente de ação mais lenta, que envolve a ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA, sigla em inglês), composto pelo núcleo paraventricular do hipotálamo, do lobo anterior da glândula pituitária e da glândula adrenal. A via final comum da ativação do eixo HPA é a liberação de glicocorticóides pelo córtex da glândula adrenal. Os glicocorticóides liberados na circulação ativam circuitos de retroalimentação negativa que regula a atividade do eixo HPA (DE KLOET, 2004; JOËLS et al., 2007; LUPIEN et al., 2009).

A ativação do eixo HPA (Figura 11) inicia com a liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF, em inglês), o regulador principal do eixo HPA, produzido pelos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN, em inglês), em resposta a estressores. O CRF é liberado nos vasos do sistema porta hipofisário e, no lobo anterior da pituitária, ativa a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, em inglês) na circulação sistêmica. No córtex da medula

adrenal, o ACTH estimula a secreção de corticosteróides (DE KLOET; JOËLS; HOSLBOER, 2005; LUPIEN et al., 2009).

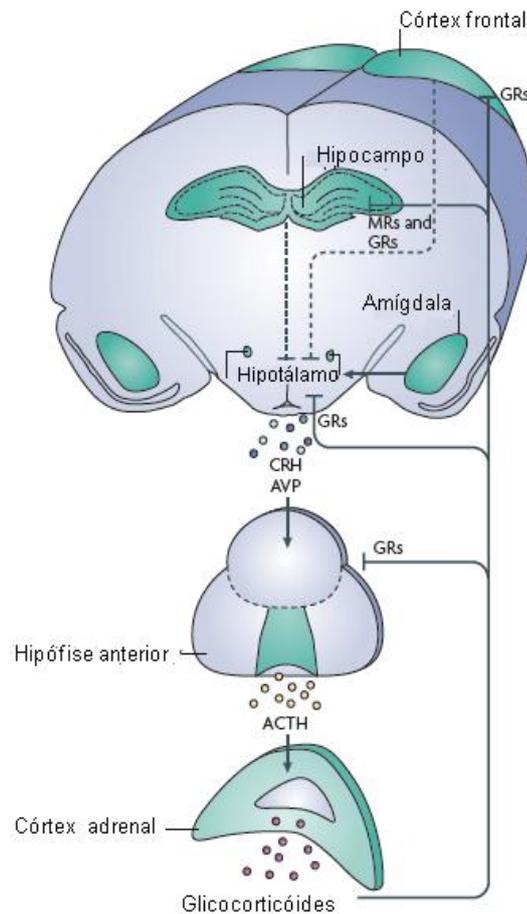


Figura 11: **Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) ativado em resposta ao estresse.** Adaptado de Lupien e colaboradores (2009).

Os corticosteróides são os efetores de modificações fisiológicas e comportamentais adaptativas de enfrentamento, recuperação e adaptação do organismo aos estímulos estressores, através da sua ligação a receptores de membrana em várias células do organismo (GR) (DE KLOET; JOËLS; HOSLBOER, 2005; MCEWEN, 2012). Estes receptores, quando ativados, podem afetar a transcrição e a expressão de genes responsáveis pelos mecanismos de respostas ao estresse (JOËLS et al., 2007; LUPIEN et al., 2009).

Um processo eficiente de resposta ao estresse implica que uma via de resposta é ativada rapidamente quando é necessária e eficientemente desativada, por um mecanismo de retroalimentação negativa, logo após a cessação do estímulo. Os mecanismos que suportam a resposta ao estresse, ou seja, mantêm a homeostase através de modificações internas e externas são denominados de

alostáticos (DE KLOET; JOËLS; HOSLBOER, 2005; MCEWEN, 2004; POPOLI et al., 2012).

Quando mediadores alostáticos, como os corticoesteróides e as catecolaminas, são liberados em decorrência de eventos estressores, eles promovem respostas adaptativas e são geralmente benéficos. No entanto, quando estes mediadores estão presentes em quantidades significativas na circulação sistêmica por períodos prolongados, ocorrem mudanças cumulativas que conduzem a alterações prejudiciais, chamadas de carga ou sobrecarga alostática, sobre o corpo e o encéfalo (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; MCEWEN, 2004).

Se o sistema de controle por retroalimentação negativa é insuficiente, a resposta ao estresse fica modificada. Concentrações muito elevadas ou muito baixas destes hormônios são prejudiciais ao organismo. Por exemplo, os níveis sistêmicos de cortisol parecem estar reduzidos em pacientes com transtorno de estresse pós-traumático. Isto sugere que tais pacientes podem ter uma diminuição na retroalimentação negativa do eixo HPA e uma sensibilidade aumentada em resposta a estressores, ao passo que na depressão a resposta do eixo HPA é geralmente atenuada (RADLEY; MORRISON, 2005).

Alguns estudos têm demonstrado que os efeitos do estresse durante o desenvolvimento do sistema nervoso, principalmente durante a infância e adolescência, podem ser mais danosos, por causa da susceptibilidade plástica do cérebro aos estímulos ambientais durante os períodos críticos de plasticidade de vários sistemas, mas principalmente do córtex pré-frontal, cujo período crítico de plasticidade é relativamente prolongado e dura até o início da fase adulta (LUPIEN et al., 2009; MUHAMMAD; CARROL; KOLB, 2012).

A experiência estressante pode afetar o cérebro através de um processo neurotóxico, retardar o amadurecimento de algumas regiões (LUPIEN et al., 2009). Algumas pesquisas indicam que o estresse crônico pode comprometer o desempenho de funções executivas, incluindo memória operacional (HANSON et al., 2012; MIZOGUCHI et al., 2000), atenção seletiva (LISTON et al., 2006) e flexibilidade comportamental (CERQUEIRA et al., 2007). Outra consequência da exposição ao estresse é o aumento dos níveis de ansiedade do animal (BONDI et al., 2008; CHIBA et al., 2012; HOLMES; WELLMAN, 2009; MILLER; MORRISON; MCEWEN, 2012).

Os protocolos experimentais para estudo dos efeitos do estresse geralmente envolvem submeter o animal a um ou mais estímulos estressores durante uma determinada quantidade de vezes ao dia, por um certo período de tempo, que pode variar de um dia a várias semanas (DE KLOET; JOËLS; HOSLBOER, 2005). O encéfalo organiza adaptações comportamentais que dependem da natureza do estímulo e diversos fatores determinam o seu impacto, tais como: o tipo do estresse (físico ou psicológico) e a duração do estressor (agudo ou crônico), o estágio de desenvolvimento do animal (recém-nascido, adolescente, adulto ou idoso), o gênero e a herança genética do animal, entre outros (LEUNER; SHORS, 2012; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O córtex pré-frontal é rico em receptores de glicocorticóides, localizados principalmente nas camadas II, III e V1 (AHIMA; HARLAN, 1990). Esses receptores conferem ao córtex pré-frontal a capacidade de regular o eixo HPA através da alça de retroalimentação negativa descrita acima, mas também pode lhe conferir uma maior susceptibilidade ao estresse crônico (LEUNER; SHORS, 2012). O estresse crônico induz uma série de alterações em comportamentos dependentes do córtex pré-frontal, como o controle das funções executivas (CERQUEIRA et al., 2005; CERQUEIRA et al., 2007; HOLMES; WELLMAN, 2009). O estresse crônico causa a retração de dendritos e diminuição do número de espinhas dendríticas no córtex pré-frontal medial (LISTON et al., 2006; RADLEY et al., 2006), ocasionando a diminuição na densidade de sinapses em uma região crítica para a função cognitiva. Por outro lado, o estresse crônico induz um aumento substancial da arborização dendrítica após três semanas de estresse de contenção física (LISTON et al., 2006; JOËLS et al., 2007). Isto sugere a possibilidade de que funções comportamentais mediadas pelos córtices pré-frontal medial e órbito-frontal podem ser sensíveis de forma diferente ao estresse (HOLMES; WELLMAN, 2009).

1.4 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

O córtex pré-frontal é a região cortical responsável pelo controle de funções executivas (GILBERT; BURGUESS, 2008). O período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal coincide com o período da adolescência, tanto em humanos, primatas não-humanos e também em roedores (SPEAR, 2000).

Diversos estudos já foram realizados com o intuito de esclarecer os mecanismos responsáveis pelo estabelecimento e regulação dos períodos críticos de plasticidade. No entanto, apesar do fato de que o córtex pré-frontal pode estar envolvido em várias disfunções relacionadas com o estresse e cujos sintomas surgem durante a adolescência, estudos investigando os efeitos da exposição crônica ao estresse sobre o período crítico de plasticidade no córtex pré-frontal são escassos (HANSON et al, 2012).

Nossa hipótese é de que a exposição crônica ao estresse durante a adolescência influencia o amadurecimento das redes perineuronais no córtex pré-frontal medial. O amadurecimento das redes perineuronais indica o fechamento do período crítico de plasticidade e o estabelecimento do padrão adulto de susceptibilidade cortical para influência plástica ambiental. Essas modificações estruturais devem se refletir no desempenho do animal em testes de função executiva, como capacidade de memória operacional e inibição comportamental, que amadurecem durante este período crítico.

A compreensão destas informações é importante para favorecer o desenvolvimento de abordagens terapêuticas capazes de minimizar os efeitos dos insultos ambientais que ocorrem durante o período crítico de plasticidade.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da exposição ao ambiente no desenvolvimento do córtex pré-frontal de ratos durante o período crítico de plasticidade.

1.5.2 Objetivos Específicos

1. Verificar a distribuição espacial e temporal da rede perineuronal formada por PGSC no córtex pré-frontal de ratos durante a adolescência.
2. Avaliar o efeito da exposição ao ambiente estressor crônico sobre a distribuição espacial e temporal das redes perineuronais durante o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal de ratos.

3. Avaliar o efeito da exposição ao ambiente enriquecido sobre a distribuição espacial e temporal das redes perineuronais durante o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal de ratos.
4. Avaliar o efeito da exposição ao ambiente estressor crônico no desenvolvimento das funções executivas de memória operacional e inibição comportamental em ratos adolescentes.
5. Avaliar o efeito da exposição ao ambiente enriquecido no desenvolvimento das funções executivas de memória operacional e inibição comportamental em ratos adolescentes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 O MODELO EXPERIMENTAL

Utilizamos como modelo experimental 72 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar*, com idade entre 28 e 63 dias de vida pós-natal (P28 e P63, respectivamente), oriundos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro invertido de 12:12 horas, com início da fase clara às 22:00 horas. Os animais obtiveram acesso à água e ração *ad libitum*. O uso e os cuidados na manipulação dos animais seguiram as normas estabelecidas pela Society for Neuroscience (Handbook for Use of Animals in Neuroscience Research. Washington, D.C.: SFN, 1991. <http://www.sfn.org>) e todos os procedimentos aqui utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (Parecer BIO069-12, em anexo).

Nesta pesquisa, optamos por utilizar roedores (ratos) como modelo experimental em virtude de apresentarem maior facilidade de acesso e manuseio, criação, controle e reprodução dos animais. Como mencionado anteriormente, ratos apresentam córtex pré-frontal delimitado em sub-regiões distintas e homologas ao córtex pré-frontal de primatas (CERQUEIRA *et al*, 2007; ONGUR; PRICE, 2000). Além disso, diversas evidências demonstram efeitos do estresse crônico sobre indicadores morfológicos, fisiológicos e comportamentais do córtex pré-frontal de roedores (ANDERSEN; TEICHER, 2008).

2.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em três grupos, de acordo com o ambiente a que foram expostos: Ambiente Padrão (n=24), Ambiente Estressor (n= 24) e Ambiente Enriquecido (n=24). Cada grupo foi dividido, então, em três sub-grupos, considerando o tempo de exposição ao ambiente, de 7 (n=8), 15 (n=8) ou 35 (n=8) dias de exposição, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Desenho Experimental

		Ambiente		
		Padrão	Estressor	Enriquecido
Tempo de Exposição	7 dias	n=8	n=8	n=8
	15 dias	n=8	n=8	n=8
	35 dias	n=8	n=8	n=8
Total de animais		72		

Nota: Os animais, a partir de P28, foram alojados nos respectivos ambientes (padrão, estressor e enriquecido) e subdivididos em grupos de 08 animais, de acordo com o tempo de exposição: 7, 15 ou 35 dias.

A partir de P28, os grupos de animais foram alojados nos respectivos ambientes experimentais, de acordo com o período de exposição pretendido. Os testes comportamentais foram realizados no último dia de exposição ao ambiente. Em seguida, coletamos amostras sanguíneas para dosagem do hormônio corticosterona. Logo em seguida, os animais foram perfundidos com fixadores através do ventrículo esquerdo para processamento histológico do cérebro.

2.3 AMBIENTAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais do grupo padrão foram alojados em gaiolas de plástico padrão de biotério de roedores (C= 0,40 m; L= 0,30 m; P= 0,20 m), com uma densidade populacional de 4 animais por gaiola, com provisão de água e ração *ad libitum*.

Os animais do grupo enriquecido (Figura 12) foram alojados em caixas (C= 0,80 m x L= 0,50 m x P= 0,30 m) com 8 animais, que possuíam uma variedade de objetos com diferentes formas, texturas e tamanhos, tais como: brinquedos, túneis, escadas, rodas, arames, pequenos labirintos, etc. Os objetos ficaram dispostos em dois andares no aparato, de forma a ampliar o espaço para locomoção e exploração. A cada três dias os objetos foram trocados e/ ou modificados de lugar para estimular a exploração dos animais (GELFO et al., 2009; PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2009).



Figura 12: Fotografia do alojamento com **ambiente enriquecido**

Os animais do grupo estressor foram alojados em gaiolas de plástico ($C=0,40\text{ m} \times L=0,30\text{ m} \times P=0,20\text{ m}$) com uma densidade de 2 a 3 animais por gaiola. Além disso, os ratos foram expostos a um paradigma de estresse crônico, caracterizado pela variabilidade e imprevisibilidade do agente estressor. Este paradigma experimental tenta mimetizar a variedade e aleatoriedade de estímulos estressores que acometem o organismo no cotidiano (DUCCOTET; GRIEBEL; BELZUNG, 2003). Os animais foram expostos, uma vez ao dia, a estímulo estressor escolhido aleatoriamente entre as seguintes opções: imobilização em um tubo plástico ($D=0,04\text{ m}$) por 2h/dia sem acesso a água e alimento; nado forçado por 30 minutos em água à temperatura de 32°C ; inversão do ciclo claro/escuro; alojamento com superlotação populacional com 08 animais por gaiola durante 24 horas; pinçamento da cauda por 10 minutos; exposição ao ar quente por 10 minutos. Todos estes procedimentos estressores já foram utilizados em relatos disponíveis na literatura (BONDI et al., 2008; DIAS-FERREIRA et al., 2009; DUCCOTET; GRIEBEL; BELZUNG, 2003; MINEUR; BELZUNG; CRUSIO, 2006; SHANSKY; MORRISON, 2009; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

2.3.1 Monitoramento dos efeitos do ambiente sobre o peso corporal

A massa corporal dos animais foi monitorada regularmente durante a realização dos procedimentos experimentais, uma vez que a literatura têm

demonstrado efeitos importantes do estresse sobre a massa corporal. Realizamos também a dosagem sanguínea (1 ml por animal) do hormônio corticoesterona, recolhida imediatamente antes da perfusão dos animais (BLOSS et al., 2010; GOLDWATER et al., 2009).

2.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Para análise das funções executivas, realizamos uma única sessão de testes comportamentais, no último dia de exposição ao ambiente, para avaliação da inibição comportamental e do desempenho da memória operacional.

2.4.1 Inibição comportamental

2.4.1.1 Tigmotaxia

Quando os roedores são colocados em um campo aberto, apresentam uma tendência de explorar as zonas periféricas do campo. Esta tendência de permanecer próximo às paredes, chamada de tigmotatismo, diminui gradualmente nos primeiros minutos de exploração. O tigmotatismo é correlacionado com o grau de ansiedade do animal, de maneira que quanto maior for o tempo de permanência próximo às paredes, maior o índice de ansiedade (TREIT; FUNDYTUS, 1988; SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994).

2.4.1.1.1 Aparato Experimental e Procedimento

O teste comportamental foi realizado em um aparato de madeira (C= 0,60 m x L= 0,60m x P= 0,35m (Figura 13), com a zona de tigmotaxia demarcada com linhas retas distantes 5cm das paredes do aparato. Três dias antes do experimento, os animais foram manuseados (5 minutos/ dia) para habituá-los ao contato com o experimentador. Para habituação no dia do teste, os animais foram colocados 30 minutos antes na sala de experimento comportamental. Ao final do teste de cada animal, o aparato foi limpo com papel toalha umedecido com álcool 70% e secado.

Durante o experimento os ratos foram gentilmente colocados no centro do aparato de teste (um de cada vez) e o comportamento do animal foi gravado em vídeo por cinco minutos. O registro do comportamento foi analisado por um analisador

que não sabia à qual grupo experimental o animal pertencia. O índice de tigmotaxia é baseado na porcentagem de tempo no qual o rato permaneceu dentro da zona de tigmotaxia. A entrada da cauda, ou do focinho, do rato neste espaço não foi pontuada se a maior parte do corpo do animal estivesse fora da área de delimitação de tigmotaxia (ver TREIT; FUNDYTUS, 1988; SIMON; DUPUIS; COSTENTIN, 1994).

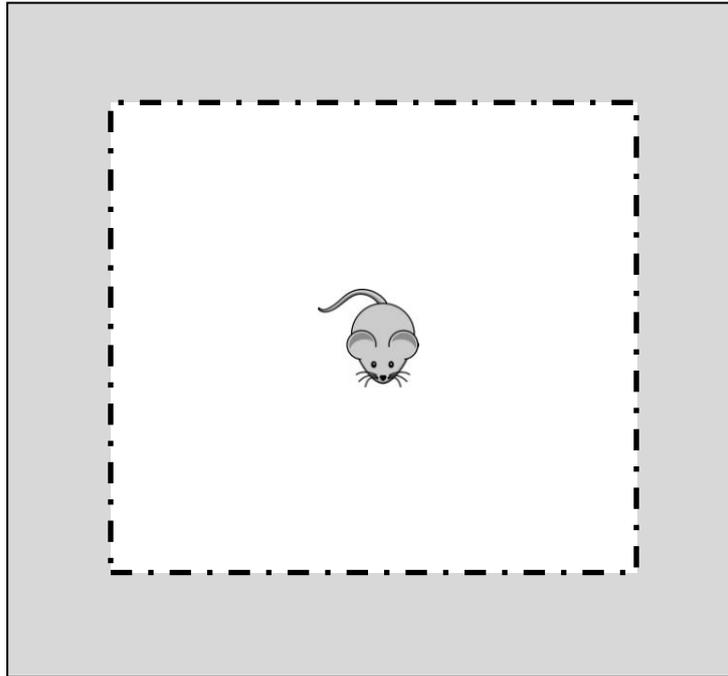


Figura 13: **Diagrama do aparato experimental utilizado para avaliar tigmotaxia** (C= 0,60 m x L= 0,60m x P= 0,35m; zona de tigmotaxia = 0,05m)

2.4.2 Memória operacional

2.4.2.1 Teste de Alternância Espontânea

Embora existam diversos testes experimentais para avaliar a memória operacional em roedores, optamos por utilizar um teste que não demandasse tempo de treinamento e habituação do animal e que permitisse avaliar a memória operacional (espacial) em apenas uma única sessão. O teste escolhido foi o de alternância espontânea.

Quando colocados em labirintos com braços os roedores apresentam uma tendência em alternar os braços escolhidos em tentativas consecutivas. O teste de alternância espontânea mede a capacidade de memória operacional espacial (LALONDE, 2002).

2.4.2.1.1 Aparato e Procedimento

O teste foi realizado em um aparato com estrutura em madeira, possuindo quatro braços fechados (C= 0,47m X L= 0,16m X P= 0,34m), cruzados em cobertura, com um espaço central (plataforma central – 0,16m X 0,16m; Figura 14). O labirinto foi posicionado com uma elevação de 0,50m do solo. Os ratos foram colocados individualmente e gentilmente no centro do aparato de teste e deixados para explorar livremente o espaço por dez (10) minutos. Durante este tempo os animais alternaram espontaneamente entre os quatro braços, utilizando informações sensoriais dos braços previamente visitados e pistas ambientais externas ao labirinto. Ao final do teste de cada animal, o aparato foi limpo com papel toalha, umedecido com álcool 70% e secado. O comportamento de cada animal foi filmado para análise posterior. O analisador não tinha informação quanto ao grupo em que o animal em análise pertencia.

Durante a análise dos registros em vídeo os braços do labirinto foram identificados por letras do alfabeto. A seqüência de entradas nos braços (p.ex, ABCDBACB) foi registrada manualmente durante a análise do teste. O desempenho do animal foi quantificado pela porcentagem de alternâncias (total de alternâncias/máximo de alternâncias possíveis x 100). O número máximo de alternâncias possíveis é calculado a partir do total de entradas nos braços menos três (número total de entradas realizadas pelo animal durante o teste). Foi considerada alternância quando o animal, em uma seqüência de quatro tentativas de entradas nos braços, não retornou a nenhum braço anteriormente visitado (Exemplo: ABCD, BCDA, CBDA; Não é alternância: BCDD, CCAB, AADB). Pontuamos uma entrada do animal no braço do labirinto quando todas as suas quatro patas estavam dentro do braço. Também calculamos o total de entradas nos braços do labirinto.

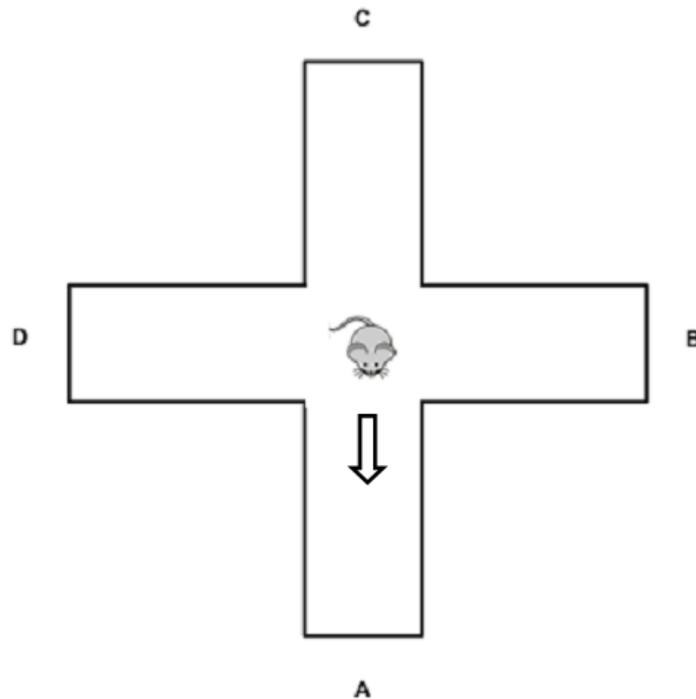


Figura 14: **Diagrama representando o aparato utilizado para o Teste de Alternância Espontânea.** Num labirinto em cruz, é registrada a sequência de entradas nos braços. Considera-se alternância espontânea quando o animal entra em quatro braços distintos numa sequência de quatro tentativas. (Ex: ABCD ou ACDB).

2.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

2.5.1 Perfusão e preparação dos cortes histológicos

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uma dose letal de cloridrato de cetamina (Vetanarcol, Konig, 72 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilazina (Kenzol, Konig, 9 mg/kg, i.p.). Uma vez abolidos os reflexos corneano e de retirada da pata para estímulo doloroso, os animais foram perfundidos com 350 ml de solução salina a 0,9% com heparina (0,20 ml) e 350 ml de paraformaldeído a 4%. Após a perfusão, os encéfalos foram retirados, pós-fixados e crioprotégidos durante 24 horas.

O córtex pré-frontal foi dissecado e um bloco de tecido foi removido entre as coordenadas estereotáxicas (AP) +4,70mm e +3,20mm (PAXINOS; WATSON, 1998) e congelado com *Tissue-Tek* (Sakura). Em seguida, o bloco foi seccionado no plano coronal em fatias de 20µm ou 50µm comum criostato (Microm HM-505-E). As lâminas histológicas foram montadas com três secções cada e armazenadas sob temperatura de -20 °C até o processamento histológico.

2.5.2 Procedimento histoquímico

As secções de 50 µm foram coradas com violeta de cresila para visualização da citoarquitura cortical. Já as secções de 20 µm foram submetidas à histoquímica para a visualização das redes perineuronais.

A marcação das redes perineuronais foi realizada com a lecitina *Vicia villosa*. A *Vicia villosa* conjugada com biotina é utilizada para marcar as redes perineuronais pela sua ligação com terminais *N*-acetil-*D*-galactosamina do sulfato de condroitina (CELIO et al., 1998).

Primeiramente, as lâminas histológicas com as secções foram lavadas duas vezes em tampão fosfato (PB) 0,1M com 6% de Triton X-100 (SIGMA) (solução PBT) durante 30 minutos. Em seguida, foram incubadas em solução contendo 0,95% de *Vicia villosa* biotinilada (SIGMA), 6% de Triton X-100 (SIGMA), diluídos em tampão fosfato salina, durante dezesseis horas ininterruptas, em temperatura ambiente (23°C). Posteriormente, os cortes foram lavados duas vezes em PB 0,1M e PBT3%, nesta ordem, durante vinte minutos cada. Em seguida, foram incubadas por 8 horas ininterruptas numa solução contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (complexo ABC, VECTOR) e Triton X-100 (Sigma) a 3% diluídos em PB 0,1 M. Após lavagem em PB 0,1M por 20 minutos, a peroxidase foi revelada utilizando-se o método da glicose oxidase-diaminobenzidina-níquel (GND), proposto por Shu, Ju e Fan (1988) e adaptado por Bahia *et al.* (2008) para a histoquímica da *Vicia villosa*.

2.5.3 Lavagem, Desidratação e Montagem das Lâminas

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, secadas em temperatura ambiente e desidratadas em bateria de álcool com concentração de 70%, 80%, 90%, 100% e a 100%, e clareadas em xileno.

Em seguida, as secções foram cobertas com lamínula com o auxílio de um meio de inclusão (Entellan, MERK).

2.5.4 Método de contagem de células

As secções marcadas pela histoquímica da *Vicia villosa* foram inspecionadas no microscópio óptico (ECLIPSE 50i, Nikon) e as imagens foram capturadas com câmara digital (5 MPixels – 5500 – Moticam) acoplada ao microscópio.

As células *Vicia villosa* positivas (células Vv⁺) foram quantificadas nas áreas correspondentes ao córtex pré-frontal medial (córtex cingular anterior, pré-límbico e infra-límbico) e córtex pré-frontal ventral (córtex órbito-ventral), utilizando objetiva de 40X e gradícula de 0,0625 mm² acoplada à ocular do microscópio. Para as contagens, utilizamos três secções por animal e 3 campos por secção, todos no córtex pré-frontal medial. As contagens foram realizadas em três animais de cada grupo experimental.

2.6 ANÁLISE SOROLÓGICA PARA O HORMÔNIO CORTICOSTERONA

Antes da perfusão do animal, realizamos punção cardíaca para coleta de 1mL de sangue venoso. O material foi aquecido à temperatura de 37 °C para coagulação sanguínea. Posteriormente, o sangue foi centrifugado (2.300 RPM) por 7 minutos. O soro foi separado e acondicionado para análise da concentração do hormônio corticosterona. A dosagem sorológica é frequentemente utilizada na literatura como indicador dos efeitos fisiológicos do estresse crônico (CHIBA et al., 2012; DIAS-FERREIRA et al., 2009; COOK; WELLMAN, 2004; GOLDWATER et al., 2009; LISTON et al., 2006; PEREZ-CRUZ et al., 2007; SHANSKY et al., 2009).

Estocamos as amostras em uma temperatura de -30°C até a realização do procedimento de dosagem dos níveis de corticosterona. Obtivemos as concentrações plasmáticas de corticosterona presentes nas amostras com auxílio do kit de ensaio imunoenzimático (EIA) (Oxford Biomedical Research).

A preparação do material seguiu as seguintes etapas: primeiramente pipetamos 100 µL do plasma dentro de um tubo de vidro e adicionamos 1 mL de éter etílico. Colocamos o conteúdo em vórtex por 30 segundos para separar as fases, sendo o sobrenadante colocado em outro tubo para evaporação do solvente em fluxo de ar. Dissolvemos o resíduo em 100 µL do tampão e agitamos por 5 segundos. Uma amostra de 10 µL foi diluída em 990 µL do tampão para os ensaios enzimáticos.

Para o ensaio imunoenzimático adicionamos 50 µL dos padrões e amostras nos poços correspondentes da microplaca em duplicatas, onde adicionamos em cada poço da placa 50 µL da enzima conjugada à corticosterona. Colocamos a placa em um agitador por 5 minutos e depois incubamos por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período, lavamos a placa para retirar componentes não-

ligados. Adicionamos 150 μL do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço para um período de mais 30 minutos de incubação. Com o término desse período, adicionamos 50 μL de ácido sulfúrico (1M) em cada poço da placa para interromper a reação colorimétrica. Para obtenção dos valores de absorbância realizamos leitura espectrofotométrica com filtro 450 nm.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

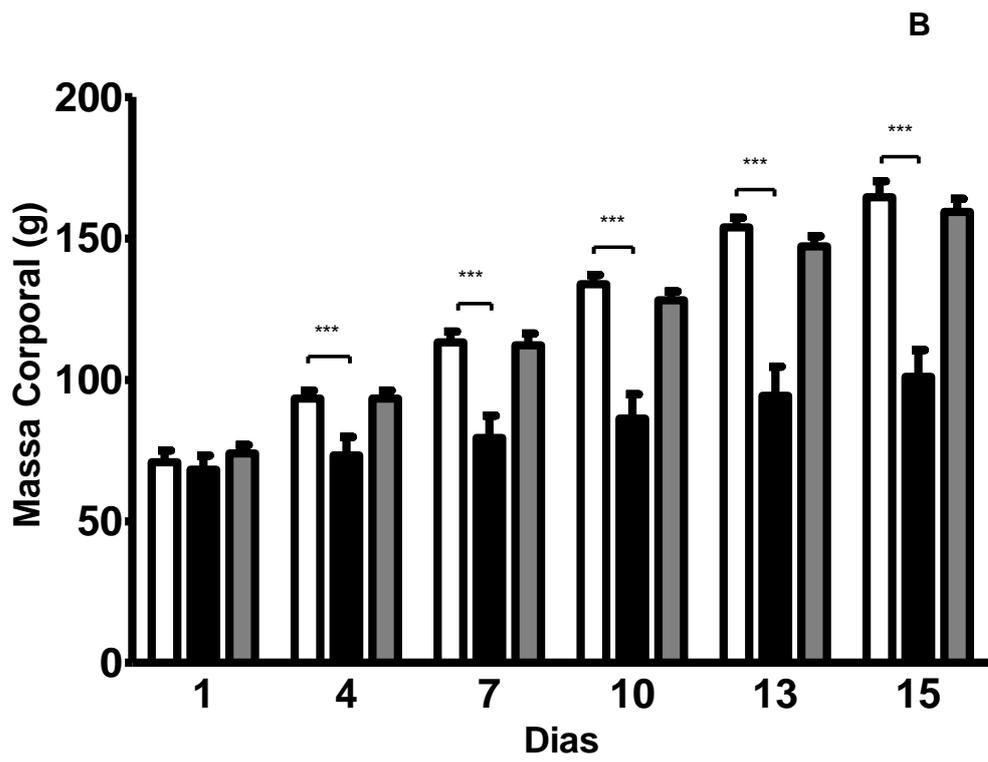
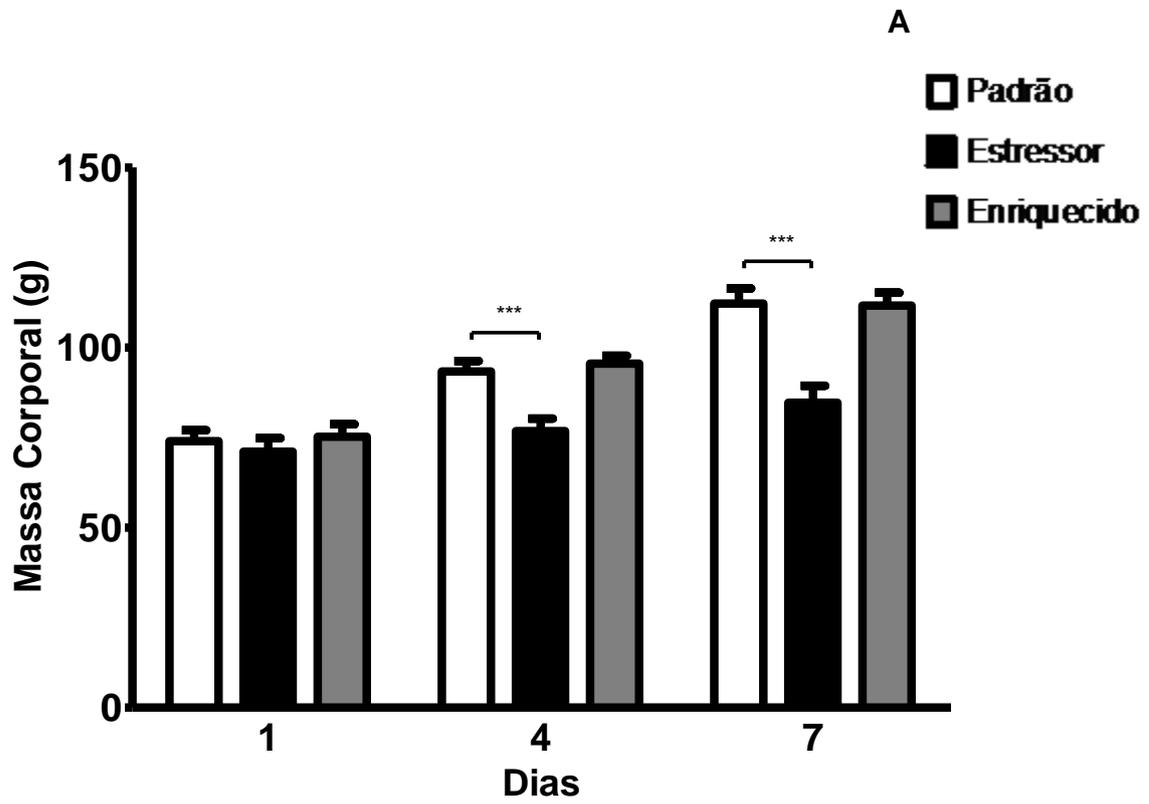
Para análise estatística dos dados obtidos nos experimentos, realizamos ANOVA com dois critérios e teste *post-hoc* de Bonferroni para averiguar a interação entre os dois fatores (ambiente e tempo de exposição). Estabelecemos a significância estatística em 0,05.

3 RESULTADOS

As amostras apresentaram distribuição normal, indicada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, permitindo a utilização de testes estatísticos paramétricos.

3.1 MASSA CORPORAL

A massa corporal dos animais foi registrada à cada três dias para observar os efeitos gerais do estresse sobre o organismo. A diminuição da massa corporal em decorrência do estímulo estressor é uma medida amplamente utilizada na literatura (BONDI et al., 2008). Nossos resultados demonstraram efeitos da interação entre ambiente e tempo de exposição sobre a massa corporal dos animais. Nos grupos com tempo de exposição de 7 dias foi encontrado um efeito principal do tempo de exposição ($F_{2,63}=413.5$, $p<0,001$), do ambiente ($F_{2,63}=167.0$, $p<0,001$) e da interação entre estes fatores ($F_{4,63}=30,59$, $p<0,001$). Em comparação com o grupo padrão ($112,21 \pm 4,18$), os animais expostos ao ambiente enriquecido ($111,63 \pm 3,56$, $p>0,05$) não apresentaram diferenças significativas na massa corporal. No entanto, o ambiente estressor ($84,66 \pm 4,72$, $p<0,05$) resultou em uma diminuição significativa da massa corporal, conforme podemos observar na Figura 15. Estes efeitos também foram encontrados nos outros tempos de exposição. Com 15 dias de exposição, a análise estatística demonstrou efeito principal do tempo de exposição ($F_{5, 126}= 547.3$, $p < 0,0001$), do ambiente ($F_{2, 126} = 674.3$, $p < 0,0001$) e da interação entre estes fatores ($F_{10,126}=$, $p < 0,001$). Apenas os animais do grupo estressor ($101,06 \pm 9,47$, $p < 0,001$) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo padrão ($164,59 \pm 5,66$) na massa corporal. No período de exposição de 35 dias, observamos padrão semelhante, com efeito principal do tempo de exposição ($F_{11,252}= 664.5$, $p < 0,0001$), do ambiente ($F_{2,252} = 1112$, $p < 0,0001$) e da interação ($F_{22,252} = 64,92$ $p < 0,0001$) (Figura 15). Animais do grupo estressor ($145,32 \pm 14,06$, $p < 0,001$) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo padrão ($285,52 \pm 13,03$).



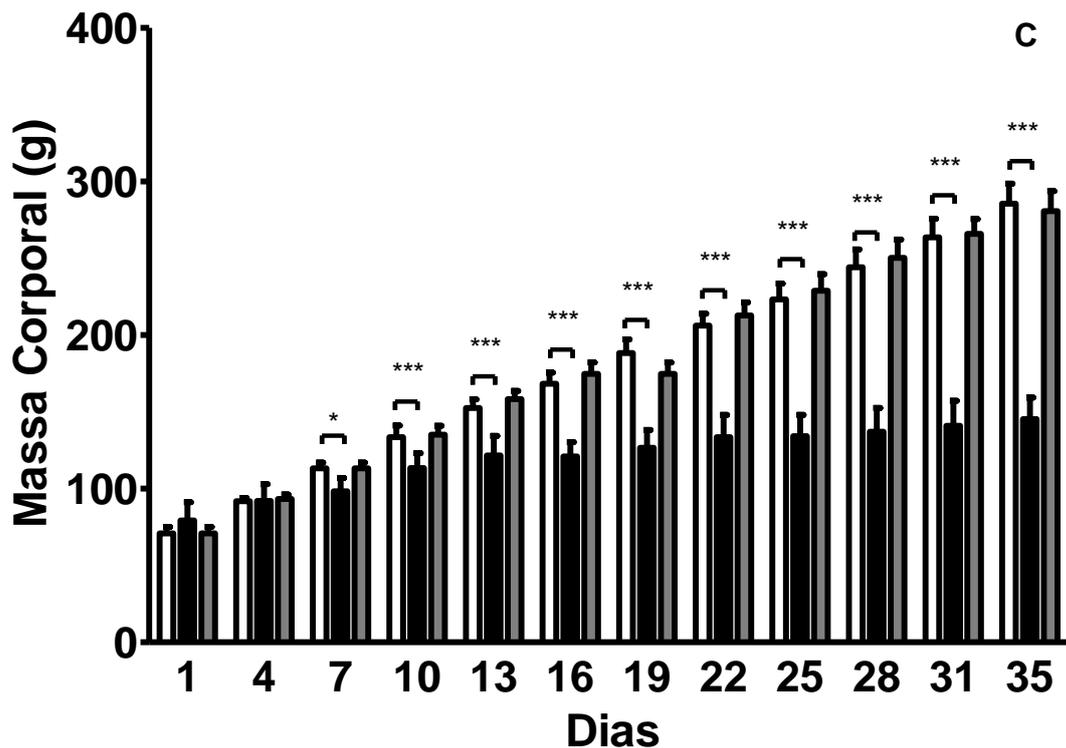


Figura 15: **Evolução da massa corporal dos animais nos diferentes ambientes.** Nos grupos com 7 (A), 15 (B) e 35 (C) dias de exposição utilizado como um indicador do efeito da interação entre ambiente e tempo de exposição. A massa corporal foi medida à cada três dias. Animais expostos ao ambiente estressor apresentaram menor ganho de massa corporal e menor massa total ao final de cada período de experimento em relação ao grupo padrão. Os valores são expressos em média e desvio padrão. (* $p < 0,05$), ANOVA com dois fatores e pós-teste de Bonferroni.

Os dados acima ilustraram que os animais expostos ao ambiente estressor apresentaram menor ganho de massa e menor massa ao final dos dias de exposição em relação ao grupo padrão. Os animais expostos ao enriquecimento ambiental não apresentaram diferença significativa em relação aos animais mantidos em ambiente padrão.

3.2 CORTICOESTERONA

Medimos os níveis sanguíneos de corticoesterona presentes no último dia de experimento, após a realização do teste comportamental e imediatamente antes da perfusão do animal, conforme descrito em estudos anteriores (CHIBA et al., 2012; COOK; WELLMAN, 2004; DIAS-FERREIRA et al., 2009;).

A análise estatística demonstrou que não houve efeito da interação entre ambiente e tempo de exposição ($F_{4,30} = 1.217$, $p = 0,3241$), assim como, também não houve efeito principal do tempo de exposição ($F_{2,30} = 0.5908$, $p = 0.9427$). No entanto,

ocorreu um efeito principal do ambiente ($F_{2, 30} = 18.33$, $p < 0,0001$) no grupo estressor com 15 dias de exposição ($0,43 \pm 0,11$, $p < 0,05$) em relação ao grupo padrão ($5,45 \pm 3,38$) e no grupo enriquecido ($7,60 \pm 4,11$, $p < 0,05$) em relação ao grupo padrão ($2,58 \pm 2,2$) com 35 dias de exposição (Figura 16).

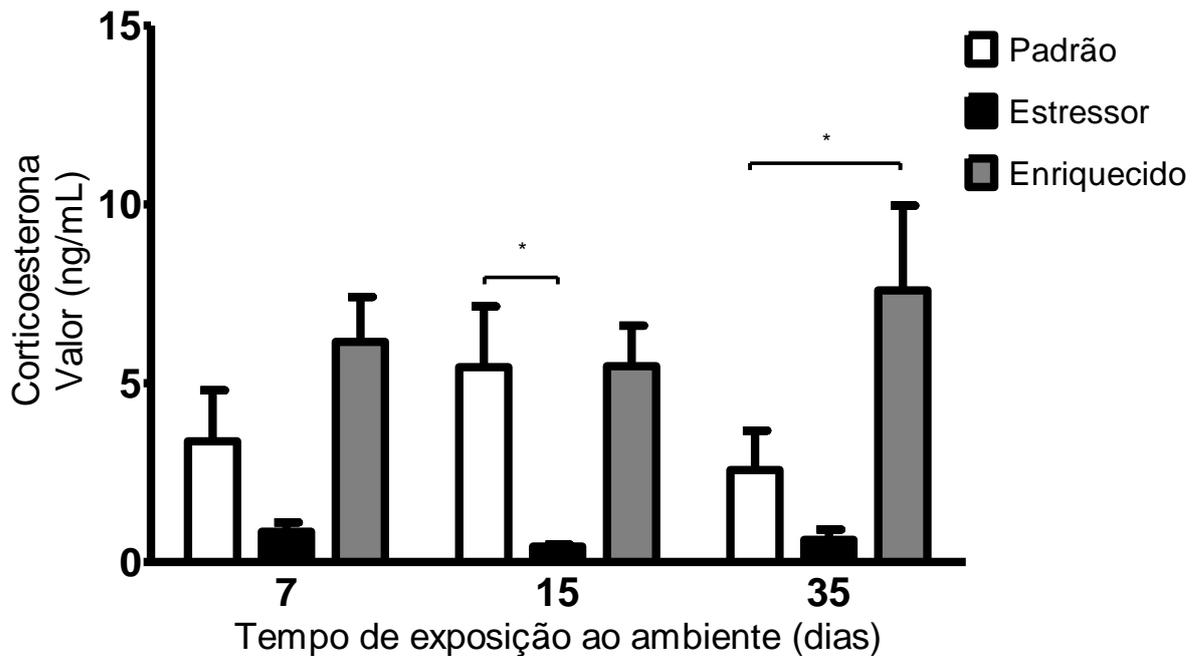


Figura 16: **Valores de dosagem de corticoesterona no soro sanguíneo.** O coeficiente de variação intra ensaio foi de 8% e inter ensaio de 4,5%. Análise estatística demonstrou que ocorreu um efeito principal do ambiente ($F_{2, 30} = 18.33$, $p < 0,0001$). Os valores são expressos em média e erro padrão da média. (* $p < 0,0001$), ANOVA com dois fatores e pós-teste de Bonferroni.

A dosagem de corticoesterona mostrou que animais criados em ambiente enriquecido apresentaram perfil semelhante ao grupo padrão, exceto no grupo com 35 dias de exposição. O ambiente estressor apresentou médias significativamente menores no nível de corticoesterona nos três períodos de exposição.

3.3 A DISTRIBUIÇÃO ESPAÇOTEMPORAL DA REDE PERINEURONAL

A análise da distribuição espacial de temporal da marcação das redes perineuronais foi obtida através da quantificação de células *Vicia villosa* positivas (células Vv^+). Quantificamos estas células nas áreas correspondentes ao córtex pré-frontal medial (córtex cingulado anterior, córtex pré-límbico e infra-límbico) e córtex pré-frontal ventral (córtex orbital ventral), semelhante a outros estudos (MYCHASIUK; GIBB; KOLB, 2012). Os resultados confirmaram nossa hipótese de

que o ambiente tem um efeito determinante no número de células com redes perineuronais maduras durante o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal de ratos. Em relação ao córtex pré-frontal medial, a análise estatística demonstrou que houve efeito da interação entre variáveis ($F_{4,18} = 36.33$, $P < 0,0001$), efeito principal do ambiente ($F_{2,18} = 10.07$, $p < 0,01$) e efeito principal do tempo ($F_{2,18} = 54,68$, $P < 0,0001$). Animais criados tanto em ambiente estressor ($45,33 \pm 4,61$, $p < 0,001$) quanto em ambiente enriquecido ($37,0 \pm 3,60$, $p < 0,001$) apresentaram maior número de células Vv^+ no córtex pré-frontal medial em relação ao grupo padrão ($22,0 \pm 2,64$) em 7 dias de exposição. No entanto, animais estressados ($34,33 \pm 2,30$, $p < 0,001$) e animais enriquecidos ($53,33 \pm 5,03$, $p < 0,001$) apresentaram menor quantidade de células Vv^+ em relação ao grupo padrão ($74,0 \pm 4,59$) com exposição de 35 dias ($p < 0,001$), conforme podemos observar na Figura 17.

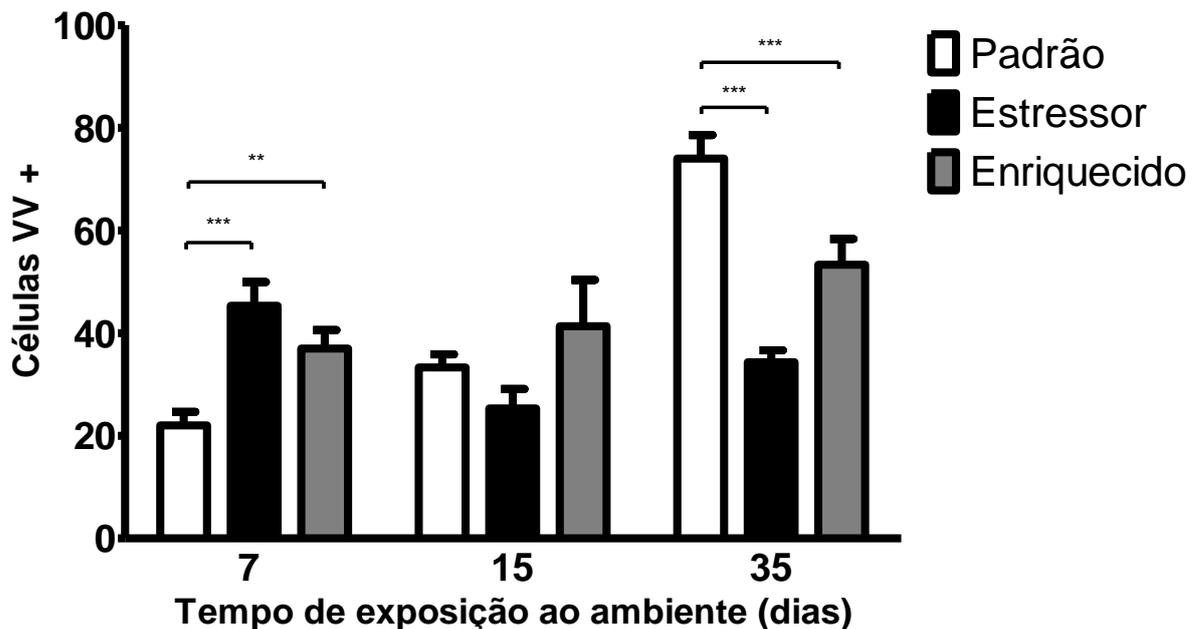


Figura17: Efeitos das variáveis ambiente X tempo sobre a expressão de rede perineuronal no córtex pré-frontal medial. Os valores são expressos em média e erro padrão da média. A análise estatística demonstrou que houve efeito da interação ($F_{4,18} = 36.33$, $p < 0,0001$), efeito principal do ambiente ($F_{2,18} = 10.07$, $p = 0,0012$) e efeito principal do tempo ($F_{2,18} = 54,68$). ($*p < 0,01$), ANOVA com dois fatores e pós-teste de Bonferroni.

Quanto ao córtex pré-frontal ventral (orbital), a análise estatística (Figura 18) demonstrou efeito da interação entre variáveis ($F_{4,18} = 39.93$, $p < 0,0001$), efeito principal do ambiente ($F_{2,18} = 182,8$, $p < 0,0001$) e efeito principal do tempo ($F_{2,18} = 101.0$, $p < 0,0001$). Animais criados em ambiente estressor apresentaram menor

quantidade de células Vv⁺ em 7 ($14,33 \pm 1,52$, $p < 0,001$), 15 ($11,0 \pm 1,0$, $p < 0,001$) e 35 dias ($10,0 \pm 1,0$, $p < 0,001$) em relação ao grupo padrão ($22,0 \pm 2,0$; $23,0 \pm 4,35$; $41, 33 \pm 1, 52$, respectivamente). No entanto, animais criados sob enriquecimento ambiental não apresentaram diferença significativa em 7 ($19,66 \pm 1,52$, $p > 0,05$), 15 ($24,66 \pm 2,51$, $p > 0,05$) e 35 ($45,0 \pm 2,64$, $p > 0,05$) dias de exposição.

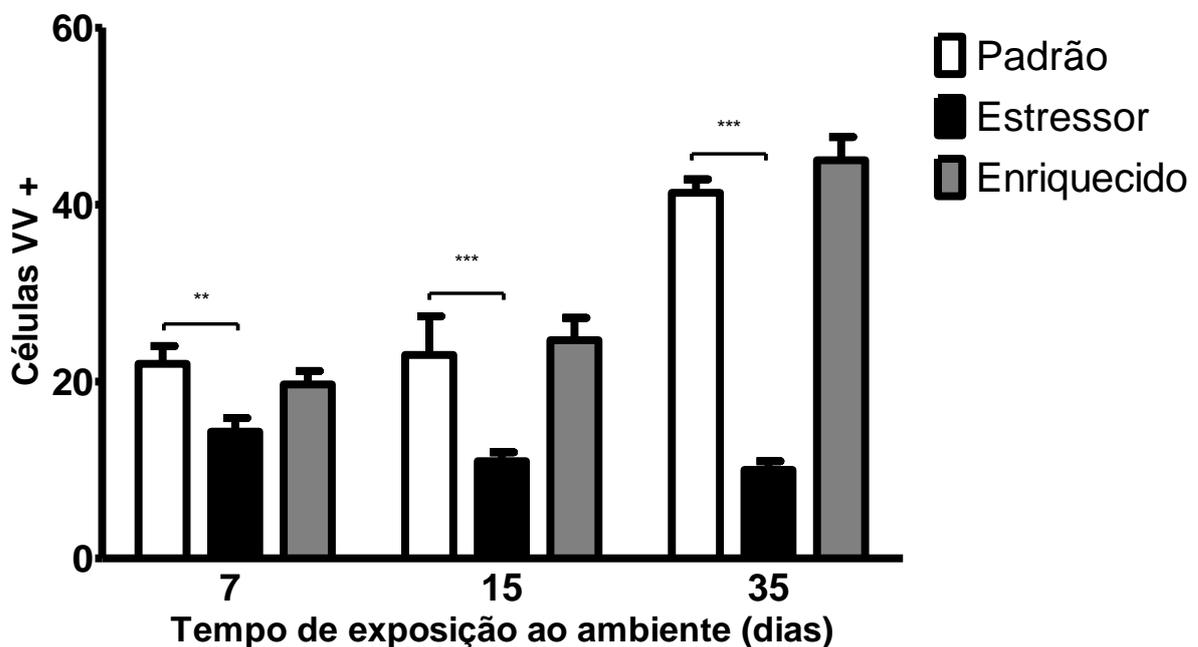


Figura 18: **Efeitos das variáveis ambiente Xtempo sobre a expressão de rede perineuronal no córtex pré-frontal ventral.** Os valores são expressos em média e erro padrão da média. Quanto ao córtex pré-frontal ventral (orbital), a análise estatística demonstrou efeito da interação ($F_{4,18} = 39.93$, $p < 0,0001$), efeito principal do ambiente ($F_{2,18} = 182,8$, $p < 0,0001$) e efeito principal do tempo ($F_{2,18} = 101.0$, $p < 0,0001$). (* $p < 0,01$), ANOVA com dois fatores e pós-teste de Bonferroni.

Qualitativamente, observamos que a distribuição espaço-temporal de PGSC marcados pela *Vicia villosa* na matriz extracelular que formam as redes perineuronais no córtex pré-frontal de ratos submetidos à diferentes ambientes apresentou variação dependendo da duração da exposição ambiental, mas não do tipo de ambiente. Constatamos que nos animais com 7 e 15 dias de exposição, ou seja, com 35 dias de vida pós-natal, em qualquer ambiente, ocorreu um predomínio de marcação difusa da neurópila no córtex pré-frontal, com poucas células Vv⁺ marcadas. No entanto, em animais com 35 dias de exposição, ou seja, 63 dias de vida pós-natal, observamos um padrão de marcação de proteoglicanos mais

característico de redes perineuronais, com marcação adjacente aos corpos celulares, conforme podemos observar nas Figuras 19, 20, 21.

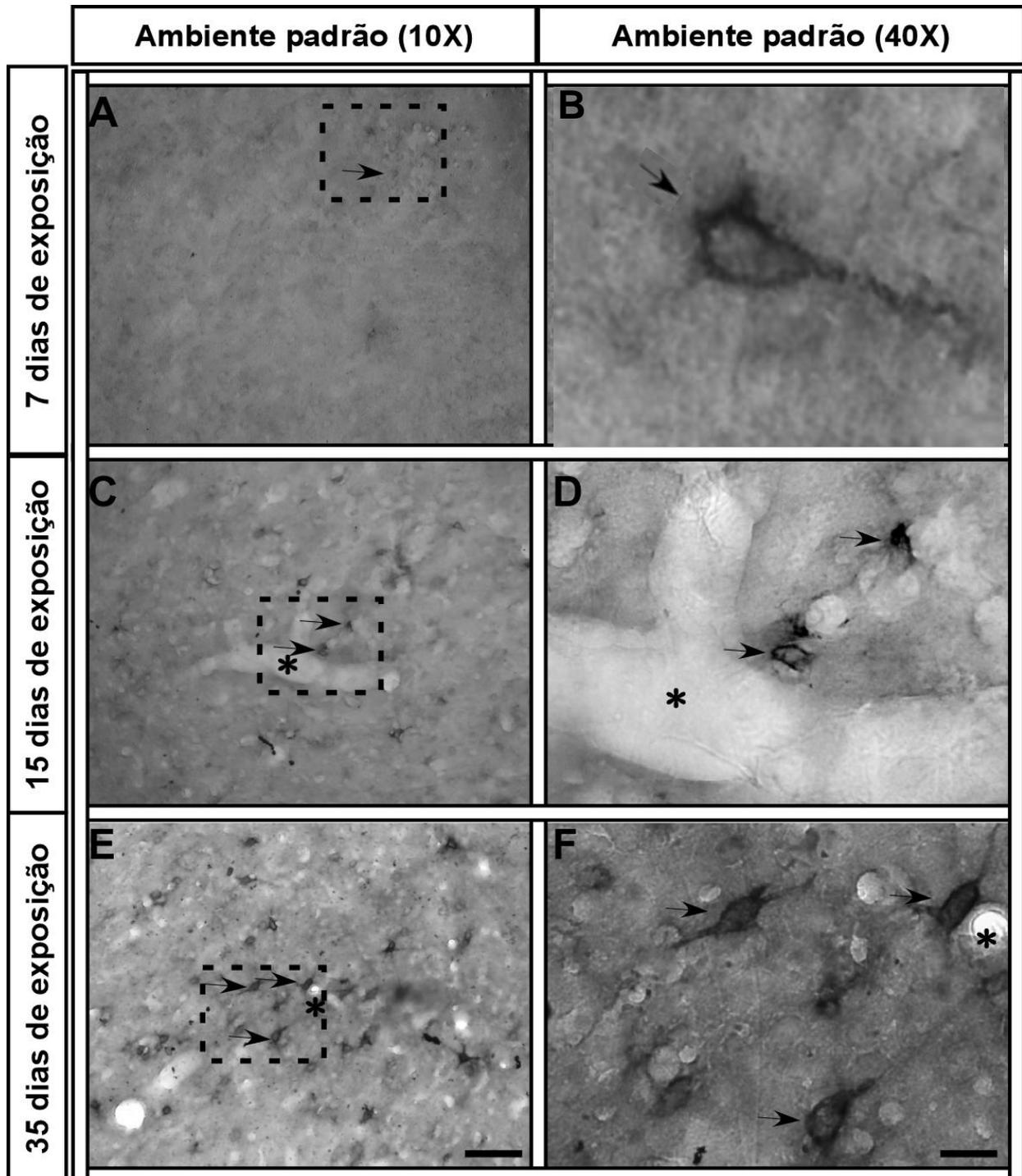


Figura 19: Reação histoquímica da lectina *Vicia villosa* no córtex pré-frontal de ratos alojados em ambiente padrão. Fotomicrografias de cortes coronais de animais com tempos de exposição de 7, 15 e 35 dias. As setas indicam células Vv⁺. A, C, E (Aumento de 10x); B, D, F (Aumento de 40x). Escala: 100 µm.

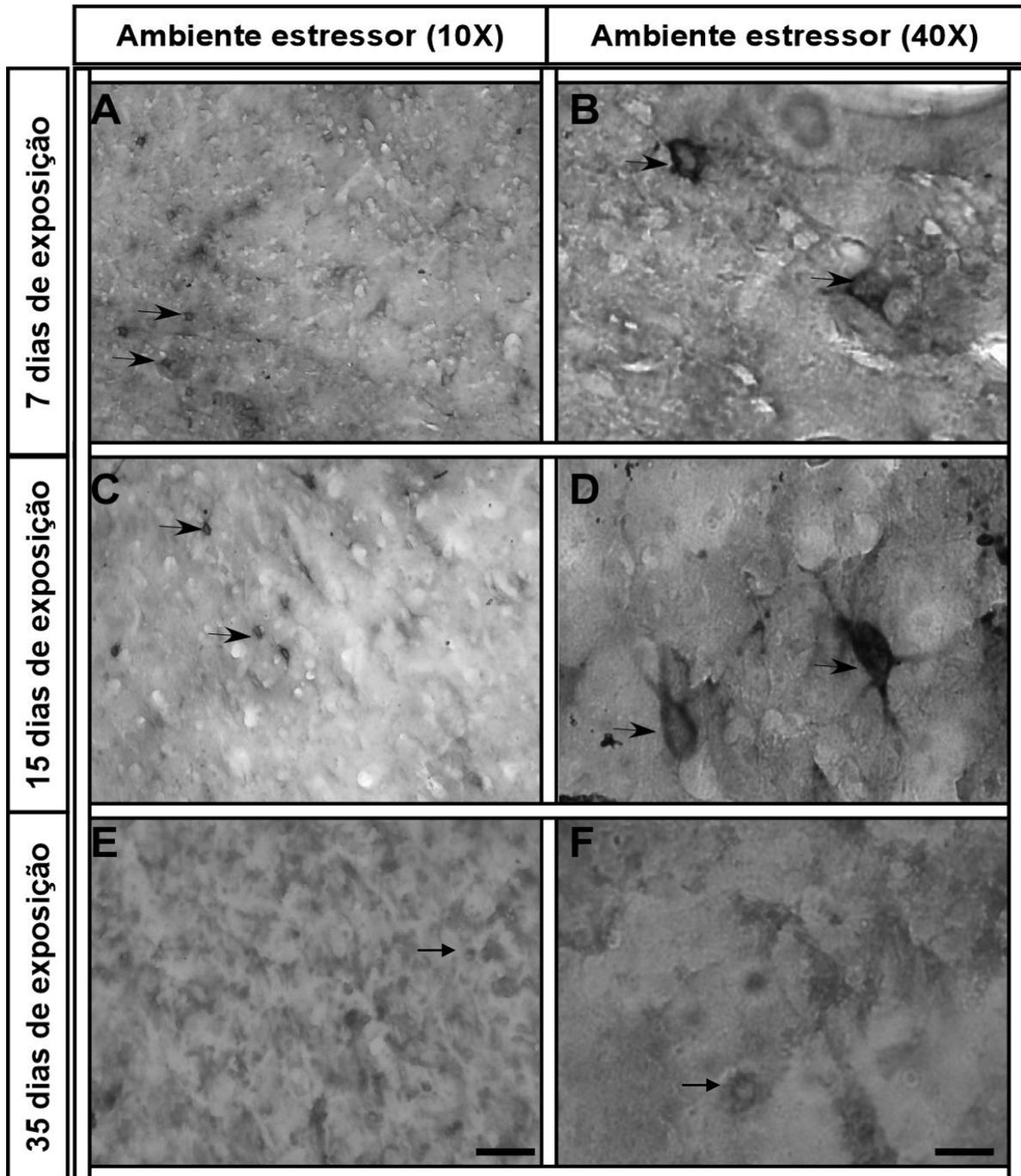


Figura 20: **Reação histoquímica da lectina *Vicia villosa* no córtex pré-frontal de ratos alojados em ambiente estressor.** Fotomicrografias de cortes coronais de animais com tempos de exposição de 7, 15 e 35 dias. As setas indicam células Vv⁺. **A, C, E** (Aumento de 10x); **B, D, F** (Aumento de 40x). Escala: 100 µm.

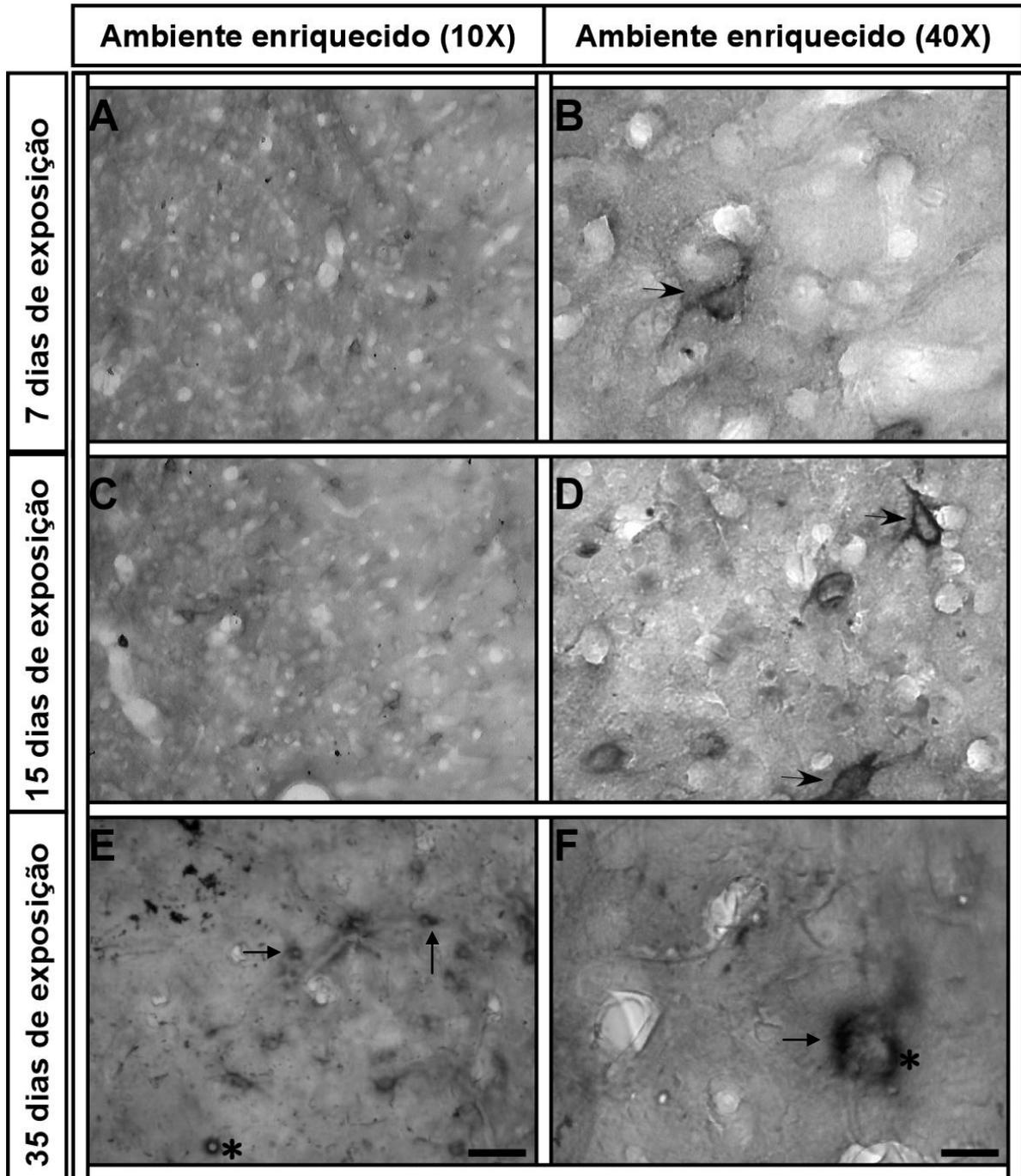


Figura 21: **Reação histoquímica para *Vicia villosa* no córtex pré-frontal de ratos alojados em ambiente enriquecido.** Fotomicrografias de cortes coronais de animais com tempos de exposição de 7, 15 e 35 dias. As setas indicam células Vv^+ . **A, C, E** (Aumento de 10x); **B, D, F** (Aumento de 40x). Escala: 100 μ m. Escala: 100 μ m.

3.4 MEMÓRIA OPERACIONAL

A memória operacional dos animais foi avaliada através do teste de alternância espontânea. Nossos dados demonstraram que houve efeito significativo da interação entre ambiente e tempo ($F_{4,63} = 17.33$, $p < 0,001$), assim como, um efeito principal do ambiente ($F_{2,63} = 7.064$, $p < 0,001$) e um efeito principal do tempo ($F_{4,63} = 17.33$, $p = 0.0017$) sobre este fator (Figura 22).

Os animais expostos ao ambiente estressor por 7 dias apresentaram desempenho no teste de memória operacional superior ($57,55 \pm 7,61$, $p < 0,01$) aos animais do grupo padrão ($44,25 \pm 6,7$). No entanto, os índices de desempenho foram inferiores em 15 dias ($41,86 \pm 5,37$, $p < 0,001$) e em 35 dias de exposição ($39,72 \pm 5,49$, $p < 0,001$) em relação ao grupo padrão ($62,83 \pm 7,95$; $55,06 \pm 4,40$, respectivamente). Em relação aos animais do grupo enriquecido, observamos um desempenho de memória operacional superior em 7 dias ($58,24 \pm 7,48$, $p < 0,001$), 15 dias ($76,07 \pm 10,38$, $p < 0,01$) e 35 dias ($66,86 \pm 6,4$, $p < 0,01$), conforme podemos observar na Figura 22.

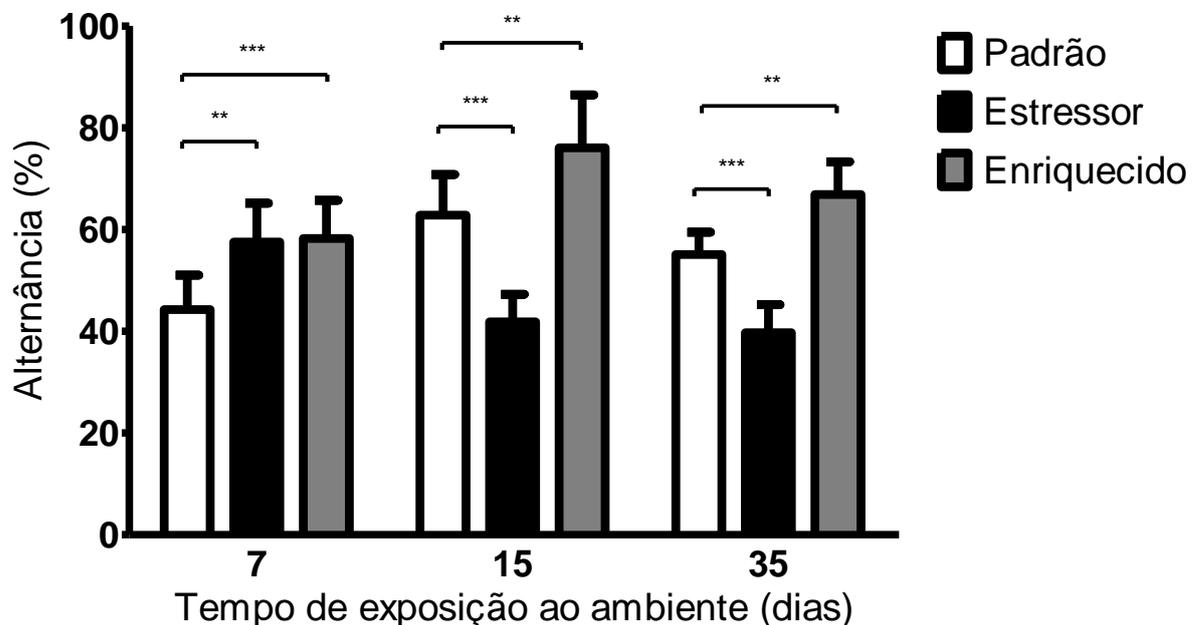


Figura 22: **Efeitos da interação ambiente X tempo sobre o desempenho em teste de memória operacional.** Teste comportamental de alternância espontânea. Análise estatística demonstrou efeitos principais da interação ($F_{4,63} = 17.33$, $p < 0,001$), assim como um efeito principal do ambiente ($F_{2,63} = 7.064$, $p < 0,001$) e um efeito principal do tempo ($F_{4,63} = 17.33$, $p = 0.0017$). Os valores são expressos em média e erro padrão da média. (* $p < 0,05$), ANOVA com dois fatores e pós-teste de Bonferroni.

3.5 INIBIÇÃO COMPORTAMENTAL

A função executiva de inibição comportamental foi avaliada através dos testes de tigmotaxia. A análise estatística demonstrou efeitos significativos da interação entre tempo e ambiente de exposição ($F_{4,63} = 7,9$, $p < 0,0001$), efeito principal do ambiente ($F_{2,63} = 7,8$, $p = 0,0010$) e do tempo ($F_{2,63} = 9,2$, $p = 0,0003$). Constatamos que tais efeitos foram significativos apenas na comparação entre ambiente padrão (7 dias; $91,12 \pm 4,26$; 15 dias; $91,70 \pm 2,92$; e 35 dias; $95,95 \pm 2,97$) e ambiente estressor nos períodos de 7 ($95,83 \pm 1,18$, $p < 0,01$) e 35 dias ($92,0 \pm 2,65$, $p < 0,05$). O período de 15 dias ($88,95 \pm 4,59$, $p > 0,05$) não apresentou diferença significativa, assim como nenhum tempo de exposição associado ao ambiente enriquecido (7 dias; $92,62 \pm 3,68$; 15 dias; $95,08 \pm 1,92$; e 35 dias; $98,87 \pm 0,43$, $p > 0,05$), conforme podemos observar na Figura 23 abaixo:

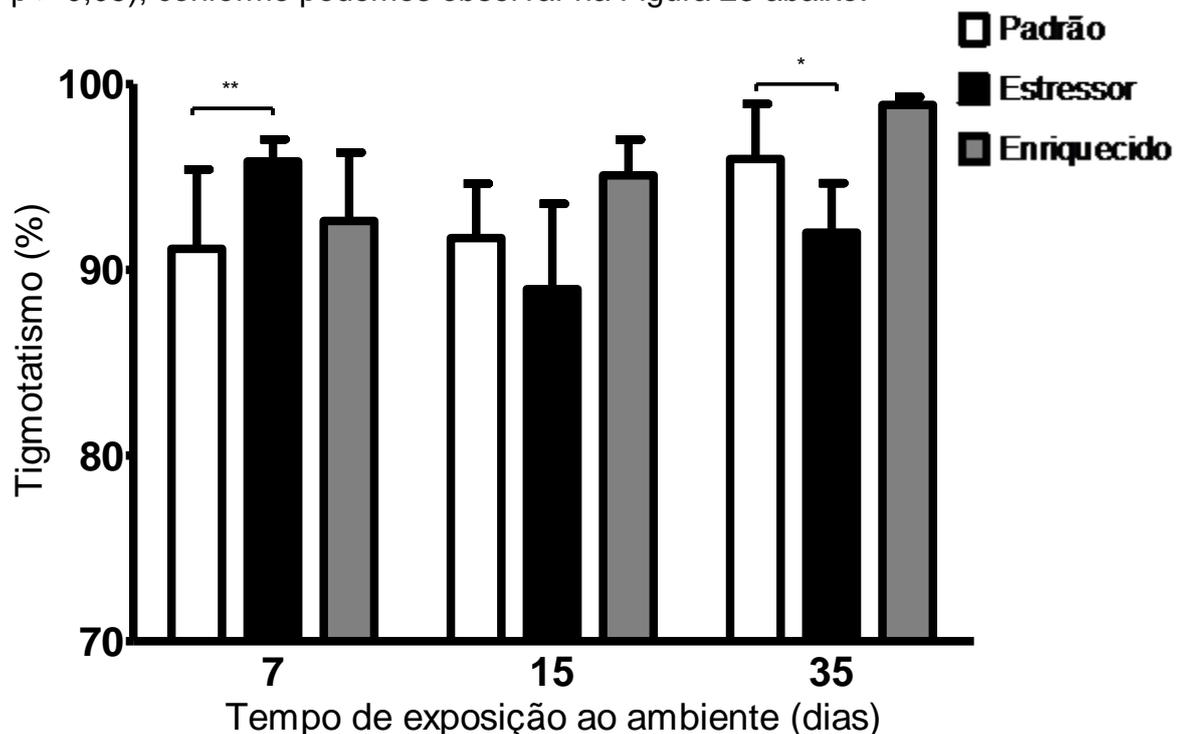


Figura 23: **Tigmotaxia**. Efeitos da interação ambiente X tempo sobre a inibição comportamental dos animais. A análise estatística demonstrou efeitos significativos da interação entre tempo e ambiente de exposição ($F_{4,63} = 7,9$, $p < 0,0001$), efeito principal do ambiente ($F_{2,63} = 7,8$, $p = 0,0010$) e do tempo ($F_{2,63} = 9,2$, $p = 0,0003$). Os valores são expressos em média e erro padrão da média. (* $p < 0,001$), ANOVA com dois fatores e pós-teste de Bonferroni.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos o efeito do ambiente (estressor crônico e ambiente enriquecido) sobre o desempenho das funções executivas e o amadurecimento das redes perineuronais durante o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal. As funções executivas são processos cognitivos responsáveis pelo gerenciamento de outros processos cognitivos complexos como intencionalidade, planejamento, tomada de decisões, linguagem, flexibilidade mental, entre outros (GILBERT; BURGUESS, 2008). As funções executivas emergem da ativação de larga escala de populações neuronais em várias regiões do cérebro, orquestrada pelo córtex pré-frontal (MILLER; COHEN, 2001). Em humanos, o córtex pré-frontal é especialmente desenvolvido, o que pode estar associado com a emergência do perfil cognitivo único dos seres humanos. Distúrbios no desenvolvimento desta região são catastróficos para “comportamento adequado” do indivíduo adulto.

O córtex pré-frontal é uma das regiões cerebrais com maior sensibilidade aos efeitos negativos da exposição ao estresse (ARNSTEN, 1998). Por exemplo, existem várias evidências de que o estresse crônico causa mudanças estruturais nos circuitos neurais nesta região, como na complexidade da arborização dendrítica de neurônios (LISTON et al., 2006; RADLEY et al., 2006) e na espessura da substância cinzenta em humanos (ANSELL et al., 2012). Os efeitos do estresse são particularmente proeminentes durante o período crítico de plasticidade de sistemas cerebrais, que no caso do córtex pré-frontal dura até o início da vida adulta (LENROOT; GIEDD, 2006; LUPIEN et al., 2009).

Em várias partes do mundo, especialmente em países pobres, crianças e adolescentes sobrevivem em condições precárias, em ambientes inadequados e em situação de estresse crônico. Qual o efeito desses ambientes no desenvolvimento do córtex pré-frontal e das funções executivas? Essa é a pergunta que queremos ajudar a responder utilizando roedores como modelos experimentais.

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS ACERCA DO MODELO EXPERIMENTAL

Neste estudo, utilizamos como paradigma experimental a exposição de ratos com 28 dias de idade pós-natal (considerados adolescentes) à condições ambientais diferentes (ambiente padrão, ambiente estressor crônico e ambiente enriquecido)

com diferentes tempos de duração (7, 15 e 35 dias), durante o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal.

Na literatura, o estresse crônico é geralmente simulado através da exposição dos animais a um agente estressor único e durante um período de tempo prolongado (ARNSTEN, 2009; COOK; WELLMAN, 2004; JOËLS et al., 2007), p.ex. submetendo os animais a imobilização física durante períodos prolongados de tempo para avaliar as alterações morfológicas induzidas em neurônios piramidais no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (DE KLOET; JOËLS; HOSLBOER, 2005; COOK; WELLMAN, 2004; HAINS; ARNSTEN, 2008; LEUNER; SHORS, 2012). Este paradigma é eficaz em produzir ativação do sistema nervoso simpático e do eixo HPA, induzindo alterações fisiológicas tais como: aumento do tamanho da glândula adrenal, atrofia do timo, inibição de crescimento somático, perda de peso corporal, aumento de corticoesteróides, entre outras (DE KLOET; JOËLS; HOSLBOER, 2005; LUPIEN et al., 2009; SHANSKY; MORRISON, 2009). No sistema nervoso central, esse paradigma induz efeitos sobre o crescimento, a maturação, a diferenciação e a comunicação dos neurônios, assim como sobre a disponibilidade de fatores neurotróficos, a quantidade de neurotransmissores, a sinaptogênese e a mielinização dos axônios (BUSS et al., 2012; HENCKENS et al., 2011).

Entretanto, diversos estudos demonstram uma relativa adaptação ao agente estressor utilizado no paradigma, que pode ser inferida a partir da estabilização dos níveis de corticoesterona (GOLDWATER et al., 2009), provavelmente relacionada com a previsibilidade do agente estressor (JOËLS et al., 2007). Optamos por utilizar um paradigma experimental que combina diferentes estressores de um modo não previsível, dificultando a adaptação e previsibilidade dos animais aos mesmos (BONDI et al., 2008; COOK; WELLMAN, 2004; DIAS-FERREIRA et al., 2009). O paradigma experimental que utilizamos foi eficaz em produzir mudanças na massa corporal, nos níveis de corticoesterona, na distribuição espacial e temporal das redes perineuronais no córtex pré-frontal e influenciaram na memória operacional e na inibição comportamental dos animais (CERQUEIRA et al., 2007; DIAS-FERREIRA et al., 2009; DE KLOET; JOËLS; HOSLBOER, 2005; LUPIEN et al., 2009; SHANSKY; MORRISON, 2009).

Em relação ao ambiente enriquecido, os animais foram alojados continuamente no mesmo ambiente, sendo removidos apenas ao final do experimentos para realização dos testes comportamentais (SIMPSON; KELLY,

2011). Na literatura, existem vários protocolos disponíveis para simular ambientes enriquecidos para animais de experimentação. As principais diferenças entre os protocolos se relacionam a(o): tamanho das gaiolas e número de animais por gaiola, tipos de objetos usados como estímulo, idade dos animais, tipos de ambiente-padrão utilizados, linhagem e sexo dos animais, etc. (SIMPSON; KELLY, 2011). O ambiente enriquecido que utilizamos envolve uma combinação de estímulos sociais e sensoriais, que possibilitam interações sociais, comportamentos exploratórios, exposição à novidade e maior atividade física (BENNETT et al., 1964; DIAMOND, 2001; GELFO et al., 2009; PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000; ROSEZWEIG; BENNETT, 1996; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2009).

4.2 EFEITOS DO AMBIENTE SOBRE A MASSA CORPORAL E SOBRE OS NÍVEIS DE CORTICOESTERONA

Nossos resultados demonstraram que ocorreu aumento na massa corporal dos animais nos três períodos de exposição em todos os grupos experimentais. Não houve diferença entre o valor da massa corporal dos animais alojados nos ambientes enriquecido e padrão. No entanto, animais submetidos ao ambiente estressor tiveram menor ganho de massa corporal (ver Figura 15). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos em outros estudos (BLOSS et al., 2010; COOK; WELLMAN, 2004; DUCCOTTET; GRIEBEL; BELZUNG, 2003; DIAS-FERREIRA et al., 2009; SHANSKY et al., 2009) e podem resultar da ativação crônica do sistema nervoso simpático e do eixo HPA em resposta ao estresse (DE KLOET; JOËLS; HOSLBOER, 2005; LUPIEN et al., 2009; ARNSTEN, 2009).

A análise da concentração plasmática de corticoesterona demonstrou efeito principal do ambiente, uma vez que encontramos níveis reduzidos de corticoesterona nos três períodos de tempo de exposição em animais submetidos ao estresse crônico e níveis aumentados de corticoesterona em animais expostos ao ambiente enriquecido por 35 dias, quando comparados ao controle (ver Figura 16). Estes resultados corroboram dados de outros estudos indicando que o período da adolescência está associado a uma atividade intensificada no eixo HPA (ANDERSEN; TEICHER, 2008; LUPIEN et al., 2009). Moncek e colaboradores (2004) encontraram níveis altos de corticoesterona em animais expostos ao ambiente enriquecido por 40 dias. Estes autores sugeriram que a exposição a uma

maior quantidade e diversidade de estímulos sensoriais e motores pode causar ativação hormonal intermitente e liberação de corticoesterona. No entanto, estes animais não apresentaram efeitos deletérios da ativação excessiva dos sistemas de resposta ao estresse (MONCEK et al., 2004). Outros estudos sugerem que níveis elevados de hormônios corticoesteróides são importantes para a plasticidade do sistema nervoso (ANDERSEN; TEICHER, 2008; LUPIEN et al, 2009; LYONS; PARKER; SCHATZBERG, 2010).

Os níveis reduzidos de corticoesterona em animais submetidos ao estresse crônico podem resultar do excesso de retroalimentação negativa ao eixo HPA, causado por alterações significativas nos níveis de glicocorticóides. Esse quadro é comum em modelos experimentais de transtorno de estresse pós-traumático (RADLEY; MORRISON, 2005). Estes animais também podem estar atravessando a fase de exaustão característica da SAG, quando os sistemas de resposta ao estresse estão descontrolados (FRANCI, 2005; SELYE, 1950).

4.3 EFEITO DO AMBIENTE SOBRE AS REDES PERINEURONAIS

A matriz extracelular possui inúmeras funções no parênquima do tecido nervoso e o curso temporal do amadurecimento das redes perineuronais, um dos componentes da matriz extracelular, coincide com o fechamento do período crítico de plasticidade em várias regiões do encéfalo (BAVELIER et al, 2010; HENSCH, 2005). As redes perineuronais são especializações da matriz extracelular que envelopam interneurônios inibitórios, estabilizando as sinapses após o fechamento período crítico de plasticidade. Neste trabalho, analisamos a distribuição espacial e temporal das redes perineuronais no córtex pré-frontal, através da utilização da lecitina *Vicia villosa* que se liga a PGSC, em ratos adolescentes expostos a ambientes estressor e enriquecido (BAHIA et al., 2008; BERARDI; PIZZORUSSO; MAFFEI, 2004; DITYATEV ; SCHACHNER, 2003, 2006; KARETKO; SKANGIEL-KRAMSKA, 2009; KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012; LAABS et al., 2005; RHODES; FAWCETT, 2004; YAMAGUCHI, 2000; WANG; FAWCETT, 2012).

Os nossos resultados demonstraram que no início da adolescência, até 43 dias de vida pós-natal, os proteoglicanos de sulfato de condroitina, que são componentes-chave das redes perineuronais, encontram-se dispersos na matriz extracelular, com poucos corpos celulares apresentando redes perineuronais. Após

60 dias de vida pós-natal, o número de neurônios que apresentam redes perineuronais aumenta consideravelmente, sinalizando o início do fechamento do período crítico de plasticidade no córtex pré-frontal.

Tanto na região medial quanto ventral do córtex pré-frontal, os animais do grupo padrão, com idade P35, apresentaram PGSCs distribuídas pela neurópila e pouca concentração em volta dos corpos celulares (ver Figura 19, 20, 21). No entanto, em animais com idade P63, foi observado aumento no número de corpos celulares de neurônios marcados com a *Vicia villosa*, com um padrão característico de redes perineuronais (ver Figuras 19, 20, 21). Este padrão temporal de marcação já havia sido identificado em outras regiões corticais, como o córtex somestésico (BAHIA et al., 2008), o córtex visual (BERARDI; PIZZORUSSO; MAFFEI, 2004; HENSCH, 2004) e regiões subcorticais, como a amígdala (GOGOLLA et al., 2009) e o núcleo estriado (SIMONETTI et al., 2009). Este padrão de marcação celular pela *Vicia villosa* é peculiar dos interneurônios GABAérgicos que expressam parvalbulmina (SENGPIEL, 2007). Diversas evidências demonstram que o desenvolvimento dos circuitos inibitórios é posterior ao dos circuitos excitatórios (HENSCH, 2005). Este amadurecimento mais tardio dos circuitos inibitórios está relacionado com o fechamento do período crítico de plasticidade (HENSCH, 2005; SUGIYAMA; PROCHIANTZ; HENSCH, 2009).

Os nossos resultados sugerem que o amadurecimento das redes perineuronais compostas por PGSC no córtex pré-frontal está relacionado aos aspectos qualitativos do ambiente, como ocorre em outras regiões corticais (DE VILLERS-SIDANI et al, 2008; DITYATEV; SCHACHNER, 2003; KWOK; WARREN; FAWCETT, 2012; BARTOLETTI et al., 2004). Em roedores, por exemplo, a manipulação do padrão de estimulação visual e auditiva durante a fase inicial do desenvolvimento atrasa o fechamento do período crítico de plasticidade nos córtices visual e auditivo primários (FAGIOLINI et al., 1994; VILLERS-SIDANI et al., 2008). O padrão temporal de amadurecimento das redes perineuronais observados neste estudo em animais alojados no ambiente padrão sugere uma relação dessa estrutura com o desenvolvimento do período crítico de plasticidade no córtex pré-frontal.

Os resultados do presente estudo confirmam a hipótese sobre os efeitos do ambiente no amadurecimento das redes perineuronais e no estabelecimento do curso temporal do período crítico de plasticidade em várias regiões cerebrais. Neste

trabalho, demonstramos pela primeira vez um efeito do estresse crônico sobre a expressão das redes perineuronais durante o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal. Quanto maior o tempo de exposição ao estresse crônico, maior os efeitos sobre o amadurecimento das redes perineuronais, tanto na região medial quanto ventral do córtex pré-frontal.

Observamos também que os efeitos do estresse crônico não são homogêneos no córtex pré-frontal: são diferentes na região medial e ventral. Esse resultado é semelhante ao encontrado no córtex auditivo primário (DE VILLERS-SIDANI et al., 2008). Embora a quantidade de células Vv⁺ permanecesse constante nos três períodos de tempo, em ambas as subdivisões (medial e ventral), observamos que na porção medial do córtex pré-frontal de animais expostos ao ambiente estressor havia uma quantidade maior de células Vv⁺ marcadas após 7 dias de exposição em relação aos animais mantidos em ambiente padrão. Na porção ventral, a quantidade de células Vv⁺ permaneceu inferior aos animais mantidos em ambiente padrão nos três períodos de tempo.

O amadurecimento das redes perineuronais nesta situação de estresse crônico e a consequente estabilização das sinapses nos circuitos inibitórios têm como consequência a diminuição da plasticidade do sistema nervoso no córtex pré-frontal medial. Essa modificação pode ser a base de um mecanismo compensatório para evitar maiores danos ao sistema nervoso central em decorrência da superestimulação do eixo HPA causada pelos estímulos estressores (ANDERSEN; TEICHER, 2008; LUPIEN et al., 2009).

Vários trabalhos têm demonstrado efeitos do estresse crônico sobre a morfologia de neurônios piramidais, como a diminuição da arborização dendrítica, alterações na formação de espinhas dendríticas e do número de sinapses, provavelmente devido ao aumento na quantidade de aminoácidos excitatórios (glutamato) induzido por glicocorticóides (BLOSS et al., 2010; COOK; WELLMAN, 2004; DIAS-FERREIRA, 2009). Outros estudos demonstram efeitos do estresse crônico sobre a expressão de genes que regulam o metabolismo neuronal, a transmissão sináptica e a quantidade de receptores glutamatérgicos dependentes de voltagem (DE KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005; GRAYBEAL; KISELYCZNYK; HOLMES, 2012). Essas mudanças adaptativas são respostas compensatórias para atenuar a excitação excessiva dos neurônios e a consequente neurotoxicidade (HILL; HILLARD; MCEWEN, 2011).

Nossos resultados mostram que animais expostos ao ambiente enriquecido apresentam diferenças significativas no córtex pré-frontal medial após 7 e 35 dias de exposição aos ambiente. Estas diferenças regionais sugerem uma sensibilidade diferente aos estímulos do ambiente enriquecido, que pode estar associada às funções diferentes de cada região.

Evidências recentes demonstram efeitos do ambiente sobre o período crítico de plasticidade no córtex visual (BERARDI; PIZZORUSO; MAFFEI, 2000). Por exemplo, a criação de animais em ambientes privados de luz previne o desenvolvimento das redes perineuronais formada por sulfato de condroitina. No entanto, a exposição ao ambiente enriquecido é capaz de reduzir estes efeitos (BARTOLETTI et al, 2004). Outros estudos demonstram que animais criados em ambiente enriquecido desde o nascimento apresentam uma aceleração do desenvolvimento da acuidade visual, bem como apresentam aumento na expressão de precursores do neurotransmissor inibitório GABA (GAD 65/67) e nos níveis de BDNF no córtex visual (CANCEDDA et al, 2004). Além disso, o enriquecimento ambiental aumenta a complexidade dendrítica e o número de espinhas dendríticas em neurônios piramidais nas camadas III e V do córtex frontal de ratos e tais mudanças morfológicas são diferentes, de acordo com a sub-região analisada (GELFO et al., 2009). Nesse sentido, consideramos a possibilidade do ambiente exercer diferentes influências de acordo com as áreas analisadas no córtex pré-frontal de ratos.

4.4 EFEITO DO AMBIENTE SOBRE AS FUNÇÕES EXECUTIVAS

Nossos resultados corroboram resultados anteriores sobre o amadurecimento das funções executivas durante a adolescência em animais criados em ambiente padrão (CRONE, 2009). O amadurecimento das funções executivas está relacionado com mecanismos de refinamento sináptico dependente da experiência e da mielinização de axônios (BLAKEMORE; CHOUDHURY, 2006; CASEY; GIEDD; THOMAS, 2000; CREWS; HE; HODGE, 2007). O amadurecimento das funções executivas também está relacionado com o amadurecimento dos circuitos inibitórios (BRENHOUSE; ANDERSEN, 201; HENSCH, 2004; LAABS et al., 2005).

Neste estudo, demonstramos que existe efeito da interação entre tempo de exposição e ambiente sobre a função executiva de memória operacional espacial. O enriquecimento ambiental aumentou o desempenho no teste comportamental de alternância espontânea de entradas nos braços do labirinto nos três tempos de exposição. No entanto, o desempenho dos animais submetidos ao estresse crônico foi sempre inferior na média ao desempenho do grupo de animais expostos ao ambiente padrão e enriquecido.

Esses resultados estão de acordo com as evidências disponíveis na literatura sobre os efeitos positivos do enriquecimento ambiental sobre a memória operacional espacial (LEGGIO et al., 2005). Leggio e colaboradores (2005) sugerem que esta melhora seja devido a maior estimulação sensorial e social, assim como ao exercício físico (LEGGIO et al., 2005).

Com relação aos efeitos do estresse crônico, os resultados estão de acordo com as evidências recentes que demonstram efeito negativo sobre a memória operacional (ARNSTEN, 2009; CERQUEIRA et al., 2007; MIKA et al., 2012). Este efeito está associado com uma redução no volume cortical no córtex pré-frontal medial de ratos (ARNSTEN, 2009; CERQUEIRA et al., 2007; HANSON et al., 2012). Nossos resultados adicionam outros fatores a serem considerados para explicar o pior desempenho de animais submetidos ao estresse crônico durante a fase de adolescência: 1) o surgimento precoce das redes perineuronais nos interneurônios e 2) o fechamento precoce do período crítico de plasticidade no córtex pré-frontal.

O efeito positivo do estresse crônico sobre o desempenho no teste de memória operacional com 7 dias de exposição pode ser explicado pela ativação dos mecanismos de adaptação de curto prazo ao estresse, com aumento do estado de alerta e vigilância do animal (ARNSTEN, 2009; FRANCI, 2005; LUPIEN et al., 2009; SELYE, 1950).

Os nossos resultados também demonstraram efeitos significativos da interação entre tempo de exposição e ambiente sobre a função executiva de inibição comportamental. Os animais expostos ao ambiente enriquecido apresentaram perfil comportamental semelhante aos animais do grupo de ambiente padrão. Os animais de ambos os grupos apresentaram percentual elevado de tigmotatismo, ou seja, permaneceram a maior parte do tempo próximo às paredes do aparato, demonstrando comportamento típico de ansiedade. Este padrão comportamental

pode ser indicativo do amadurecimento da inibição comportamental nestes animais, que modula negativamente o impulso de exploração de ambientes novos.

Alguns estudos relatam diminuição da atividade locomotora espontânea e mudanças no comportamento exploratório de animais criados em ambiente enriquecido (ARCO et al. 2007). Os autores sugerem que este resultado está associado ao comportamento exploratório mais eficiente e habituação mais rápida destes animais ao ambiente (ARCO et al. 2007). Estes resultados podem ser explicados, também, pelos níveis mais elevados de corticoesterona devido à maior ativação do eixo HPA em animais expostos à ambientes enriquecidos, melhorando a memória operacional e a inibição comportamental (LUPIEN et al., 2009).

Quanto ao grupo de animais submetido ao estresse crônico, observamos aumento da inibição comportamental após o período de 7 dias de exposição ao estresse, quando comparado ao grupo exposto aos ambiente padrão. Este fato pode refletir a ativação de curto prazo do eixo HPA e o aumento da vigilância para estímulos estressores. Por outro lado, a menor inibição comportamental observada após exposição de 35 dias aos estímulos estressores talvez seja um reflexo da exaustão do sistema de resposta ao estresse, diminuindo a sensibilidade dos animais aos perigos associados com um ambiente novo. Outros estudos em roedores demonstram comprometimento da inibição comportamental em animais submetidos ao estresse crônico (MIKA et al., 2012).

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados comprovaram a hipótese de que o ambiente em que o animal vive produz efeitos sobre o período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal. Demonstramos que viver em um ambiente sujeito a estímulos estressores imprevisíveis provoca alterações no período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal e, conseqüentemente, influencia o amadurecimento das funções executivas. De modo mais específico, apresentamos as seguintes conclusões:

- a) As PGSCs no córtex pré-frontal de ratos são inicialmente dispersas na matriz extracelular no início da adolescência. No decorrer do desenvolvimento, as redes perineuronais amadurecem com a condensação crescente de PGSCs em volta de corpos celulares e dendritos proximais de interneurônios até o final da adolescência;
- b) A dinâmica espaço-temporal do padrão de distribuição de PGSC na matriz extracelular do córtex pré-frontal influencia os eventos definidores do período crítico de plasticidade desta região;
- c) O estresse crônico causa modificação no padrão de expressão das redes perineuronais no córtex pré-frontal. Mais especificamente, favorece amadurecimento precoce dessas estruturas em ratos adolescentes. Esse efeito é mais evidente na porção medial do córtex pré-frontal;
- d) O ambiente enriquecido causa modificações nas redes perineuronais que favorece a plasticidade durante o período crítico do córtex pré-frontal de ratos adolescentes;
- e) Tanto o ambiente estressor crônico como o enriquecido alteram o desempenho de memória operacional espacial e inibição comportamental em ratos adolescentes.

Na continuidade deste estudo, é necessário avaliar períodos anteriores e posteriores àqueles utilizados neste trabalho (28-63 dias pós natal) para determinar a janela temporal exata do período crítico do córtex pré-frontal (GIEDD et al., 1999; GOGTAY et al., 2004). Além disso, é necessário estudar outras moléculas associadas com o período crítico de plasticidade, como por exemplo as proteínas

Otx2 e Lynx 1, analisando se o ambiente estressor ou o ambiente enriquecido são capazes de modular a expressão dessas moléculas.

Os resultados deste trabalho são importantes para demonstrar os efeitos do ambiente nos quais mamíferos adolescentes estão inseridos sobre o desenvolvimento do seu sistema nervoso. Os nossos resultados indicam a vulnerabilidade do encéfalo adolescente para os efeitos negativos de estímulos estressores. No caso do córtex pré-frontal, por causa da sua associação com as funções executivas, esse efeito é mais dramático e indica a necessidade de vigilância aumentada para garantir ambientes adequados para o desenvolvimento do córtex pré-frontal de adolescentes: com um mínimo de agentes estressores e pleno de enriquecimento sensorial e social.

REFERENCIAS

ABOITIZ, F.; MONTIEL, J. Evolução do cérebro e do comportamento. In: LENT, Roberto. **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 2008.

AHIMA, R.S.; HARLAN, R.E. Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. **Neuroscience**. v.39, p.579–604, 1990.

ANDERSEN, S.; TEICHER, M. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. **Trends in Neurosciences**.v.31, n°.4, p.183-191, 2008.

ANSELL, Emily B. Cumulative Adversity and smaller gray matter volume in medial prefrontal, anterior cingulate, and insula regions. **Biological Psychiatry**.v.72, p.57-64, 2012.

ARCO, A.D. et al. Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. **Journal of Neurotransmission**. v.14, p.43-48, 2007.

ARDILA, A. On the evolutionary origins of executive functions. **Brain and Cognition**.v.68, p.92-99, 2008.

ARNSTEN, A. F.T. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. **Nature Reviews Neuroscience**. v.10, p.410-22, 2009.

ARNSTEN, A. F.T.The biology of being frazzled. **Science**. v. 280. p.1711-12, 1998.

ARON, A.R. Inhibition and the right inferior frontal cortex.**Trends in Cognitive Sciences**.v.8, n°4, p.170-77, 2004.

BADDELEY, A.; LOGIE, R. H. Working memory: the multiple component model. In: Miyake, A., Shah, P. (Eds.). **Models of Working Memory: Mechanisms of Active Maintenance and Executive Control**. Cambridge University Press, Cambridge, 1999, p. 28–61.

BAHIA, C. P. et al. Spatiotemporal Distribution of proteoglycans in the Developing Rat's Barrel Field and the Effects of Early Deafferentation. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 510, p.145–57, 2008.

BARTOLETTI, A. et al.Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. **Nature Neuroscience**. v.7, n°3, p.215-216, 2004.

BAVELIER, D. et al. Removing Brakes on Adult Brain Plasticity: From Molecular to Behavioral Interventions. **The Journal of Neuroscience**.v.30, n°45, p. 14964 –71, 2010.

- BENNETT, E. L. et al. Chemical and anatomical plasticity of brain: changes in brain through experience, demanded by learning theories, are found in experiments with rats. **Science**. v.146, p.610-19, 1964.
- BENNETT, M.R. The prefrontal–limbic network in depression: A core pathology of synapse regression. **Progress in Neurobiology**.v.93, p.457–67, 2011.
- BERARDI, N.; PIZZORUSSO, T.; MAFFEI, L. Critical periods during sensory development. **Current Opinion in Neurobiology**.v.10, p. 138–45, 2000.
- BERARDI, N.; PIZZORUSSO, T.; MAFFEI, L. Extracellular Matrix and Visual Cortical Plasticity: Freeing the Synapse. **Neuron**, v. 44, p. 905–8, 2004.
- BLAKEMORE, S.; CHOUDHURY, S. Development of the adolescent brain: implications for executive function and social. **Journal of Child Psychology and Psychiatry cognition**. v.47, n°3/4, p. 296-312, 2006.
- BLOSS, E.et al. Interactive Effects of Stress and Aging on Structural Plasticity in the Prefrontal Cortex. **The Journal of Neuroscience**. v. 30, n°19, p.6726 – 31, 2010.
- BONDI, C. O. Chronic Unpredictable Stress Induces a Cognitive Deficit and Anxiety-Like Behavior in Rats that is Prevented by Chronic Antidepressant Drug Treatment. **Neuropsychopharmacology**. v.33, p. 320–331, 2008.
- BRENHOUSE, H. C.; ANDERSEN, S.L. Developmental trajectories during adolescence in male and females: A cross-species understanding of underlying brain changes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 35, p.1687–703, 2011.
- BUSS, C.et al.The Role of Stress in Brain Development: The Gestational Environment’s Long-Term Effects on the Brain. **Cerebrum**. sp. 2012.
- CANCEDDA, L.et al. Acceleration of Visual System Development by Environmental Enrichment. **The Journal of Neuroscience**.v.24, n°20, p.4840-48, 2004.
- CASEY, B.J et al. Imaging the developing brain: what have we learned about cognitive development ? **Trends in Cognitive Sciences**.v.9, n°3, p.104-10, 2005.
- CASEY, B.J; GALVAN, A.; HARE, T. A. Changes in cerebral functional organization during cognitive development. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 15, p.239–44, 2005.
- CASEY, B.J; GIEDD, J.N.; THOMAS, K. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. **Biological Psychology**. 54, p. 241 – 57, 2000.
- CASEY, B.J; JONES, R.M.; HARE, T. A. The adolescent brain. **Annals New York Academy of Sciences**. v. 1124, p. 111–26, 2008.

CÉLIO, M. R. Perineuronal nets: past and present. **Trends in Neuroscience**. v. 21, p.510–15, 1998.

CERQUEIRA, J.J.et al. Morphological Correlates of Corticosteroid-Induced Changes in Prefrontal Cortex-Dependent Behaviors. **The Journal of Neuroscience**.v.34, p. 7792–800, 2005.

CERQUEIRA, J.J et al. The Prefrontal Cortex as a Key Target of the Maladaptive Response to Stress. **The Journal of Neuroscience**.v.27, n°11, p.2781–87, 2007.

CHIBA, S.et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. 2012.

CHRIST, S.E. et al. Inhibitory Control Across the Life Span. **Developmental neuropsychology**.v.20, n°3, p.653–69, 2001.

CHUGANI, H. T. A Critical Period of Brain Development: Studies of Cerebral Glucose Utilization with PET. **Preventive Medicine**. v.27, p. 184-88, 1998.

COLOMBO, J. The critical period concept: research, methodology, and theoretical issues. **Psychological Bulletin**. v. 91, n°. 2. p. 260-75, 1982.

COOK, S.C.; WELLMAN, C.L. Chronic Stress Alters Dendritic Morphology in Rat Medial Prefrontal Cortex. **Journal of Neurobiology**.v.60, p. 236 –48, 2004.

CREWS, F.; HE, J.; HODGE, C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 86, p. 189– 99, 2007.

CRONE, E.A. Executive functions in adolescence: inferences from brain and behavior. **Developmental Science**. v.12, n°6, p.825-30, 2009.

CRONE, E.A.; RIDDERINKHOF, R.K. The developing brain: From theory to neuroimaging and back. **Developmental Cognitive Neuroscience**. v. 1, p.101–9, 2011.

DALLEY, J.; CARDINAL, R.; ROBBINS, T.W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 28, p.771–84, 2004.

DAMÁSIO, A. D.**O erro de Descartes**. Emoção, razão e o cérebro humano. 2ed. São Paulo: Companhia das Letras. 2ed. 1996.

DEEPA, S. S.et al. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n°. 26, p. 17789 –800, 2006.

DEFELIPE, J.; ALONSO-NANCLARES, L.; ARELLANO, J.I. Microstructure of the neocortex: Comparative aspects. **Journal of Neurocytology**. v. 31, p. 299–316, 2002.

DEFELIPE, J. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. **Frontiers in Neuroanatomy**. v.5, n°29, p.1-17, 2011.

DE KLOET, E. R. Hormones and the Stressed Brain. **Annual New York Academy of Sciences**. v. 1018, p. 1–15, 2004.

DE KLOET; E. R.; JOËLS, M.; HOSLBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v.6. p.463-75, 2005.

DE VILLERS-SIDANI, E. et al. Manipulating critical period closure across different sectors of the primary auditory cortex. **Nature neuroscience**, v.11, n°8, p.957-965, 2008.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **Anual da Academia Brasileira de Ciências**. v.73, n° 2, p.211-20, 2001.

DIAS-FERREIRA, E. et al. Chronic Stress Causes Frontostriatal Reorganization and Affects Decision-Making. **Science**. v. 325, p.621-25, 2009.

DITYATEV, A.; SCHACHNER, M. The extracellular matrix and synapses. **Cell Tissue Research**. p. 326-47, 2006.

DITYATEV, A.; SCHACHNER, M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**. v.4, p.456-68, 2003.

DIVAC, I.; MOGENSEN, J. The prefrontal cortex in the pigeon: Catecholamine histofluorescence. **Neuroscience**. v. 15. p. 677-82. 1985.

DÖBRÖSSY, M. D.; DUNNET, S. B. The influence of environment and experience on neural grafts. **Nature Reviews Neuroscience**. v.2, p.871-79, 2011.

DUCCOTET, C.; GRIEBEL, G.; BELZUNG, C. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v.27, p.625 – 31, 2003.

FAISSNER, A. et al. Contributions of astrocytes to synapse formation and Maturation: Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. **Brain Research Reviews**. v.63, p. 26-38, 2010.

FELDMAN, D. Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex. **Annual Reviews of Neuroscience**. v.32, p.33-55, 2009.

FRANCI, C. R. Estresse: Processos Adaptativos e Não-Adaptativos. In: RODRIGUES-ANTUNES, J.; MOREIRA, A.C.; ELIAS, Lucila L. K.; CASTRO,

- M.**Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara & koogan, 2005, p.210-223.
- FUSTER, J. M. **Memory in the cerebral cortex**, In: A Bradford Book, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, 1995.
- FUSTER, J. M. **The prefrontal cortex: anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe**. New York:Raven Press. 3ed. 1997, 333p.
- FUSTER, J. M. Frontal lobe and cognitive development. **Journal of Neurocytology**.v.31, p.373-385, 2002.
- GABOTT, P. L.A. et al. Prefrontal Cortex in the Rat: Projections to Subcortical Autonomic, Motor, and Limbic Centers. **The Journal of Comparative Neurology**.v.492, p.145–177, 2005.
- GELFO, F.et al. Layer and regional effects of environmental enrichment on the pyramidal neuron morphology of the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**.v.91, p.353-65, 2009.
- GIEDD, J. etal. Brain development ring childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. **Nature neuroscience**. v.2, n° 10, p.861-863, 1999.
- GILBERT, S. J.; BURGUESS, P. W. Executive function. **Current Biology** v.18, n° 3, 2008.
- GOGOLLA, N.et al. Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. **Science**. v. 325, p. 1258-61, 2009
- GOGTAY, N.et al. Dynamic mapping of human cortical developmentduring childhood through early adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.v.101, n°21, p.8174-79, 2004
- GOLDMAN-RAKIC, P. S.; PORRINO, L. J. The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. **Journal of Comparative Neurology**. v. 242, p. 535-560, 1985.
- GOLDWATER, D.S. et al. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. **Neuroscience**. v.164, p. 798 – 808, 2009.
- GRAYBEAL, C.; KISELYCZNYK, C.; HOLMES, A. Stress-induced impairments in prefrontal-mediated behaviors and the role of the n-methyl- d-aspartate receptor. **Neuroscience**. v. 211. p. 28-38. 2012.
- GROENEWEGEN, H. J. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. **Neuroscience**. v. 24. p. 379-431. 1988.

- HAINS, Avis B.; ARNSTEN, F.T. Molecular mechanisms of stress-induced prefrontal cortical impairment: implications for mental illness. **Learning and memory**. v.15, p.551-64, 2008.
- HANSON, J.et al. Structural variations in prefrontal cortex mediate the relationship between early childhood stress and spatial working memory. **Journal of Neuroscience**, v.32, n°23, p. 7917-25, 2012.
- HARRIS, A.; D'EATH, R. B.; HEALY, Susan D. Environmental enrichment enhances spatial cognition in rats by reducing thigmotaxis (wall hugging) during testing. **Animal Behaviour**. v. 77, p.1459–64, 2009.
- HARTIG, W.et al. Chondroitin sulfate proteoglycan-immunoreactivity of lectin-labeled perineuronal nets around parvalbumin-containing neurons. **Brain Research**. v.635. p.307-311, 1994.
- HEBB, Donald. **The organization of behavior**. New York, Wiley, 1949.
- HEIDBREder, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**. v. 27, p. 555-79. 2003.
- HENCKENS, M.et al. Time-dependent corticosteroid modulation of prefrontal working memory processing. **Proceedings National Academy of Sciences**. v.108, n°14, p.5801-6, 2011.
- HENSCH, T.K. Controlling the critical period. **Neuroscience Research**. v.47, p.17-22, 2003.
- HENSCH, T.K. Critical period plasticity in local cortical circuits. **Nature Reviews Neuroscience**. v.6. p.7877-888, 2005
- HENSCH, T.K. Critical period regulation. **Annual Reviews of Neurosciences**.v.27, p.549–79, 2004.
- HIGLEY, M. J.; STRITTMATTER, S. M. Lynx for Braking Plasticity. **Science**. v.26, p.1189-90, 2010.
- HILL, M.N.; HILLARD, C.J.; MCEWEN, B.S. Alterations in Corticolimbic Dendritic Morphology and Emotional Behavior in Cannabinoid CB1 Receptor--Deficient Mice Parallel the Effects of Chronic Stress. **Cerebral Cortex**. v.21, p.2056—64, 2011.
- HOLMES, A.; WELLMAN, C.L. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**.v.33, p. 773–83, 2009.
- HUIZINGA; D;DOLAN, Conor; VAN DER MOLEN, M. Age-related change in executive function: Developmental trends and a latent variable analysis. **Neuropsychologia**. v.44, p. 2017–36, 2006.

JOËLS, M. et al. Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 28, p.72–96, 2007.

KARETKO, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J. Diverse functions of perineuronal nets. **Acta Neurobiology Experimental**. v.69, p.564–77, 2009.

KOLB, B. Age, experience and the changing brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.22, n°2, p.143-159, 1998.

KOLB, B. Animal models for human PFC-related disorders. **Progress Brain Research**. v.85, p.501-19, 1990.

KUBO, Ken-ichiro; NAKAJIMA, Kazunori. Cell and molecular mechanisms that control cortical layer formation in the brain. **The Keio Journal of Medicine**. v.52, p.8-20, 2003.

KWOK; J.C.F; WARREN, P.; FAWCETT, J.W. Chondroitin sulfate: A key molecule in the brain matrix. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v.44, p.582-586, 2012.

LAABS, T. et al. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. **Current Opinion in Neurobiology**. v.15, p.116–20, 2005.

LÄCK, A.K; GILL, K.E; PORRINO, L.J. Local cerebral glucose utilization in rats exposed to an enriched environment: A comparison to impoverishment. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 96, p.521–25, 2010.

LALONDE, R. The neurological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.26, p.91-104, 2002.

LEGGIO, M. G. et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioural Brain Research**. v. 163, p. 78–90, 2005.

LENROOT, R.; GIEDD, J.N. Brain development in children and adolescents: Insights from anatomical magnetic resonance imaging. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 30, p.718-29, 2006.

LENT, R. A estrutura do sistema nervoso. In: _____. **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LENT, R. Neuroplasticidade. In: _____. **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008b.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**. 2ed. São Paulo: Atheneu. 2010.

LEUNER, B; SHORS, T.J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? **Neuroscience**. sp, 2012.

LISTON, C. et al. Stress-Induced Alterations in Prefrontal Cortical Dendritic Morphology Predict Selective Impairments in Perceptual Attentional Set-Shifting. **The Journal of Neuroscience**. v. 26, n°30, p.7870–74, 2006.

LUPIEN, S.J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**. v.10, p.434-45, 2009.

LYONS; David M; PARKER, Karen J.; SCHATZERG, Alan F. Animal Models of Early Life Stress: Implications for Understanding Resilience. **Developmental Psychobiology**. v.52, p. 616-624, 2010.

MARTINEZ, R.; MORATO, S. Thigmotaxis and exploration in adult and pup rats. **Revista de etologia**. v.6, p.49-54, 2004.

MCEWEN, B.S. Protection and Damage from Acute and Chronic Stress: Allostasis and Allostatic Overload and Relevance to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders. **Annual of New York Academy Sciences**.v.1032, p.1-7, 2004.

MCEWEN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. **Dialogues Clinical Neuroscience**. v.8, p.367-381, 2006.

MCEWEN, B.S. The Ever-Changing Brain: Cellular and Molecular Mechanisms for the Effects of Stressful Experiences. **Developmental Neurobiology**. v.72, p. 878–90, 2012.

MIKA, A. et al. Chronic Stress Impairs Prefrontal Cortex-Dependent Response Inhibition and Spatial Working Memory. **Behavioral Neuroscience**.v.126, n°5, p.605-19, 2012.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annual review of neuroscience**, V.24, N°1, P.167-202, 2001.

MILLER, M.M.; MORRISON, J.H.; MCEWEN, B.S. Basal anxiety-like behavior predicts differences in dendritic morphology in the medial prefrontal cortex in two strains of rats. **Behavioural Brain Research**, v.229, p. 280-288, 2012.

MINEUR, Y.S.; BELZUNG; C.; CRUSIO, W.E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v.175, p. 43-50, 2006.

MIZOGUCHI, K. et al. Chronic Stress Induces Impairment of Spatial Working Memory Because of Prefrontal Dopaminergic Dysfunction. **The Journal of Neuroscience**. v.20, n°4, p.1568–74, 2000.

MOFFITT, T. E. et al. A gradient of childhood self-control predicts health, wealth, and public safety. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n°7, p. 2693-2698, 2011

- MONCEK, F. et al. Effect of Environmental Enrichment on Stress Related Systems in Rats. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 16, p. 423–31, 2004.
- MORISHITA, H.; HENSCH, T.K. Critical period revisited: impact on vision. **Current Opinion in Neurobiology**. V.18, p.101–7, 2008.
- MORISHITA, H. et al. Lynx1, a cholinergic brake limits plasticity in adult visual cortex. **Science**. v.26, p.1238-1240, 2010
- MOUNTCASTLE, V. B. The columnar organization of the neocortex. **Brain**. v.120, p.701-22, 1997.
- MUHAMMAD, A.; CARROL, C.; KOLB, B. Stress during development alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. **Neuroscience**. v.216, p.103-109, 2012.
- MYCHASIUK, R; GIBB, R.; KOLB, B. Prenatal Stress Alters Dendritic Morphology and Synaptic Connectivity in the Prefrontal Cortex and Hippocampus of Developing Offspring. **Synapse**. v.66, p.308-14, 2012.
- NETTER, F. et al. **Atlas of Neuroanatomy and Neurophysiology**. New Jersey: Icon Custom Communications. 2002
- NITHIANANTHA RAJAH, J.; HANNAN, A.J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**. v.7, p.697-709, 2006.
- OLIVEIRA-SOUZA, R. et al. Cognição e funções executivas. In: LENT, R. **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 2008.
- ONGUR, D.; PRICE, J.L.. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cerebral cortex**. V. 10, p.206-19, 2000.
- OPERÁRIO tem cabeça perfurada por vergalhão e sobrevive no Rio. **Folha de São Paulo**. São Paulo, 16 agost, 2012. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/1138531-operario-tem-cabeca-perfurada-por-vergalhao-e-sobrevive-no-rio-veja-imagem.shtml>. Acesso em: 16 de outubro de 2012.
- OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. **Progress in Neurobiology**. v. 48, p. 421-40, 1996.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in stereotaxic coordinates**. 4ed. San Diego: **Academic Press**. 1998, 256p.
- PELLOW, S. et al. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rats. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 14, p.149-67, 1985.

PIETROPAOLO, S. et al. Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: social versus physical enrichment. **Physiology and Behavior**. v. 81, p.443 – 53, 2004.

PIZZORUSSO, T. et al. Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. **Science**. v.298, p. 1248-51, 2002.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**. v.13, p.22-37, 2012.

PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Neural consequences of Environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**. v.10, p. 191-98, 2000.

PURVES, D. et al. **Neurociências**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

RADLEY, J.J. et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**. v.125, p.1-6, 2004;

RADLEY, J.J. et al. Repeated Stress Induces Dendritic Spine Loss in the Rat Medial Prefrontal Cortex. **Cerebral Cortex**. v.16, p.313-320, 2006.

RADLEY, J.J. et al. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. **Experimental Neurology**. v. 196, p. 199 – 203, 2005.

RADLEY, J.J.; MORRINSON, J.H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. **Ageing Research Reviews**. v.4, p.275-87, 2005.

RAKIC, P. A Century of Progress in Corticoneurogenesis: From Silver Impregnation to Genetic Engineering. **Cerebral Cortex**. v.16, p.3-17, 2006.

RAKIC, P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. **Nature Reviews Neuroscience**. v.1, p. 724-35, 2000

REITER, H.O.; STRYKER, M.P. Neural plasticity without postsynaptic action potentials: less-active inputs become dominant when kitten visual cortical cells are pharmacologically inhibited. **Proceedings of the National Academy of Science**. v.85, p.3623-3627, 1988.

RHODES, K.E; FAWCETT, J.W. Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? **Journal of Anatomy**. v.204, p.33 – 48, 2004.

ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioural Brain Research**. v. 78, p.57-65, 1996.

SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Enrich the environment to empower the brain. **Trends in Neurosciences**. v.32, n°4, p.233-34, 2009.

SALE, A et al. Enriched environment and acceleration of visual system development. **Neuropharmacology**. v.47, p.649-60, 2004

SAPER, C.B.; IVERSEN, S.; FRANCKOWIAK, R. Integration of Sensory and Motor Function: The association areas of the cerebral cortex and the cognitive capabilities of the brain. In: KANDEL, E.R.; SCHATZ, J. H.; JESSEL, T.M. **Principles of Neuroscience**. 4ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

SELYE, H. Stress and the General Adaptation Syndrome. **British Medical Journal**. p.1383-92 1950.

SENGPIEL, F. The critical period. **Current Biology**. v.17, n°17, sp, 2007.

SESACK, S. R. et al. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Journal of Comparative Neurology**. v. 290. p. 213–42. 1989.

SHANSKY, R. M.; MORRISON, J.H. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: effects of circuit, hormones and rest. **Brain Research**, v.1293, p.108-113, 2009

SHU, S.; JU, G.; FAN, L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neuroscience Letters**. v.85, p.169- 71, 1988

SIMON, P.; DUPUIS, R.; CONSTANTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioral Brain Research**. v.61, p. 59-64, 1994.

SIMONETTI, T. et al. Enrichment from Birth Accelerates the Functional and Cellular Development of a Motor Control Area in the Mouse. **Plos One**. v.4, n°8, p.1-9, 2009.

SIMPSON, J.; KELLY, J.P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats: Behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural Brain Research**. v.222, p. 246–64, 2011.

SMITH, E.E.; JONIDES, J. Storage and executive process in the frontal lobes. **Science**. v.283, p. 1657-661, 1999.

SPEAR, L. P. Adolescent brain development and animal models. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1021, p.23-26, 2004.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.24, 417–63, 2000.

SPEAR, L. P. Neurobehavioral changes in adolescence. **Current Directions in Psychological Science**. 2000b.

STURMAN, D.A.; MOGHADDAN, B. The neurobiology of adolescence: Changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.35, p.1704-12, 2011.

SUGIYAMA, S.; PROCHIANTZ, A.; HENSCH, T. From brain formation to plasticity: Insights on Otx2 homeoprotein. **Development Growth and Differentiation**. v.51, p.369–77, 2009.

SUGIYAMA, S. et al. Experience-Dependent Transfer of Otx2 homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. **Cell**. v. 134, p. 508–20, 2008.

TAU, G.Z.; PERTESON, B. Normal Development of Brain Circuits. **Neuropsychopharmacology Reviews**. v. 35, p. 147–68, 2010.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a Test for Anxiolytic Activity in Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 31, p. 959-62, 1998.

ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**.v.10, p. 397-409, 2009.

UYLINGS, H.B.M.; GROENEWEGEN, H.J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioural Brain Research**. v. 146. p. 3-17, 2003.

UYLINGS, H.B.M.; VAN EDEN, C. G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. **Progress Brain Research**. v. 85. p. 31–62. 1990.

UZIEL, D. O Desenvolvimento do cérebro e do comportamento. In: LENT, Roberto. **Neurociência da mente e do comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 2008.

WANG, D.; FAWCETT, J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. **Cell Tissue Research**. v.349, p.147 – 60, 2012.

WIESEL, T.N.; HUBEL, D.H. Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat's lateral geniculate body. **Journal of Neurophysiology**.p.978-993, 1963a.

WIESEL, T.N.; HUBEL, D.H. Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. **Journal of Neurophysiology**.p.1060-72. 1964.

WIESEL, T.N.; HUBEL, D.H. Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens. **Journal of Neurophysiology**.p.9994-1002, 1963b.

WIESEL; T.N. The postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. **Bioscience Reports**. v.2, p.351-377, 1982.

WILLIAMS, B.R. et al. Development of inhibitory control across the life span. **Development Psychology**. v.35, p.205-13, 1999.

WISE, S.P. Forward frontal fields: phylogeny and fundamental function. **Trends in Neurosciences**. v.31, n°12, p.599-608, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Adolescent Health. Disponível em http://www.who.int/maternal_child_adolescent/topics/adolescence/en/. Acesso em Junho de 2012.

YAMAGUCHI, Y. Leticans: organizers of the brain extracellular matrix. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.57, p.276–89, 2000.

YURGELUN-TODD, D..Emotional and cognitive changes during adolescence. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 17, p.251–57, 2007.

ZHANG, Z. Postnatal Development of the Mammalian Neocortex: Role of Activity Revisited. **Canadian Journal of Neurological Sciences**. v.33, p.158-69, 2006.

ANEXO

**PARECER BIO069-12**

Projeto: EFEITO DO AMBIENTE SOBRE O PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS

Coordenador(a): Prof. Dr. Antonio Pereira Jr.

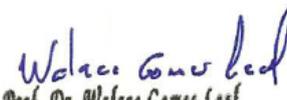
Área Temática: Biologia/Neurociências

Vigência: 10/2012 a 06/2013

Nº no CEPAE-UFPA: BIO069-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3938/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de outubro de 2012


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA