



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

**KLEBSON DE JESUS ARAUJO RODRIGUES**

**PLASTICIDADE AUMENTADA NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE  
RATOS COM A REMOÇÃO DE REDES PERINEURONAIS**

**Belém-PA  
2016**

**KLEBSON DE JESUS ARAUJO RODRIGUES**

**PLASTICIDADE AUMENTADA NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE  
RATOS COM A REMOÇÃO DE REDES PERINEURONAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como critério parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

**Área de Concentração:** Neurociências

**Linha de Pesquisa:** Córtex Pré-frontal;  
Funções Executivas;  
Neuroplasticidade; Redes  
Perineuronais.

**Orientador:** Profº Dr. Antônio Pereira  
Júnior

**Co-Orientador:** Profº Dr. Carlomagno  
Pacheco Bahia

**BELÉM – PA  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)  
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

---

Rodrigues, Klebson de Jesus Araújo

Plasticidade aumentada no córtex pré-frontal de ratos com a remoção de redes perineuronais / Klebson de Jesus Araújo Rodrigues ; Orientador, Antônio Pereira Júnior ; Co-orientador, Carlomagno Pacheco Bahia. - 2016.

77 f. : il.

Inclui bibliografia

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Plasticidade. 2. Córtex pré-frontal. 3. Funções executivas. 4. Redes perineuronais. 5. Condroitinase ABC. I. Pereira Júnior, Antônio, orientador. II. Bahia, Carlomagno Pacheco, co-orientador. III. Título.

CDD – 22 ed. 612.825

---

# **KLEBSON DE JESUS ARAUJO RODRIGUES**

## **PLASTICIDADE AUMENTADA NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE RATOS COM A REMOÇÃO DE REDES PERINEURONAIS**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como critério parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Córtex Pré-frontal; Funções Executivas; Neuroplasticidade; Redes Perineuronais.

---

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

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Vania Castro Corrêa – Membro Titular  
Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Marcelo Marques Cardoso - Membro Titular  
Instituto de Ciências da Saúde/ Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Eliã Pinheiro Botelho – Membro Titular  
Faculdade de Enfermagem / Universidade Federal do Pará.

---

Prof. Dr. Enio Maurício Nery dos Santos – Membro Suplente  
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Pará.

**BELÉM – PA**  
**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

A meus orientadores, Antônio Pereira Junior e Carlomagno Pacheco Bahia, pelo acolhimento, dedicação, ensinamentos, companheirismo e terem tornado possível a execução deste trabalho.

A todos os meus queridos amigos do Laboratório de Neuroplasticidade (LNP) que direta ou indiretamente me ajudaram; em especial para Gisele Aguiar, Mario Barbosa, Walther Augusto de Carvalho, Ivanira Dias e Susanne Fonseca.

À Universidade Federal do Pará (UFPA).

Ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (PPGNC-UFPA).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro proporcionado pela bolsa de doutorado.

A meus pais, pelo apoio, paciência e cumplicidade.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.*

Marcel Proust

## RESUMO

No processo de envelhecimento, há uma diminuição natural na plasticidade no Sistema Nervoso Central (SNC). Algumas regiões cerebrais podem ser particularmente afetadas pelo envelhecimento, como o córtex pré-frontal (CPF), que possui um papel fundamental nas funções executivas, incluindo atenção, flexibilidade cognitiva, memória de trabalho, tomada de decisão, etc. O declínio na plasticidade do CPF e do SNC como um todo pode ser atribuído principalmente pelo aparecimento de estruturas chamadas redes perineurais (RPNs) que envelopam o corpo celular e dendritos de classes específicas de neurônios. As RPNs são estruturas de matriz extracelular consistindo de proteoglicanos de sulfato de condroitina, ácido hialurônico, proteínas de ligação e tenascina, e estão envolvidos no controle da plasticidade cortical e também no encerramento do período crítico. Contudo, têm-se mostrado que a degradação das RPNs pela enzima Condroitinase ABC (ChABC) restaura formas juvenis de plasticidade no cérebro adulto por liberar os freios da plasticidade. O objetivo do presente trabalho é caracterizar o curso temporal da formação e desenvolvimento das RPNs no córtex pré-frontal medial (CPFm) de ratos. As RPNs foram marcadas com a lecitina *Vicia villosa*, que se liga a cadeias de glicosaminoglicanos presentes nas RPNs. Além disso, verificamos se a digestão localizada das RPNs no CPFm através da injeção de ChABC é capaz de abrir um novo período crítico de plasticidade e facilitar o desempenho em testes de função executiva (memória operacional). Os resultados mostraram que as RPNs no CPFm começam a surgir aos 20 DPN e amadurecem progressivamente até os 75-90 DPN. Formas exclusivamente maduras de RPNs foram observadas em animais com 5 meses de idade. Além disso, os resultados mostraram que a remoção enzimática das RPNs com ChABC promoveu melhoras no aprendizado dos testes de função executiva.

Palavras-chaves: Córtex Pré-frontal; Funções Executivas; Neuroplasticidade; Redes Perineuronais.

## ABSTRACT

Aging is associated with decreasing brain plasticity, especially after the closure of the critical periods of plasticity (a sensitive limited period in life of elevated brain plasticity). Some brain regions may be particularly affected by aging, such as prefrontal cortex (PFC), which has a key role in the organization of higher-order cognitive aspects, the executive functions, including attention, set-shifting, working memory, decision making, etc. Decline of plasticity in the PFC and the brain is attributed mainly to the appearance of a structure called perineuronal net (PNNs) which enwraps the cell body and dendrites of many classes of neurons. PNNs are extracellular matrix structures consisting of chondroitin sulfate proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin, and are involved in the control of experience-dependent cortical plasticity and the closure of critical periods. Degradation of PNNs with the enzyme Chondroitinase ABC (ChABC) restores juvenile forms of plasticity in the adult brain. Here, we examined the developmental time course of PNN formation in the medial PFC (mPFC) of male rats ranging in age from the seventh postnatal day (PND) to 11 months. We used the lectin *Vicia villosa* agglutinin that binds to glycosaminoglycan chains present in the PNNs. We also investigated whether the digestion of PNNs by bilateral injection of ChABC in the mPFC may open a new window of increased plasticity in adult rats, evaluated by two executive function tests: object recognition and spontaneous alternation. We found that immature PNNs were observed in PND 20 animals, but mature PNNs were seen only after PND 75-90 and a mature form appeared around 5 months of age. In addition, our results showed that enzymatic PNN removal promoted a significant increase in performance in the ChABC-treated animals in both behavioral tests. The present study reveals for the first time the temporal development of PNN formation in the rat mPFC. We also show that the degradation of PNNs with ChABC not only promotes plasticity but also potentiates cognitive abilities in adult animals.

Key words: Prefrontal Cortex; Executive Functions; Neuroplasticity; Perineuronal nets.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

BSA: albumina do soro bovino

ChABC: condroitinase ABC

CPF: córtex pré-frontal

CPFm: córtex pré-frontal medial

DPN: dias pós-natal

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

GAGs: glicosaminoglicanos

GND: glicose oxidase- níquel-diaminobenzidina

HAPLNs: *hyaluronan and proteoglycan link proteins*

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

LTD: depressão de longo prazo

MEC: matriz extracelular

PB: tampão fosfato

RPNs: redes perineuronais

SNC: sistema nervoso central

UFPA: Universidade Federal do Pará

Vv: *Vicia villosa*

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Desenho esquemático mostrando regiões e subdivisões do córtex pré-frontal de ratos.....	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Comparação entre córtex pré-frontal de ratos e humanos.....	<b>17</b>
<b>Figura 3.</b> Componentes dos proteoglicanos.....	<b>22</b>
<b>Figura 4.</b> Estrutura esquemática das lecticanas, família dos proteoglicanos de sulfato de condroitina.....	<b>23</b>
<b>Figura 5.</b> Modelo hipotético da configuração da MEC no SNC.....	<b>24</b>
<b>Figura 6.</b> Ilustrações das redes perineuronais feitas por Camillo Golgi e Santiago Ramón y Cajal.....	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografia mostrando padrão de marcação de RPNs.....	<b>26</b>
<b>Figura 8.</b> Representações esquemáticas da MEC e da rede perineuronal.....	<b>27</b>
<b>Figura 9.</b> Desenho esquemático representando a ação da enzima ChABC.....	<b>30</b>
<b>Figura 10.</b> Desenho experimental.....	<b>34</b>
<b>Figura 11.</b> Desenhos esquemáticos mostrando o procedimento de aplicação da enzima.....	<b>37</b>
<b>Figura 12.</b> Esquema da arena do reconhecimento de objeto.....	<b>39</b>
<b>Figura 13.</b> Esquema do labirinto em cruz.....	<b>40</b>
<b>Figura 14.</b> Obtenção de secções histológicas em criostato.....	<b>43</b>
<b>Figura 15:</b> Análise estereológica.....	<b>45</b>
<b>Figura 16.</b> RPNs em ratos jovens, adultos e idosos. ....	<b>47</b>
<b>Figura 17.</b> Análise quantitativa do desenvolvimento das RPNs. ....	<b>48</b>
<b>Figura 18.</b> Teste de reconhecimento de objetos.....	<b>50</b>
<b>Figura 19.</b> Teste da alternância espontânea. ....	<b>51</b>
<b>Figura 20.</b> Teste da atividade locomotora. ....	<b>51</b>
<b>Figura 21.</b> Áreas de degradação das RPNs. ....	<b>52</b>
<b>Figura 22.</b> Micróglia no córtex pré-frontal de ratos adultos. ....	<b>53</b>
<b>Figura 23.</b> Astrócitos no córtex pré-frontal de ratos adultos. ....	<b>53</b>
<b>Figura 24.</b> Microgliose no córtex pré-frontal medial após ação da ChABC. ....	<b>54</b>
<b>Figura 25.</b> Astrogliose no córtex pré-frontal medial após ação da ChABC. ....	<b>54</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS PARA HISTOQUÍMICA.....	<b>34</b>
<b>Tabela 2.</b> CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS PARA TESTE COMPORTAMENTAL E HISTOLOGIA.....	<b>35</b>

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
2.1 DIVISÕES DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL	14
2.1.1. Funções do córtex pré-frontal	15
2.1.2. Memória de trabalho	17
2.2. PLASTICIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	18
2.3. A MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) NO SNC	21
2.3.1. Proteoglicanos de sulfato de condroitina: estrutura, isoformas e distribuição	21
2.3.2. Funções biológicas das lecticanas	24
2.3.3. Matriz extracelular, redes perineuronais e plasticidade neuronal	25
2.4. A ENZIMA CONDROITINASE ABC: SUPERANDO A INIBIÇÃO DA PLASTICIDADE PROVOCADA PELOS PROTEOGLICANOS DE SULFATO DE CONDROITINA	29
<b>3. HIPÓTESE EXPERIMENTAL</b>	<b>31</b>
<b>4. JUSTIFICATIVA</b>	<b>31</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
5.1. OBJETIVO GERAL	32
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
6.1. ANIMAIS	33
6.2. DESENHO EXPERIMENTAL	33
6.3. AMADURECIMENTO DAS REDES PERINEURONAIS	34
6.4. CIRURGIA PARA A APLICAÇÃO DA ENZIMA ChABC E DEFINIÇÃO DE GRUPOS COMPORTAMENTAIS	35
6.4.1. Anestesia	35
6.4.2. Procedimentos cirúrgicos	36
6.4.3. Teste do reconhecimento de objetos	37
6.4.3.1 Análise estatística	39
6.4.4. Teste da alternância espontânea	39
6.4.4.1 Análise estatística	41
6.4.5. Atividade locomotora em campo aberto	41
6.4.5.1 Análise estatística	42
6.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	42
6.5.1. Perfusão intracardiaca e secções histológicas	42
6.5.2. Histoquímica para marcação das RPNs com lecitina <i>Vicia villosa</i>	43
6.5.3. Imunohistoquímica para astrócitos e micrólia	44

<b>6.5.4. Desidratação e montagem das lâminas</b> .....	44
6.6. ESTEREOLOGIA .....	45
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
7.1. SURGIMENTO E ETAPAS DE MATURAÇÃO DAS RPNs NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL .....	46
7.2. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS .....	49
<b>7.2.1. Reconhecimento de objetos</b> .....	49
<b>7.2.2. Alternância espontânea</b> .....	50
<b>7.2.3. Atividade Locomotora</b> .....	51
7.3. ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	52
<b>7.3.1. Degradação de RPNs após ação da ChABC</b> .....	52
<b>7.3.2. Micróglia e astrócitos no córtex pré-frontal após ação da ChABC</b> .....	52
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
8.1. AMADURECIMENTO DAS RPNs E FECHAMENTO DO PERÍODO CRÍTICO DE PLASTICIDADE NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL.....	55
8.2. REMOÇÃO DAS RPNs NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL: INDUZINDO PLASTICIDADE AUMENTADA.....	57
8.3. ASTRÓCITOS E MICRÓGLIAS APÓS REMOÇÃO ENZIMÁTICA DAS RPNs NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL.....	61
<b>9. CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>10. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As emoções, inteligência, capacidade de aprendizagem e de lembrar dependem da complexidade e funcionamento de conexões em cerca de 90 bilhões de células nervosas nos seres humanos. A modificação dos padrões de conexão entre os neurônios, a formação e extinção de contatos sinápticos, etc, são manifestações de plasticidade que mudam a circuitaria encefálica em maior ou menor grau.

O intervalo de tempo no início da vida de um indivíduo em que a plasticidade sináptica está mais aumentada é conhecido como período crítico de plasticidade (LEBLANC & FAGIOLINI, 2011; SELEMON, 2013). É neste período em questão que as conexões e rearranjos sinápticos se dão com maior dinamismo, pois os vários sistemas sensoriais, motor e associativo estão mais receptíveis e suscetíveis aos estímulos, principalmente do ambiente externo, e se modificam, sofrem refinamento, em resposta aos estímulos (LEBLANC & FAGIOLINI, 2011; SELEMON, 2013).

Desta forma, a dinâmica desses eventos plásticos, embora sempre presentes ao longo de toda a vida, não são constantes na medida em que são mais robustos em idades precoces de um indivíduo para em seguida apresentar num declínio gradual em idades avançadas (GREENWOOD & PARASURAMAN, 2010; FERNÁNDEZ-BALLESTEROS *et al*, 2012), justificando as limitações cognitivas observadas em indivíduos mais velhos.

Haveria, então, uma maneira de aumentar o poder cognitivo de um indivíduo? Em outras palavras, existiria a possibilidade de se resgatar ou criar uma nova oportunidade de plasticidade aumentada em um indivíduo adulto, similar ao visto no período crítico de plasticidade do começo do desenvolvimento pós-natal?

Neste trabalho considera-se a possibilidade de se criar um novo período de plasticidade neuronal aumentada numa região especificamente devotada às funções cognitivas especiais, o córtex pré-frontal, região do polo frontal do cérebro que é foco de muitos estudos e bem conhecida por ser crucial em gerar comportamentos que norteiam a vida dos mamíferos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O córtex pré-frontal (CPF) está localizada na região do polo anterior do encéfalo dos mamíferos (BADRE & D'ESPOSITO, 2009). É a região cortical que mais se expandiu no curso da evolução dos mamíferos, ocupando um terço de todo o neocórtex em humanos (FUSTER, 2002 A). Também é a região com amadurecimento mais demorado do córtex cerebral (FUSTER, 2002 A, 2013; KOLB *et al*, 2012).

O CPF possui conexões com todas as áreas corticais e com uma vasta gama de estruturas subcorticais (BARBAS, 2000; MORGANE *et al.*, 2005; KOLB *et al*, 2012). Essas conexões proporcionam o suporte necessário para gerenciar e sintetizar informações necessárias para a realização de comportamentos complexos (MILLER, 2000).

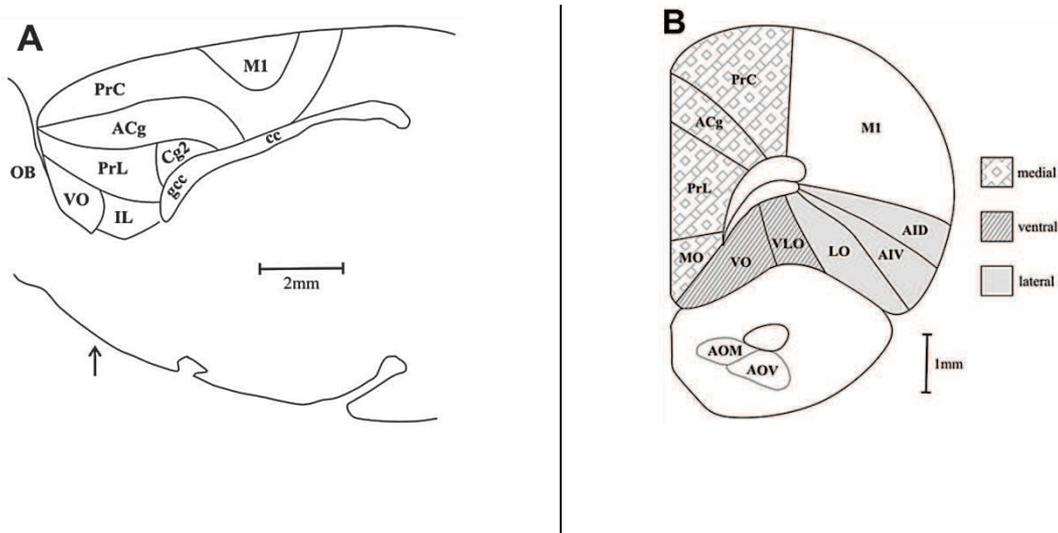
### 2.1 DIVISÕES DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

Além de critérios citoarquitetônicos, o CPF de mamíferos é delimitado baseando-se em critérios de conectividade com o núcleo talâmico mediodorsal (RAY & PRICE, 1992), com aferências de fibras dopaminérgicas provenientes do mesencéfalo ventral, ou ainda uma combinação desses critérios (UYLINGS & VAN EDEN, 1990; WILLIAMS & GOLDMAN-RAKIC, 1998).

Assim, em primatas, o CPF consiste em várias áreas anatomicamente distintas (CARMICHAEL & PRICE, 1994) segregadas nas regiões dorsolateral, medial e orbital do CPF (FUSTER, 2000).

O CPF dorsolateral é o córtex da convexidade dorsal e lateral da porção anterior do lobo frontal, referente à área citoarquitetônica de Brodmann (1909) 46, e às regiões laterais das áreas 8, 9, 10, e 11. Por sua vez, o CPF medial é uma região quase plana e está adjacente à superfície medial do polo frontal contralateral, correspondendo às áreas 12, 24 e 32, além de partes das áreas 8, 9, 10 e 11 de Brodmann. Por fim, o CPF orbital, ligeiramente côncavo e localizado diretamente acima da órbita, condizentes com as áreas 13, 47, e partes inferiores de 10, 11 e 13 (FUSTER, 2002 B).

No rato, modelo experimental do presente estudo, também existem propostas para a divisão do CPF. Por exemplo, Dalley e colaboradores (2004) sugeriram a existência de três regiões principais (Figura 1): o CPF medial, ventral e lateral.



**Figura 1. Desenho esquemático mostrando regiões e subdivisões do córtex pré-frontal de ratos.** A: vista em um plano sagital; B: vista em um plano coronal, cujo ponto da secção está indicado pela seta assinalada na em A. Legenda: ACg: córtex cingulado anterior; AID: córtex insular agranular dorsal; AIV: córtex insular agranular ventral; AOM: núcleo olfatório anterior medial; AOV: núcleo olfatório anterior ventral; cc: corpo caloso; Cg2: área 2 do córtex cingulado; gcc: joelho do corpo caloso; IL: córtex infralímbico; LO: córtex orbital lateral; M1: área motora primária; MO: córtex orbital medial; OB: bulbo olfatório; PrC: córtex pré-central; PrL: córtex pré-límbico; VLO: córtex orbital ventro-lateral; VO: córtex orbital ventral. *Fonte: Adaptado de Dalley et al. (2004).*

### 2.1.1 Funções do córtex pré-frontal

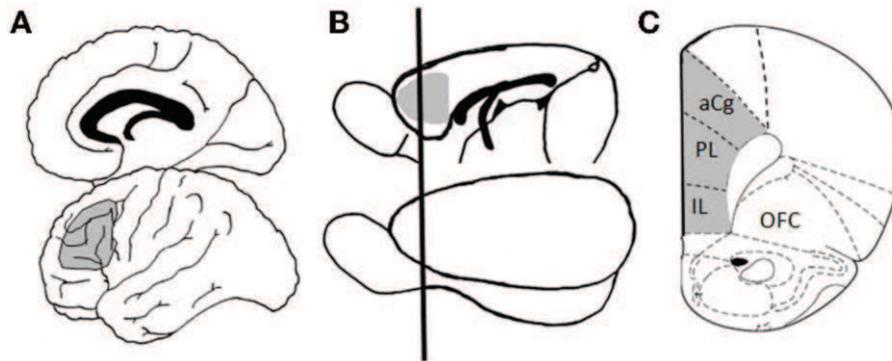
As funções do CPF foram inicialmente inferidas a partir dos efeitos decorrentes de lesões afetando esta região. O caso mais conhecido é o do norte-americano Phineas Gage, que apresentou alterações cognitivas, afetivas e emocionais após um bizarro acidente ocorrido na metade do século XIX e que destruiu principalmente a região do córtex orbitofrontal (DAMASIO *et al.*, 1994). Uma das características mais marcantes das mudanças apresentadas por Phineas Gage foi uma clara desinibição comportamental, revelada em comportamentos antissociais como uma libido aumentada, agressividade exacerbada, etc.

Estudos subsequentes dão conta de que o CPF possui papel crucial na organização de processos cognitivos necessários para o desempenho comportamental em situações complexas: são os aspectos cognitivos enquadrados nas funções executivas, incluindo atenção, memória de trabalho e outras mais, como inibição do comportamento e flexibilidade cognitiva, todas exigindo uma interação dinâmica entre várias regiões cerebrais (TANJI & HOSHI, 2001).

Embora as funções executivas tenham sido objeto de vários estudos, ainda não existe uma definição precisa e unânime sobre esse atributo cognitivo. Contudo, a maioria dos pesquisadores concorda que as funções executivas se referem a processos cognitivos de alto nível que organizam e regulam o comportamento do indivíduo. Portanto, o CPF é efetivo quando permitem que o indivíduo se adapte eficientemente às mudanças contínuas no ambiente (BADDELEY, 1986; SMITH & JONIDES, 1999; MONSELL *et al.*, 2003).

As funções executivas são essenciais para o sucesso pessoal em várias fases da vida do indivíduo em sociedade, incluindo os anos escolares. As habilidades básicas dependentes das funções executivas são o controle inibitório (resistência a hábitos, tentações, ou distrações), monitoramento e atualização de memória de trabalho, e flexibilidade cognitiva (adaptação a mudanças) (SMITH & JONIDES, 1999; Monette *et al.*, 2011), trabalhando em conjunto para a perfeita execução de uma determinada tarefa. No entanto, vários são os estudos na literatura que enfatizam e atestam a importância que a memória de trabalho desempenha nas funções executivas (LOGIE, 2011; SALMINEN *et al.*, 2012; MONETTE *et al.*, 2011).

Uma questão inicial na literatura referia-se à existência de homólogos do CPF em roedores. Com o intuito de contribuir para elucidar essa questão, Uylings e colaboradores (2003) realizaram estudos comparativos entre o CPF de primatas e roedores, encontrando-se homologia entre o CPF dorsolateral de primatas, incluindo humanos, com a região de CPF medial de roedores (Figura 2).



**Figura 2. Comparação entre córtex pré-frontal de ratos e humanos.** Córtex pré-frontal de humanos (A) e de ratos (B & C) que encerram homologia de função entre si. A região em cinza delimitada em “A” corresponde à área 46 de Brodmann, e seu correlato visto em “B” e “C”, evidenciando o córtex pré-frontal medial no rato e dorsolateral nos humanos. A linha vertical em “B” determina o plano de secção coronal e a posição do corte com visualização frontal no esquema em “C”. Abreviaturas: aCg: córtex cingulado anterior; PL: córtex pré-límbico; IL: córtex infralímbico; OFC: córtex orbito-frontal. Fonte: Retirado de Bizon et al. (2012).

### 2.1.2 Memória de trabalho

Para Baddeley & Logie (1999), a memória de trabalho é um mecanismo que “permite aos seres humanos compreender e representar mentalmente seu ambiente imediato, reter as informações sobre a sua experiência do passado imediato, sustentar a aquisição de novos conhecimentos, resolver problemas e formular, relacionar e agir sobre os objetivos atuais”. Kieras e colaboradores descreveram a memória de trabalho como sendo um mecanismo que “envolve todo o conjunto de códigos temporários armazenados, representações de conhecimentos e procedimentos, segundo o qual, a informação é mantida, atualizada e aplicada para a realização de tarefas motoras e cognitivas” (KIERAS *et al.*, 1999).

Por exemplo, imagina-se a situação de quando comparamos um objeto com outros recém-apresentados para decidir se são semelhantes ou não, ou quando realizamos cálculos de multiplicação mentalmente com números com mais de 1 dígito, por exemplo “3 multiplicado por 18”, estamos fazendo uso da memória de trabalho. Este atributo cognitivo utiliza mecanismos de armazenamento temporário de informação, envolvendo manipulação ativa pelo indivíduo (EICHENBAUM & COHEN, 2001; FUNAHASHI, 2001).

As informações armazenadas na memória de trabalho precisam ser substituídas, processadas ou atualizadas de forma flexível. Ou melhor, é uma memória de curta duração que, uma vez utilizada, é esquecida ou ignorada. Assim, em uma situação de ensaio experimental com murinos, é útil para o rato lembrar quais braços de um labirinto acabou de visitar, em uma tarefa em execução, ou lembrar a posição de objetos numa arena.

Estas memórias podem ser acessadas através de testes comportamentais específicos em animais de experimentação, como os testes de reconhecimento de objetos. A memória de reconhecimento exige julgamentos da ocorrência de um estímulo recém-apresentado para com outro, com base na familiaridade relativa de objetos individuais, ou também por integrar as informações sobre objetos e sua localização, dentre outros (BARKER *et al.*, 2007).

Barker *et al*, 2007, e mais recentemente Cross *et al* (2012), em uma série de experimentos com lesões em áreas específicas do encéfalo de ratos, demonstraram que danos no córtex pré-frontal medial (CPFm) de ratos são particularmente lesivos em testes de memória. Assim, em ratos, percebe-se que a base anatômica e funcional da memória de trabalho é o CPFm.

Essas funções cognitivas, tão importantes para a vida diária, podem sofrer alterações ao longo do tempo, num processo natural que envolve modificações na plasticidade sináptica.

## 2.2 PLASTICIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Em um passado não muito distante, o cérebro adulto era considerado imutável. Contudo, nas últimas décadas mostrou-se que o Sistema Nervoso Central (SNC) adulto também é plástico, ou seja, sofre mudanças como resultado das experiências. O encéfalo adulto, mais especificamente o córtex cerebral, é agora considerado uma estrutura morfológica e funcionalmente dinâmica, influenciada pelo ambiente e constituído por um sistema interativo glio-neuro-sináptico (DUFFAU, 2006).

Segundo Duffau (2006), plasticidade cerebral é um processo contínuo que permite o remodelamento do mapa sináptico a curto, médio e longo prazo, como maneira de aperfeiçoar o funcionamento das redes cerebrais. Duffau também demonstra que a plasticidade desempenha um papel fundamental durante a elaboração de novos circuitos.

Compreender a plasticidade no encéfalo é de extrema importância para entender o desenvolvimento do sistema nervoso e também porque pode permitir o desenvolvimento de técnicas para induzir a regeneração do cérebro lesionado (KOLB *et al.*, 2003), ou potencializar funções específicas sem lesão.

À medida que o encéfalo amadurece e principalmente após o final de um intervalo de tempo denominado período crítico de plasticidade, ocorre uma diminuição acentuada da capacidade plástica no SNC de qualquer indivíduo. O período crítico é um momento limitado no início da vida em que o cérebro do indivíduo torna-se mais susceptível a estímulos e influências do ambiente do que em qualquer outra fase da vida (HENSCH, 2004; LEBLANC & FAGIOLINI, 2011; SELEMON, 2013).

Talvez fosse mais adequado dizer “períodos críticos”, pois para cada região do encéfalo existe uma espécie de “gradiente ou cascata de períodos críticos” (HENSCH, 2004; LEBLANC & FAGIOLINI, 2011). Isso quer dizer que a superposição nos períodos críticos de plasticidade de várias áreas corticais não é uma regra. Mas, independente da região ou sistema cerebral, esses eventos iniciam e terminam em fases precoces da vida. É justamente durante o período crítico o melhor momento para alguns tipos de aprendizagem como, por exemplo, aprender novos idiomas de forma rápida e fluente, alargar o vocabulário linguístico, iniciar em esportes de maior exigência em desempenho, etc (LEBLANC & FAGIOLINI, 2011).

Várias linhas de evidência demonstraram que o desenvolvimento de uma classe de neurônios inibitórios em particular, expressando a proteína parvalbumina de ligação ao cálcio, os neurônios parvalbumina positivos, desempenha um papel essencial no controle da plasticidade nos períodos críticos no SNC (YAZAKI-SUGIYAMA *et al.*, 2009; NABEL & MORISHITA, 2013; TAKESIAN & HENSCH, 2013). A maturação dos neurônios parvalbumina positivos em interneurônios GABAérgicos contribui para a abertura e

encerramento do período crítico de plasticidade (NABEL & MORISHITA, 2013; TAKESIAN & HENSCH, 2013).

Assim, após o período crítico, há um declínio gradativo e natural dos eventos plásticos nas diferentes regiões encefálicas, embora estes não cessem (HÜBENER & BONHOEFFER, 2014). A causa é decorrente de uma combinação de fatores associados, em grande parte, com o meio extracelular no SNC, como a presença de componentes da Matriz Extracelular (MEC), composta de moléculas amorfas com as quais os neurônios e células gliais interagem, e isso pode ter influência importante sobre muitos aspectos do comportamento de uma célula neuronal (RHODES & FAWCETT, 2004; VIVO *et al*, 2013).

## 2.3 A MATRIZ EXTRACELULAR NO SNC

Apesar das descrições por Camillo Golgi e Santiago Ramón y Cajal, na virada do século XIX para o século XX (BONNEH-BARKAY & WILEY, 2009), até antes da década de 1970 aceitava-se que o tecido nervoso era totalmente encerrado por neurônios e células gliais e, portanto, nenhuma quantidade apreciável de "estroma" ou MEC poderia existir no cérebro. Essa visão foi posteriormente alterada pela descoberta de quantidades significativas de espaço extracelular preenchido com materiais da MEC (TANI & AMETANI, 1971).

Várias tecnologias têm sido usadas para gradualmente revisar esta teoria e acomodar a ideia da presença de uma variedade de moléculas de MEC preenchendo uma quantidade significativa do espaço desta matriz (YAMAGUCHI, 2000).

O SNC em maturação representa um conjunto progressivamente mais complexo e compacto de células e prolongamentos celulares (dendritos, axônios), onde o espaço extracelular da MEC torna-se condensado e perfaz cerca de 20% do volume do tecido (NICHOLSON e SYKOVA, 1998). Muitas das moléculas da MEC são exclusivas do SNC (RAUCH, 2007).

Componentes comuns da MEC de outros tecidos, a exemplo defibronectina e colágeno, são virtualmente ausentes na MEC no encéfalo adulto, enquanto que diferentes tipos de glicoproteínas e proteoglicanos, dentre outros, são abundantemente expressos no tecido nervoso adulto e estão localizados em espaços intercelulares entre os neurônios e células gliais (RAUCH *et al.*, 2005; BONNEH-BARKAY & WILEY, 2009).

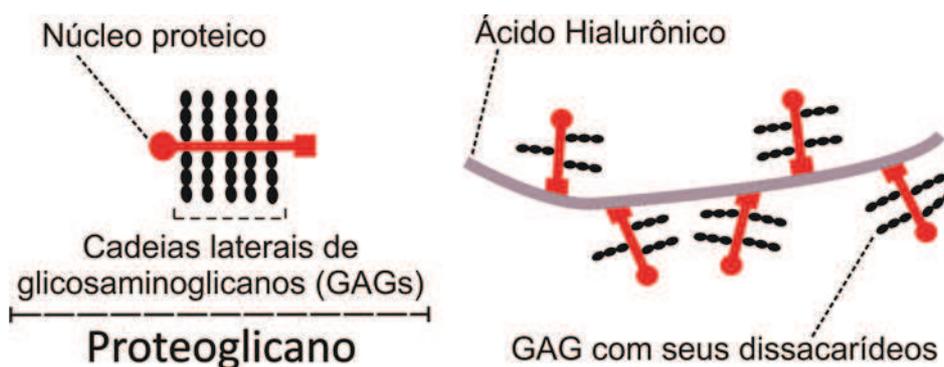
### 2.3.1 Proteoglicanos de sulfato de condroitina: estrutura, isoformas e distribuição

Os proteoglicanos abrangem uma grande variedade de moléculas complexas encontradas em todos os tipos de tecidos. Os proteoglicanos têm sido associados a um grande número de funções celulares, incluindo adesão, crescimento e migração celular; ligação a receptor; formação de barreira e

interação com outros constituintes da MEC (BANDTLOW & ZIMMERMANN, 2000; YAMAGUCHI, 2000).

Os proteoglicanos são longas cadeias de açúcar de glicosaminoglicanos (GAGs), ligadas covalentemente a um núcleo proteico (Figura 3). Os GAGs são polímeros não ramificados de dissacarídeos que se repetem (de 2-20 vezes), com a participação de dois monossacarídeos que se alternam: normalmente o açúcar é um ácido urônico (glicurônico - GluA ou idurônico - IdoA); o outro monossacarídeo é a N-acetilglicosamina (GlcNAc) ou N-acetilgalactosamina (GalNAc) (RHODES & FAWCETT, 2004; ZIMMERMANN & DOURS-ZIMMERMANN, 2008; BONNEH-BARKAY & WILEY, 2009). Assim, o comprimento das cadeias dos GAGs pode variar e o núcleo proteico em si pode ter várias cadeias de GAGs inseridas – de uma a até mais de 100, resultando em um conjunto diversificado de proteoglicanos (RHODES & FAWCETT, 2004).

A abundância de proteoglicanos no tecido nervoso que se ligam ao ácido hialurônico, também conhecido como hialuronana ou hialuronato (Figura 3), sugere que a organização da MEC seja formada principalmente pela agregação de filamentos centrais do ácido hialurônico com os proteoglicanos associados (RUOSLAHTI, 1996; YAMAGUCHI, 2000; RAUCH, 2004).

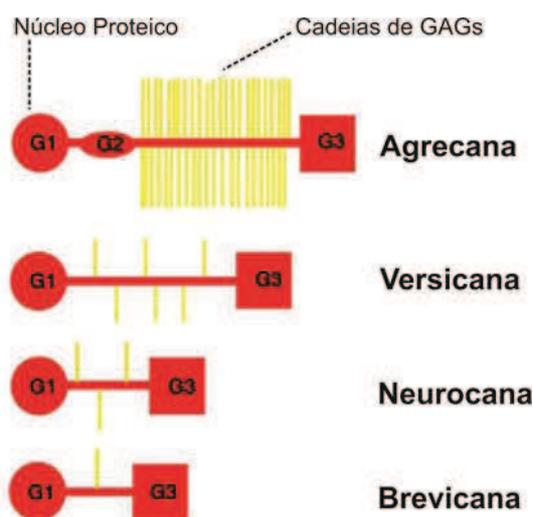


**Figura 3. Componentes dos proteoglicanos.** Desenho esquemático mostrando os componentes dos proteoglicanos e sua relação com o ácido hialurônico. *Fonte: Autoral. Baseado em descrições de Ruoslahti, 1996; Yamaguchi, 2000 e Rauch, 2004.*

Os GAGs têm propriedades físicas notáveis atribuíveis à abundância de grupos carboxila, hidroxila e sulfato que, consoante à composição de seus

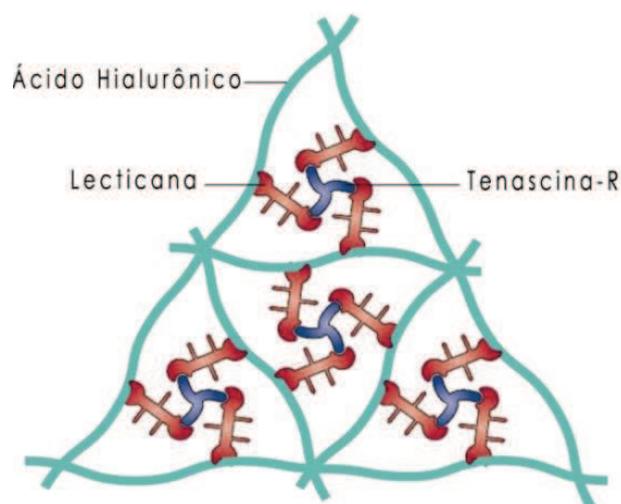
dissacarídeos, as definem como: sulfato de -condroitina, -dermatana, -queratana e -heparana (BONNEH-BARKAY & WILEY, 2009; ROZARIO & DESIMONE, 2010).

O sulfato de condroitina e o sulfato de heparana compõem a maioria dos proteoglicanos do SNC (BONNEH-BARKAY & WILEY, 2009). Contudo, por motivos não bem elucidados, o SNC é particularmente rico em proteoglicanos de sulfato de condroitina, no sentido em que muitos núcleos proteicos diferentes carregam cadeias GAGs de sulfato de condroitina (CRESPO *et al.*, 2007). Os principais proteoglicanos de sulfato de condroitina no SNC são os quatro membros da família lecticana (também chamado hialectana): agrecana, versicana, neurocana, e brevicana (RAUCH *et al.*, 1991; ASHER *et al.*, 1995; YAMADA *et al.*, 1997; SCHMALFELDT *et al.*, 1998) (Figura 4).



**Figura 4. Estrutura esquemática das lecticanas, família dos proteoglicanos de sulfato de condroitina.** G1, G2 e G3 referem-se aos domínios globulares dos núcleos proteicos; GAGs: glicosaminoglicanos. Fonte: Adaptado de Galtrey & Fawcett (2007).

A interação entre o ácido hialurônico e lecticanas é reforçada por proteínas de ligação de pequeno porte, coletivamente denominados HAPLNs (do inglês: *hyaluronan and proteoglycan link proteins*) (SPICER *et al.*, 2003). A glicoproteína trimérica Tenascina-R, outra macromolécula da MEC, interage com o domínio C-terminal de todas as quatro lecticanas presentes em mamíferos (RAUCH, 2004; RAUCH *et al.*, 2005), ajudando a estabilizar ligações e possibilitar uma estrutura tridimensional ao conjunto (Figura 5).



**Figura 5. Modelo hipotético da configuração da MEC no SNC.** Fonte: Adaptado de Dityatev & Schachner (2003).

Em fases iniciais do desenvolvimento pós-natal do SNC de roedores, os proteoglicanos de sulfato de condroitina estão presentes em abundância no tecido nervoso (MARGOLIS *et al.*, 1975; RAUCH *et al.*, 1991; BAHIA *et al.*, 2008). Durante o primeiro mês pós-natal, foi demonstrada uma elevação abrupta de GAGs sulfatados, em particular sulfato de condroitina, com aumento de 90% em 24 horas (BURKART & WIESMANN, 1987).

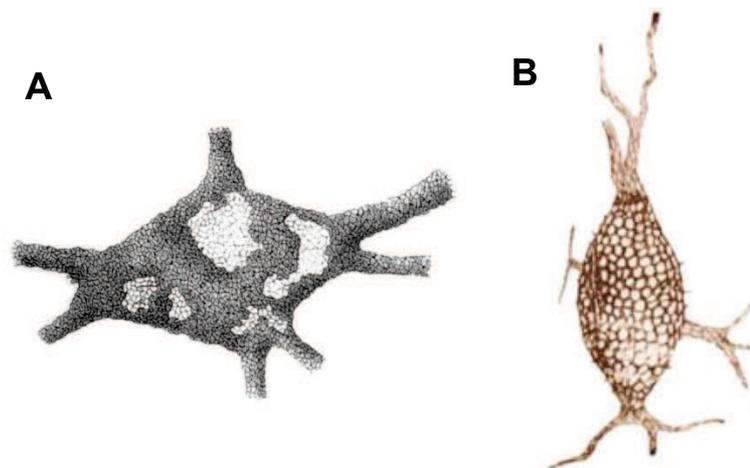
### 2.3.2 Funções biológicas das lectinanas

A MEC do SNC é organizada não apenas para fornecer suporte físico, mas também para apoiar as funções homeostáticas cruciais para a sobrevivência de neurônios. Além de controlar um grande número de moléculas de sinalização celular, a MEC pode tamponar íons e neurotransmissores associados com a atividade sináptica (BONNEH-BARKAY e WILEY, 2009; SOLEMAN *et al.*, 2013). Muitas das propriedades funcionais dos proteoglicanos no SNC são atribuídas às cadeias laterais associadas e boa parte da interação entre proteoglicanos e receptores da superfície celular, ou proteínas da MEC, ocorre por meio de sítios de ligação nas cadeias das GAGs, embora o núcleo proteico em si também seja capaz de se ligar a substratos (BANDTLOW & ZIMMERMANN, 2000).

### 2.3.3 Matriz extracelular, redes perineuronais e plasticidade neuronal

Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do crescimento dos prolongamentos neuronais ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que o ambiente extrínseco pode promover ou limitar o crescimento de neuritos (PROPERZI *et al.*, 2003), na medida em que diversos estudos têm demonstrado que os proteoglicanos de sulfato de condroitina atuam como uma barreira ao crescimento de neuritos (SMITH-THOMAS *et al.*, 1994; YAMADA *et al.*, 1997; SCHMALFELDT *et al.*, 2000; DE VIVO *et al.*, 2013). Essa ação é mediada principalmente pelas GAGs (PROPERZI *et al.*, 2003). Por exemplo, foi demonstrado *in vitro* que a remoção de sulfato de condroitina promove crescimento axonal (BRITTIS *et al.*, 1992).

Por conseguinte, uma estrutura diferenciada e compacta de MEC, conhecida como Rede Perineuronal (RPN) tem sido apontada como um dos principais freios que limita a capacidade plástica do SNC, por conter inúmeras macromoléculas, como os proteoglicanos de sulfato de condroitina, na sua composição. Primeiramente descritas por cientistas como Camilo Golgi e Santiago Ramón y Cajal (Figura 6), no final do século XIX (CELIO *et al.*, 1998), tal como uma luva que recobre a mão e os dedos, as RPNs formam uma trama envolvendo os corpos celulares, os dendritos proximais e os segmentos iniciais dos axônios de subgrupos específicos de neurônios (CELIO *et al.*, 1998; RHODES & FAWCETT, 2004; BRÜCKNER *et al.*, 2006; GALTREY & FAWCETT, 2007). Estes subgrupos de neurônios envelopados pelas RPNs são principalmente os interneurônios GABAérgicos implicados no fechamento do período crítico de plasticidade (CABUNGCAL *et al.*, 2013; NABEL & MORISHITA, 2013; TAKESIAN & HENSCH, 2013).



**Figura 6. Ilustrações das redes perineuronais feitas por Camillo Golgi e Santiago Ramón y Cajal.** Os registros de Golgi (A) e Cajal (B) são do final do século XIX. *Fonte: Adaptado de Yamaguchi (2000) e Celio et al. (1998).*

As RPNs são o resultado da deposição de moléculas da MEC em torno principalmente dos corpos neuronais (RHODES & FAWCETT, 2004), moléculas que incluem lectinas, ácido hialurônico, tenascina-C e tenascina-R. Todas as quatro lectinas já foram detectadas nas RPNs (BRÜCKNER *et al.*, 1998; MATSUI *et al.*, 1998; MATTHEWS *et al.*, 2002).

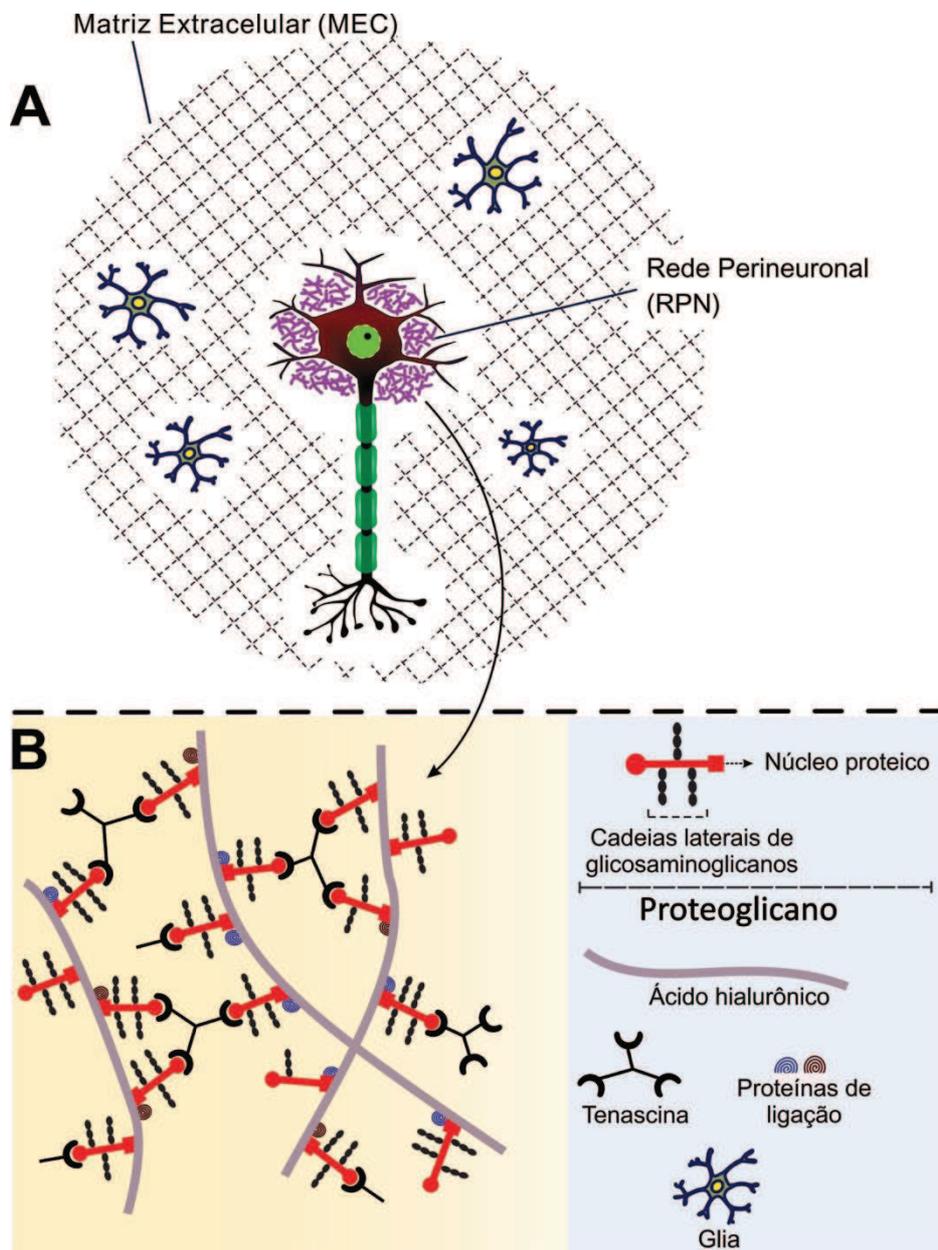
Existem várias estratégias histológicas para visualizar as RPNs em tecido nervoso e a utilização de lectinas extraídas de plantas é uma delas, como, por exemplo, a *Vicia villosa* (Vv) e *Wisteria floribunda*. Moléculas destas plantas são capazes de se ligar a açúcares dos proteoglicanos presentes nas RPNs, evidenciando um padrão de marcação (Figura 7).



**Figura 7. Fotomicrografia mostrando padrão de marcação de RPNs.**

RPNs no subcampo posteromedial de barril do córtex somatosensorial primário de ratos, evidenciados por histoquímica com Vv (algumas RPNs são mostradas pelas setas). *Fonte: Adaptado de Bahia et al. (2008).*

Os neurônios e células gliais contribuem para a produção e deposição das substâncias que formam as RPNs (CELIO & BLUMCKE, 1994). Um esquema ilustrativo das RPNs, com seus constituintes, é visto na Figura 8.



**Figura 8. Representações esquemáticas da MEC e da rede perineuronal.** A MEC e RPN são vistos em **A**, com os detalhes de seus constituintes em **B**. Fonte: Autoral, baseado em Barthus et al, 2012 ; 2004, Galtrey et al, 2007; Yamaguchi et al 2000.

A formação das RPNs ocorre relativamente tarde no desenvolvimento pós-natal (em roedores, cerca de 2-5 semanas após o nascimento) e coincide com o término do período crítico de plasticidade, em áreas como os sistemas somatosensorial e visual, por exemplo (KALB & HOCKFIELD, 1990; PIZZORUSSO *et al.*, 2002; BAHIA *et al.*, 2008; SOLEMAN *et al.*, 2013).

Acredita-se que o complexo ácido hialurônico-lecticanas-tenascina, depositado na superfície neuronal, possa formar uma capa ou barreira repulsiva contra axônios e dendritos que ali se aproximem (BONNEH-BARKAY & WILEY, 2009).

Muito embora o papel fisiológico das RPNs ainda não tenha sido totalmente elucidado, o seu aparecimento pós-natal sugere uma ação no sentido de estabilizar o circuito neuronal, suprimindo a formação de novos contatos sinápticos (HOCKFIELD *et al.*, 1990; YAMAGUCHI, 2000; GALTREY & FAWCETT, 2007), o que implica um papel para os proteoglicanos de sulfato de condroitina e RPNs na prevenção da plasticidade no indivíduo adulto.

Temos, então, que durante o desenvolvimento pós-natal o aumento na expressão de proteoglicanos de sulfato de condroitina nas RPNs correlaciona-se com o fim do período crítico e com a conseqüente redução na plasticidade (BUSCH & SILVER, 2007). Portanto, a circuitaria neuronal é modificável, e o potencial de plasticidade neuronal do encéfalo diminui durante o desenvolvimento pós-natal, acompanhado do surgimento das RPNs (SUGAHARA & MIKAMI, 2007).

Nesse contexto, é interessante analisar os resultados dos trabalhos de Carulli e colaboradores (2010), que usaram camundongos nocaute, resultando em animais com prejuízos na formação das RPNs. Essa manobra conferiu aos animais uma espécie de plasticidade permanente, evidenciada pela resposta à lesão do SNC. Em animais nocaute adultos, pós-período crítico, a privação visual de um dos olhos aos estímulos por três dias, foi capaz de mudar o padrão da circuitaria nas colunas de dominância ocular do córtex visual primário destes animais; algo não visto em animais adultos do tipo selvagem.

Evidências como estas encorajam a buscar métodos capazes de desestabilizar as RPNs, com o objetivo de livrar alguns neurônios dos efeitos

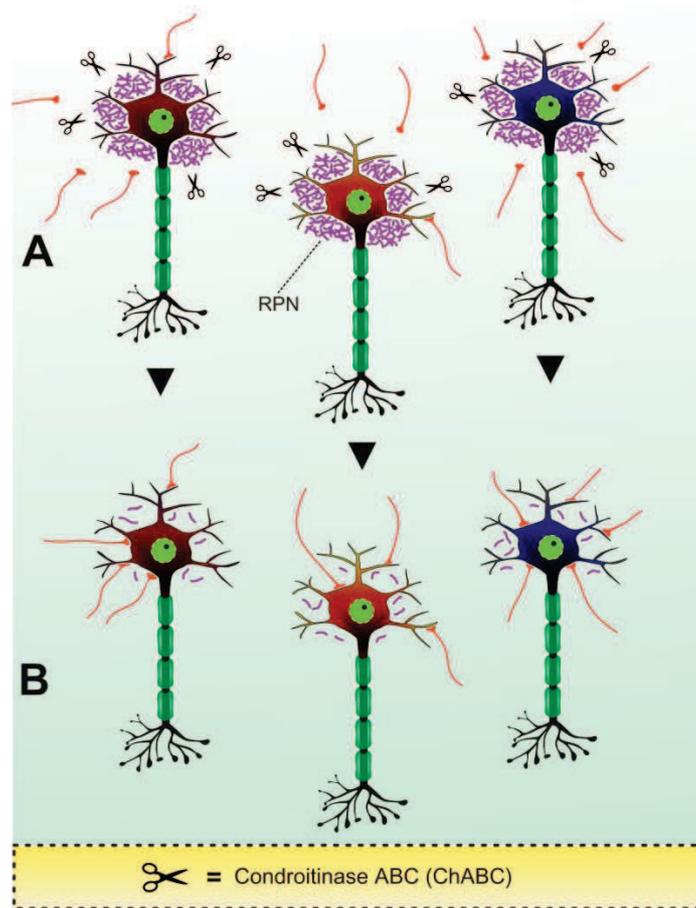
bloqueadores da plasticidade, com a finalidade de reabrir períodos críticos de plasticidade. Uma abordagem metodológica usa a enzima Condroitinase ABC, capaz de degradar proteoglicanos de sulfato de condroitina da MEC. Por exemplo, à semelhança do trabalho de Carulli *et al* (2010) com animais nocaute, a utilização da condroitinase no córtex visual de ratos alterou a integridade das RPNs e restaurou a plasticidade nas colunas corticais de dominância ocular, mesmo após o encerramento do período crítico (PIZZORUSSO *et al.*, 2002; PIZZORUSSO *et al.*, 2006).

Tudo indica que o uso da condroitinase seja um passo importante na indução de plasticidade neuronal.

#### 2.4 A ENZIMA CONDRUITINASE ABC: SUPERANDO A INIBIÇÃO DA PLASTICIDADE PROVOCADA PELOS PROTEOGLICANOS DE SULFATO DE CONDRUITINA

Uma das principais evidências de que os proteoglicanos de sulfato de condroitina inibem o crescimento de axônios vem de estudos utilizando as enzimas bacterianas *Condroitinases*. Estas enzimas, capazes de degradar as cadeias de sulfato de condroitina (PROPERZI *et al.*, 2003), foram purificadas a partir de várias espécies de bactérias (MICHELACCI *et al.*, 1987; HONG *et al.*, 2002) como, por exemplo, a enzima Condroitinase ABC (ChABC), produzida pela bactéria *Proteus vulgaris* (YAMAGATA *et al.*, 1968). O 'ABC' refere-se às formas 4-S, DS, e 6-S do sulfato de condroitina (CRESPO *et al.*, 2007).

Uma quantidade crescente e expressiva de trabalhos atesta o uso da ChABC na promoção da plasticidade neuronal, estando bem estabelecido que o tratamento com esta enzima reduz acentuadamente os efeitos inibitórios dos proteoglicanos de sulfato de condroitina *in vitro* e *in vivo* (por exemplo, PIZZORUSSO *et al.*, 2006; BUSCH e SILVER, 2007; ZHAO e FAWCETT, 2013; CHEN *et al.*, 2014). O mecanismo de ação da enzima é mostrado de forma esquemática na Figura 9.



**Figura 9. Desenho esquemático representando a ação da enzima ChABC.**

Reparem a simulação da degradação das RPNs com a ação da enzima (A), liberando áreas para contatos sinápticos, com consequente aproximação dos terminais axonais sobre os dendritos e soma neuronal (B). Fonte: Autoral. Baseado em Bartus *et al.*, 2012 e Berardi *et al.*, 2004.

A capacidade dos neurônios em cultura de estender neuritos sobre substratos de proteoglicano de sulfato de condroitina aumenta significativamente após a digestão da GAG pela ChABC (SNOW *et al.*, 1990; MCKEON *et al.*, 1995). Caggiano e colaboradores (2005), utilizando abordagem eletrofisiológica e análises comportamentais, determinaram que a ChABC restaura a atividade pós-sináptica e promove a recuperação funcional após dano à medula espinhal. Outros trabalhos também mostraram eficácia da chabc em promover plasticidade no snc, como os conduzidos por Barritt e colaboradores (2006). Neste estudo, foi realizada uma lesão na coluna dorsal cervical de ratos de modo a seccionar axônios do trato corticoespinhal. Após a

aplicação intratecal da enzima na medula espinha destes animais, constatou-se surgimento de colaterais axonais do trato corticospinal estendendo-se próximo aos sítios peri e intra-lesão.

Em outra abordagem, Corvetti & Rossi (2005) verificaram os possíveis efeitos da ChABC sobre a plasticidade no SNC não lesionado, especificamente no cerebelo (CORVETTI & ROSSI, 2005). Eles examinaram a morfologia e distribuição dos neuritos das células de Purkinje após injeção intraparenquimatosa de ChABC e, além de observarem degradação de proteoglicanos de sulfato de condroitina, mostraram um expressivo crescimento de ramos terminais das células de Purkinje após ação da enzima.

### **3 HIPÓTESE EXPERIMENTAL**

A hipótese é de que a degradação das redes perineuronais no córtex pré-frontal medial de ratos adultos é capaz de melhorar o desempenho cognitivo destes animais em testes que acessem as funções executivas.

### **4 JUSTIFICATIVA**

O CPF desempenha um papel crucial na organização de comportamentos complexos (TANJI & HOSHI, 2001). No entanto, essa região do SNC, como várias outras, apresenta redução natural em seu potencial de plasticidade após o fim do período crítico (HÜBENER & BONHOEFFER, 2014). Esse fato se deve à presença de moléculas inibitórias na MEC, que restringem a reorganização e reconexão sináptica entre os neuritos (YAMADA *et al.*, 1997; SCHMALFELDT *et al.*, 2000; YAMAGUCHI, 2000; GALTREY & FAWCETT, 2007). A remoção enzimática de tais componentes da MEC tem demonstrado a viabilidade de estratégias voltadas para o restabelecimento da plasticidade aumentada no SNC de animais adultos (CAGGIANO *et al.*, 2005; BUSCH & SILVER, 2007).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem como objetivo verificar se a degradação enzimática de moléculas de proteoglicanos de sulfato de condroitina no córtex pré-frontal de ratos adultos é capaz de melhorar o desempenho cognitivo em funções executivas em modelo de fase aguda.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Investigar o aparecimento e o curso temporal de desenvolvimento das redes perineuronais no córtex pré-frontal medial de ratos.

Analisar o final do período crítico de plasticidade nesta região de córtex cerebral de ratos.

Induzir a reabertura de período crítico de plasticidade no córtex pré-frontal medial de ratos adultos, pela remoção enzimática de moléculas de proteoglicanos de sulfato de condroitina.

Investigar implicações da remoção das redes perineuronais sobre o desempenho cognitivo dos animais em testes que dependem das funções executivas.

Verificar se a intervenção enzimática específica sobre as redes perineuronais é capaz de alterar padrões regionais de astrócitos e micróglia no córtex pré-frontal medial dos ratos.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1. ANIMAIS

Foram utilizados 33 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, machos, utilizados nas sobrevidas de 7, 14, 20, 30, 60, 75, 90 dias pós-natal (DPN) e de 4, 5 e 11 meses de idade, com peso máximo de 300g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram mantidos em condições padronizadas de luz (ciclo claro/ escuro de 12h) e temperatura (22°C), com alimentação e água *ad libitum*. Grupos de no máximo 3 ratos foram mantidos em caixas de polipropileno medindo 0,41x0,34x0,16 m.

O uso e a manipulação dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais Experimentais (Cepae) do ICB/UFPA (Nº 172-13) (ver Anexo I) e 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>).

### 6.2. DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram divididos em duas etapas (Figura 10). Na Etapa 1, caracterizou-se a formação e amadurecimento das RPNs no CPFm dos ratos, com o objetivo de inferir a data de fechamento do período crítico de plasticidade nesta área cortical. Na Etapa 2, verificaram-se os efeitos da degradação das RPNs pela enzima ChABC sobre o comportamento dos animais e sobre o comportamento das células da glia no CPFm.



**Figura 10. Desenho experimental.**

Diagrama mostrando as etapas dos procedimentos experimentais. As setas mostram o tempo transcorrido.

### 6.3. AMADURECIMENTO DAS REDES PERINEURONAIS

O curso temporal do desenvolvimento e amadurecimento das RPNs no CPFm foi determinado nas idades mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1. Caracterização dos grupos para histoquímica**

<b>Idade</b>	<b>Histoquímica (n)</b>
7 dias	2
14 dias	2
20 dias	2
30 dias	2
60 dias	2
75 dias	2
90 dias	2
5 meses	2
11 meses	2
<b>Total=18</b>	

Número amostral (n).

As etapas da histoquímica para a marcação das RPNs estão descritas no tópico “Processamento Histológico”, mais adiante.

#### 6.4. CIRURGIA PARA A APLICAÇÃO DA ENZIMA ChABC E DEFINIÇÃO DE GRUPOS COMPORTAMENTAIS

Ratos machos, com 4 meses de idade, foram selecionados para esta segunda etapa de experimentos, cuja composição de grupos é mostrada na Tabela 2.

**Tabela 2. Caracterização dos grupos para teste comportamental e histologia**

Grupos	N		
	Testes Comportamentais	Imunohistoquímica	Histoquímica
ChABC	5	1	1
BSA	5	1	
<i>Sham</i>	5		
<b>Total: n = 15</b>			

BSA: albumina do soro bovino; ChABC: condroitinase ABC; O “n” refere-se ao número amostral.

OBS.: o “n” amostral é 15 e não 18 pelo fato de os animais utilizados para imunohistoquímica e histoquímica serem os mesmos usados nos testes comportamentais.

##### 6.4.1. Anestesia

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol, Konig) e cloridrato de xilazina (Kensol, Konig), na dose 30 mg/kg e 0,8 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal (i.p.).

Para evitar salivagem e acúmulo de secreções traqueobrônquicas os animais receberam 0,1 mg/kg via intramuscular (i.m.) de sulfato de atropina (Ariston). Ao longo do experimento, nos casos de superficialização, o nível anestésico, avaliado através de estimulação dos reflexos de dor, foram administradas doses suplementares de cloridrato de cetamina.

#### 6.4.2. Procedimentos cirúrgicos

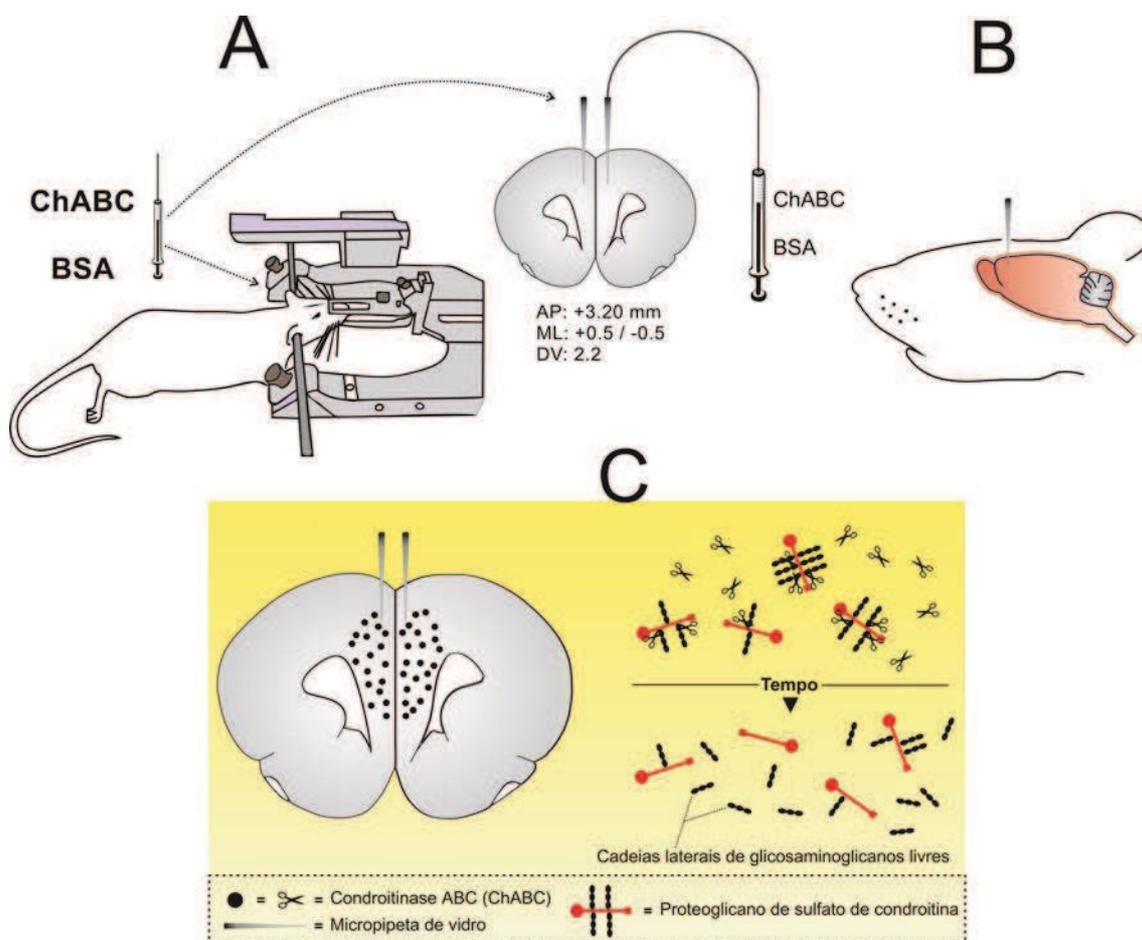
Os animais anestesiados tiveram a cabeça imobilizada em um aparato estereotáxico (Insight) (Figura 11, A). Foi feita uma incisão longitudinal ao longo da linha média na superfície dorsal da cabeça do animal, como forma de acesso para a exposição de parte da região anterior do crânio e assim se chegar à região mais rostral do encéfalo para, finalmente, ter acesso ao CPF.

Após a exposição do crânio, duas fendas foram feitas no osso frontal, bilateralmente, com uma broca odontológica adaptada a um micromotor nas seguintes coordenadas estereotáxicas (PAXINOS & WATSON, 1998): AP = + 3,2; ML = +0,5 / -0,5 (em relação ao Bregma); e DV = 2,2 (Figura 11, B).

Sob visualização com estereomicroscópio (DFV, MU-M19), realizou-se a aplicação de 1  $\mu$ L de ChABC livre de protease (animais tratados) ou albumina do soro bovino 0,1% (BSA), a um fluxo de 0,2  $\mu$ L/min no CPFm, em ambos os hemisférios, para que a enzima atingisse a área-alvo, degradando as RPNs (Figura 11, C). A concentração da enzima foi de 50 U/mL (LIN *et al*, 2008).

Durante todo o procedimento cirúrgico, a superfície cortical permaneceu umedecida com solução salina a 0,9%, evitando-se ressecamento.

No grupo *Sham*, todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados de maneira semelhante aos do grupo ChABC e grupo BSA, exceto que não houve injeção.



**Figura 11. Desenhos esquemáticos mostrando o procedimento de aplicação da enzima.** Em **A**, animal no estereotáxico mostrando as coordenadas utilizadas. Em **B**, um esquema mostrando a fenda aberta no crânio para introdução da micropipeta. Em **C**, representação do local de liberação da enzima e sua conseqüente ação sobre as moléculas de proteoglicanos de sulfato de condroitina. *Fonte: Autoral, baseado em Paxinos & Watson (1998) e Bartus et al, 2012.*

Os animais permaneceram 5 dias em repouso pós-cirúrgico. No sexto dia, os animais foram avaliados no teste de Reconhecimento de Objetos. No sétimo dia, os mesmos animais usados no teste de Reconhecimento de Objetos foram avaliados no teste da Alternância Espontânea e Atividade Locomotora.

#### 6.4.3. Teste do reconhecimento de objetos

O procedimento experimental foi baseado em Barker e colaboradores (2007) e Cross e colaboradores (2012). A exploração ocorreu em uma arena plana e aberta (0,50 x 0,90 x 1,00 m) feita de acrílico revertida com película

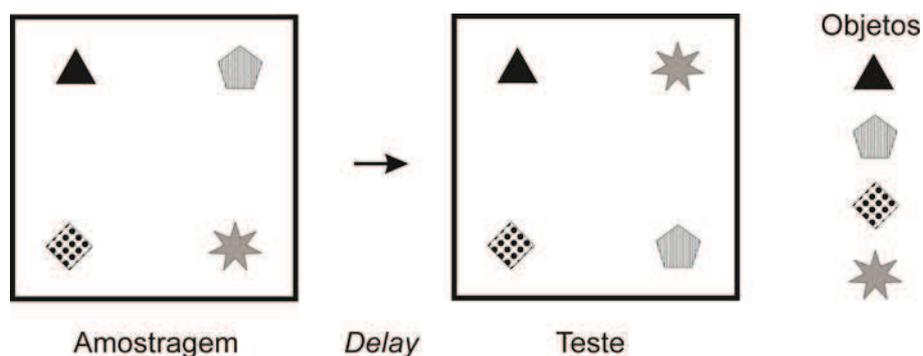
plastica preta. Utilizou-se uma câmera filmadora acoplada a um computador para registrar o comportamento exploratório dos animais para análise posterior. Os estímulos apresentados foram objetos diversos que variavam em forma, cor e tamanho (0,09 x 0,08 x 0,07 m, a 0,25 x 0,15 x 0,10 m) e eram pesados o suficiente para dificultar que os animais os mudassem de lugar.

Duas semanas antes dos procedimentos cirúrgicos, os animais passaram por etapas de habituação à manipulação pelo experimentador, assim como habituação ao aparato de teste, este último em um período de quatro dias que precederam a cirurgia: nos 2 primeiros dias os animais foram colocados em grupo (quatro ratos ao mesmo tempo) dentro do aparato, com tempo de exploração de 15 min; nos 2 dias restantes foram colocados individualmente, por 5 min dentro da arena. Em todos os casos não havia objetos na arena.

Vinte e quatro horas após a última habituação os ratos seguiram para a cirurgia e em seguida foram deixados por 5 dias em recuperação.

No sexto dia os animais foram submetidos ao teste propriamente dito, no qual quatro objetos distintos foram colocados em cada canto da arena, afastados 0,15 m das paredes adjacentes. Os experimentos foram realizados entre 19:00h e 22:00h (horário local de Belém-PA).

As sessões decorriam da seguinte forma: o rato foi colocado no centro da arena, deixando-o explorar o ambiente por 5 min (fase de amostragem). Terminado esse tempo o animal foi removido para sua caixa de origem, permanecendo ali por 5 min (*delay*). Enquanto o animal estava na sua caixa os objetos foram retirados da arena e limpos com álcool 30%. A base da arena também foi limpa. Em seguida, os objetos foram colocados na mesma posição, exceto dois, que foram trocados de posição entre si (Figura 12). Após os 5 min de espera, o mesmo animal voltou para a arena, deixando-o explorar os objetos por 3 min (teste propriamente dito).



**Figura 12. Esquema da arena do reconhecimento de objeto.**

Evidencia-se uma das possibilidades de configuração dos objetos dentro da arena, assim como a sequência do teste comportamental. *Fonte: Autoral.*

Um índice de discriminação foi gerado para cada animal. Esse índice foi calculado pelo tempo gasto para explorar os objetos que foram alterados de lugar menos o tempo de exploração dos objetos que permaneceram em seus lugares originais, dividido pelo tempo total de exploração (objetos no mesmo lugar e alterados de lugar).

#### 6.4.3.1 Análise estatística

Após análise de normalidade, para comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Significância foi estabelecida em  $\alpha=0,05$ .

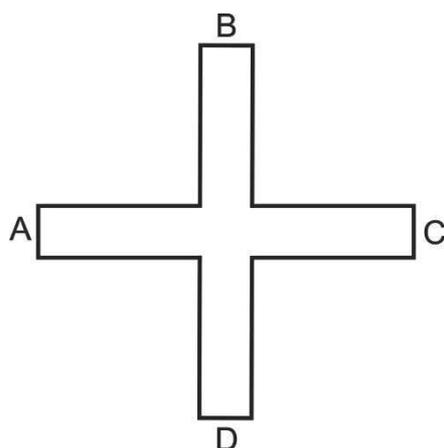
#### 6.4.4. Teste da alternância espontânea

A alternância espontânea em ratos e camundongos refere-se à tendência natural dos roedores em escolher braços alternados em um labirinto radial em tentativas repetidas (DUDCHENKO, 2004). Assim, o teste da alternância espontânea foi usado no presente trabalho por ser um método já bem consagrado que acessa funções executivas de memória de curta duração (DUDCHENKO, 2004).

Os testes da alternância espontânea foram realizados no sétimo dia pós-cirurgia (24 horas após os ensaios de reconhecimento de objetos). Estes aconteceram entre 19:00h e 22:00h (horário local de Belém-PA) em uma sala com iluminação padrão fixa (lâmpada de teto fluorescente de 25 W). Os

procedimentos experimentais foram baseados em descrições de Hlíňák & Krejčí (2006).

O experimentador permaneceu distante do aparato, mas observando o comportamento do animal através de um monitor de computador e anotando os parâmetros de interesse. Os braços do labirinto em cruz (Figura 15) foram feitos em madeira e consistem de quatro braços (0,50 x 0,15 x 0,15 m), abertos em sua parte superior, que se estendem a partir de um espaço central aberto (0,15 x 0,15 m). Assim, os animais podiam explorar os braços através de um espaço central comum. Os braços e o chão estavam revestidos com uma placa para facilitar a limpeza após cada teste. Os braços foram designados com as letras no intervalo A-D (Figura 13). O aparato ficou a uma distancia de 0,50 m do chão.



**Figura 13. Esquema do labirinto em cruz.** Vista superior do aparato, com seus braços radiando de uma plataforma central, sendo nomeados com letras do alfabeto. *Fonte: Autoral. Baseado em observações do aparato.*

Tipicamente, assume-se, por exemplo, que os ratos recordam a localização do braço mais recentemente visitado com base na sua relação espacial com pistas externas ao labirinto (DUDCHENKO, 2004). Desta forma, foram colocadas pistas visuais nas proximidades do aparato (nas paredes) de modo a auxiliar na orientação do animal.

De forma individual, os ratos eram colocados no espaço central e deixados explorar livremente o aparato durante 10 min, enquanto a sequência

de entradas nos braços era anotada. Uma entrada foi caracterizada quando os animais estavam com as quatro patas localizadas dentro do braço.

Uma alternância foi definida como a entrada em quatro braços de forma a não haver repetição. Uma série sequencial do tipo “ABCD”, por exemplo, não é a única considerada correta. Não há diferença se os animais entram nos braços numa sequência regular ou irregular. Por exemplo, na série ABDACBCBA, na tétrade inicial “ABDA” o animal entrou em apenas três braços diferentes “ABD”, não configurando uma alternância. Para avaliar a próxima tétrade, omite-se o primeiro braço, “A”. A nova tétrade que se forma, “BDAC”, contém combinação de quatro braços diferentes (considerada “correta”). Outra vez, omite-se o primeiro braço desta nova sequência, “B”, resultando em “DACB”, representando uma combinação de quatro braços diferentes (mais uma alternância “correta”) e assim subsequentemente.

Em essência, a pontuação de alternância para cada animal foi calculada como a razão entre o “número de alternâncias conseguidas”, pelo “número total de entradas”. As três últimas entradas não foram computadas para o “total de entradas”, devido não cumprir a regra da tétrade completa.

#### 6.4.4.1. Análise estatística

Para comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA seguida do teste de Dunn. Significância foi estabelecida em  $\alpha=0,05$ .

#### 6.4.5. Atividade locomotora em campo aberto

O teste em campo aberto é apropriado para medir respostas comportamentais como a atividade locomotora e comportamento exploratório. Os testes foram conduzidos 1 hora após o término dos ensaios da alternância espontânea.

O aparato para o teste consiste em um quadrado (0,76 x 0,76 m), feito em madeira e possui paredes opacas de 0,42 m de altura. O chão está dividido em 9 quadrantes iguais. A análise inicia quando os animais são colocados

individualmente na área central do campo aberto. O número de quadrantes atravessados com todas as quatro patas foi contado num tempo total de 5 min.

#### 6.4.5.1. Análise estatística

Para comparação entre os grupos foi utilizada ANOVA. Significância foi estabelecida em  $\alpha=0,05$ .

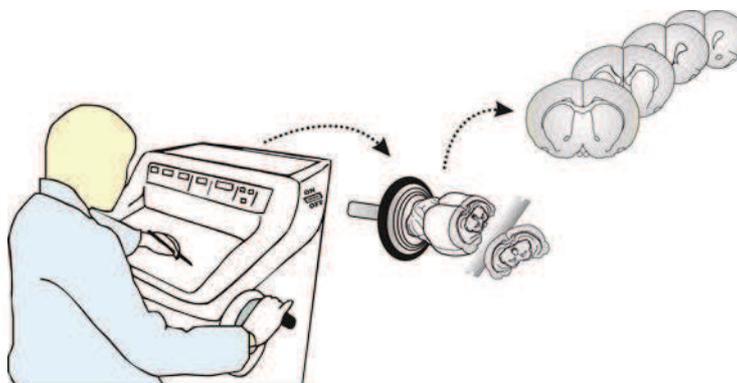
### 6.5. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após os testes comportamentais, grupos de animais foram selecionados para processamento histoquímico com lecitina *Vicia villosa* (Vv), com o objetivo de se identificar área de degradação pela enzima com consequente rarefação e desaparecimento de RPNs (Grupo ChABC, n=1) e também para processamento imunohistoquímico para revelar a presença de astrócitos e micróglia (Grupo BSA, n=1; Grupo ChABC, n=1), no CPFm, em todos os casos. Os procedimentos iniciais para a histologia iniciaram 12 horas após o último dia de testes comportamentais (Atividade Locomotora). Os demais animais não utilizados na histologia foram sacrificados 2 horas após o término dos ensaios comportamentais, com injeção letal de barbitúrico (Tiopental®), seguindo a um dos métodos preconizados pela Resolução CFMV nº 714, de 20 de junho de 2002, atualizada na Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012.

#### 6.5.1. Perfusão intracardiaca e secções histológicas

Após os tempos de sobrevivência especificados para avaliar o amadurecimento das RPNs ou após realização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol, Konig) e cloridrato de xilazina (Kensol, Konig), na dose 30 mg/kg e 0,8 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal (i.p.) e então perfundidos, via ventrículo esquerdo do coração com solução salina 0,9% (pH 7,4) e paraformaldeído 4% (pH 7,4). Após craniotomia, os encéfalos foram pós-fixados em paraformaldeído 2%. Após 24 horas, os encéfalos de cada animal

foram separados e submersos sequencialmente em solução de sacarose a 10, 20 e 30% para crioproteção. Os encéfalos foram seccionados (Figura 14) no plano coronal a uma espessura de 60 µm em um criostato (Leica CM 1900).



**Figura 14. Obtenção de secções histológicas em criostato.** Desenho esquemático mostrando a etapa de processamento do tecido nervoso num criostato, com consequente obtenção das secções histológicas. *Fonte: Autoral.*

#### **6.5.2. Histoquímica para marcação das RPNs com lectina *Vicia villosa***

As secções histológicas foram coletadas em tampão fosfato (PB) 0,1M e em seguida lavadas duas vezes em PB 0,1M com 6% de Triton X-100 (Sigma) durante 30 minutos. Posteriormente, as secções foram incubadas em solução contendo 0,95% de Vv biotinizada (Sigma), 6% de Triton X-100 (Sigma), diluídos em tampão fosfato salina, durante dezesseis horas ininterruptas, em temperatura ambiente (23°C). Na sequência, as secções foram lavadas duas vezes em PB 0,1M durante vinte minutos e então 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 nova lavagem em PB 0,1M por 20 minutos seguiu-se a etapa de revelação da marcação utilizando-se o método da glicose oxidase-níquel-diaminobenzidina (GND), que reagiu com a peroxidase do complexo ABC.

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, próprias para microscopia óptica.

### **6.5.3. Imunohistoquímica para astrócitos e micrólia**

As secções foram processadas flutuando livremente nas soluções (*free-floating*). A peroxidase endógena foi inativada com peróxido de hidrogênio 3% em PBS 0,1M, e em seguida as secções foram incubadas em solução bloqueadora constituída de albumina do soro bovino (BSA) 10%, soro normal de cabra 10% e Triton X-100 0,3% diluídos em PBS 0,1M, por 30 min para a inativação dos sítios inespecíficos e permeabilização do tecido. As secções foram então incubadas a 4°C por 24 horas com os seguintes anticorpos primários: anti-CD68 (ED1, 1:200, Merck Millipore) para identificar macrófagos centrais e micróglias; ou anti-GFAP (do inglês *glial fibrillary acidic protein*) na diluição de 1:1000 (Sigma), que marca astrócitos reativos. Em seguida, as secções foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário IgG biotilado anti-camundongo (1:200, Merck Millipore). Os produtos da reação foram visualizados com a solução de DAB (3,3'-*diaminobenzidina*) e peróxido de hidrogênio. As secções foram lavadas em PBS 0,1M.

As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, próprias para microscopia óptica.

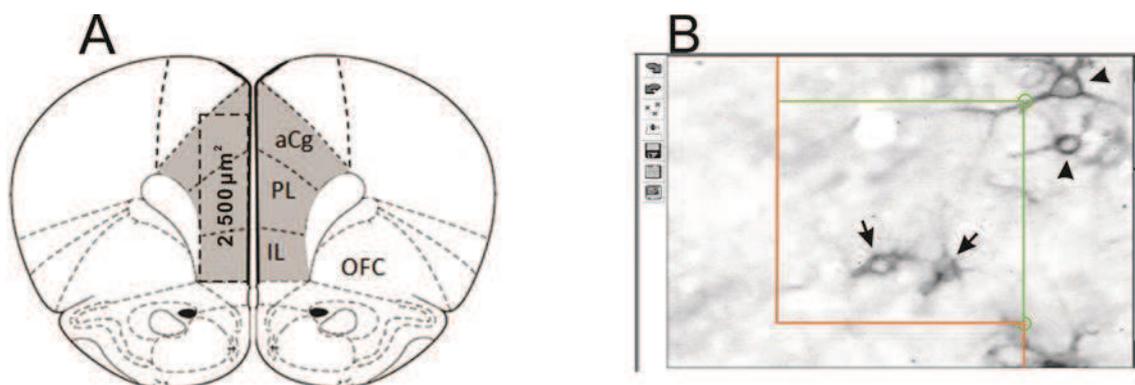
### **6.5.4. Desidratação e montagem das lâminas**

As secções montadas em lâminas gelatinizadas foram secadas em temperatura ambiente e desidratadas em álcool etílico com concentrações crescente de 70%, 80%, 90% e 100% e então diafanizadas em xileno. Em seguida, as secções foram cobertas com lamínula com o auxílio de um meio de inclusão (Entellan, MERK).

## 6.6. ESTEREOLOGIA

Utilizou-se o método estereológico para quantificação das RPNs (células Vv+), células ED1+ e GFAP+, após a marcação destas por histoquímica ou imunohistoquímica. Utilizou-se o método do fracionador óptico, que consiste em uma estimativa imparcial e sistemática para uma dada população a partir de uma amostra aleatória da mesma.

Para estimar a quantidade de células, utilizou-se o programa Stereologer versão 2.1. A estimativa foi realizada usando caixas de contagem com área de  $2500 \mu\text{m}^2$  para o CPFm (Figura 5), no hemisfério direito. Foram analisadas 12 caixas de contagem para cada animal, num total de 4 secções. O contorno das áreas analisadas foi feito com objetiva de 2x e a contagem das células com objetiva de 20x. A espessura do tecido utilizada para a análise estereológica foi de  $60\mu\text{m}$ . O coeficiente de erro foi mantido menor que 0,1.



**Figura 15: Análise estereológica.** Em **A**, esquema mostrando a área de contagem no córtex pré-frontal medial em um plano coronal, abrangendo as regiões de córtex cingulado anterior (aCg), córtex pré-límbico (PL), e córtex infralímbico (IL). Em **B**, vista da tela do computador mostrando uma das caixas de contagem das RPNs gerada pelo programa, com linha de inclusão (verde) e linha de exclusão (vermelha). Há duas RPNs dentro desta caixa de contagem (seta), e pelo menos duas RPNs visualizadas fora da área de contagem (cabeça de seta). Objetiva de 20x. Fonte: Painel em A, adaptado de Bizon et al. (2012).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. SURGIMENTO E ETAPAS DE MATURAÇÃO DAS RPNs NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL

Uma das propostas deste trabalho foi de mostrar quando e como surgem as RPNs no CPFm de ratos, assim como as etapas de seu amadurecimento. As RPNs localizadas em neurônios do CPFm foram reveladas através da histoquímica com a lectina *Vicia villosa* (Vv). Como visto na Figura 16, percebe-se claramente que as RPNs passam por etapas distintas de amadurecimento, desde a primeira semana pós-natal até a idade adulta.

Em animais muito jovens, até a segunda semana pós-natal, as moléculas da MEC associadas com a Vv estão espalhadas difusamente pelo tecido, em nada lembrando as RPNs. O envelope neuronal das RPNs, porém, começa a aparecer por volta dos 20 DPN (Figura 16, P20), com uma estrutura que lembra as contas de um rosário, porém ainda sem a forma peculiar das RPNs comumente vistas em animais adultos. Por volta de P30, as RPNs começam a ficar mais definidas (Figura 16, P30). A partir de P60 ocorre um aumento considerável das RPNs com perfil mais amadurecido, em detrimento das mais imaturas (Figura 16, P60 e P70). Essa tendência continua em idades posteriores até os 5 meses de idade, quando a grande maioria das RPNs tem um perfil maduro (Figura 16, 5m).