



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

GABRIELE DOS SANTOS COIMBRA

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DAS REDES PERINEURONAIS  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL**

BELÉM  
2022

GABRIELE DOS SANTOS COIMBRA

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DAS REDES PERINEURONAIS  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.  
Linha de Pesquisa: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia.

BELÉM  
2022

GABRIELE DOS SANTOS COIMBRA

**DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E TEMPORAL DAS REDES PERINEURONAIS  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL**

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

DATA DA AVALIAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**CONCEITO:** \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Professor (a) Dr (a). Carlomagno Pacheco Bahia  
(Orientador – PPGNBC/UFGA)

---

Professor Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista  
1º avaliador da banca  
(Membro – PPGNBC/UFGA)

---

Professor (a) Dr (a). Aline Correa de Carvalho  
2º avaliadora da banca  
(Membro – UNIFESPA)

---

Professor (a) Dr (a). Ivanira Amaral Dias  
(Suplente – ICS/UFGA)

BELÉM  
2022

Para Ângelo, meu filho

A devoção mais doce

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, exemplo de mulher forte e trabalhadora. Minha maior rede de apoio e incentivadora da minha educação.

À minha irmã, por sempre ter acreditado em mim e me apoiado incondicionalmente.

Ao meu orientador, que me acompanha desde a iniciação científica e com quem sempre estou aprendendo.

Aos meus colegas do Laboratório de Neuroplasticidade, pela parceria.

Às minhas amigas, pela escuta, incentivo e empatia, principalmente nas horas mais difíceis.

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

“Seja qual for o rumo que tomarmos, nosso destino está indissolúvelmente ligado à ciência.”

(Carl Sagan)

## RESUMO

O córtex pré-frontal (CPF) de mamíferos está envolvido no processamento de diversas funções que vão desde cognição até controle motor complexo para interações sociais. Para esta área do córtex cerebral, ainda não há definição de duração e de quando ocorre o fechamento do seu período crítico de plasticidade. Um dos potenciais marcadores biológicos para isso podem ser as Redes Perineuronais (RPNs). O presente trabalho investigou a distribuição espacial e temporal das RPNs durante o desenvolvimento do CPF medial de ratos, utilizando-se a histoquímica com a aglutinina *Vicia villosa*. Utilizamos 21 ratos *Rattus norvegicus*, da linhagem *wistar*, todos machos, que foram aleatoriamente divididos em sete grupos experimentais, compostos por 3 animais em cada grupo, da seguinte forma: grupo de 7, 14, 20, 26, 58, 75 e 135 dias pós-natal, respectivamente. Nossos resultados demonstram que no CPF, as RPNs surgem em P26 com pequeno número de células Vv+ e com perfil imaturo, aumentando em números totais até a fase adulta quando há o predomínio de perfil maduro da RPNs. Concluímos que o início do período crítico de plasticidade no CPFm de ratos da linhagem *Wistar* criados em condição padrão de laboratório ocorre em 26 e o seu fechamento ocorre em P75 há diminuição progressiva do número de RPNs com perfil imaturo e aumento concomitante do número de RPNs com perfil maduras durante o desenvolvimento pós-natal do CPFm, tornando este perfil de RPN mais prevalente em idades mais avançadas, por volta dos 3 meses de idade, quando os animais já são considerados adultos jovens.

**Palavras-chave:** Redes Perineuronais; Córtex Pré-frontal; Período Crítico de Plasticidade; Plasticidade Neural.

## ABSTRACT

The mammalian prefrontal cortex (PFC) is the cerebral cortex area involved in processing several functions as cognition and complex motor control for social interactions. In this PFC area, there is no duration of the time window definition about its critical period of plasticity. One of the potential biological markers for this may be the Perineuronal Nets (PNNs). The present work aimed to examine the developmental time course of PNN formation focusing on the medial prefrontal cortex (mPFC) of rats using histochemistry with *Vicia villosa* agglutinin. We use 21 male rats *Rattus norvegicus*, *wistar* lineage, which were randomly divided into seven experimental groups, composed of 3 animals in each group, as follows: group at 7, 14, 20, 26, 58, 75, and 135 postnatal days, respectively. We found that in PFC, PNNs appear at P26 with a small number of Vv+ cells, increasing in total numbers until adulthood. The results of the present study demonstrate the temporal development of PNN formation in the *Wistar* rats mPFC, and we suggest a time window for the end of the critical period of plasticity in this cortical area (26- 75 postnatal days), there is a progressive decrease in PNNs with immature profile and a concomitant increase in mature PNNs during postnatal development of the mPFC, making this PNNs profile more prevalent at more advanced ages, around 3 months of age, when the animals are already considered young adults.

**Keywords:** Perineuronal nets; Prefrontal cortex; Critical period of plasticity; Neural Plasticity.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Áreas de Brodmann do córtex pré-frontal humano.....	16
Figura 2 - Tipos corticais no córtex pré-frontal humano e de camundongo .....	17
Figura 3 - Desenho esquemático mostrando regiões e subdivisões do córtex pré-frontal de ratos .....	18
Figura 4 - Desenhos esquemáticos dos córtices pré-frontais de primatas humanos e de pequenos roedores (rato) .....	21
Figura 5 - Diagrama esquemático das janelas de plasticidade durante o desenvolvimento do SNC.....	24
Figura 6 - A Plasticidade Neural ao longo da vida. ....	25
Figura 7 - Representações esquemáticas da rede perineuronal .....	27
Figura 8 - Diagrama esquemático de três possíveis mecanismos quais as RPNs podem agir para restringir a plasticidade no SNC .....	30
Figura 9 - Diagrama esquemático representativo dos grupos experimentais e da linha de tempo de vida pós-natal (em dias) dos animais em cada grupo.....	32
Figura 10 - Fotomicrografia do hemisfério esquerdo de animais com idades precoces. ....	36
Figura 11 - Fotomicrografia do hemisfério esquerdo de animais com 26 dias pós-natal e análise estatística da contagem de RPNs em ambos os hemisférios.....	37
Figura 12 - Fotomicrografia do hemisfério cerebral esquerdo apresentando o CPFm de animais com 58 dias pós-natal.....	38
Figura 13 - Fotomicrografia do córtex pré-frontal de animais com 75 dias pós-natal e análise estatística da contagem de RPNs em ambos os hemisférios. ....	39
Figura 14 - Fotomicrografia do córtex pré-frontal de animais com 135 dias pós-natal e análise estatística da contagem de RPNs em ambos os hemisférios .....	40
Figura 15 - Gráfico <i>box plot</i> representativo do número de células Vv <sup>+</sup> marcadas nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo. ....	41
Figura 16 - Gráfico <i>box plot</i> representativo do número total de Vv <sup>+</sup> marcadas nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo e total por idade.....	42

## LISTA DE SIGLAS

ACg: Córtex cingulado anterior

AID: córtex insular agranular dorsal

AIV: córtex insular agranular ventral

AMPA-R: Receptor AMPA.

ANOVA: Análise de Variância

AOM: núcleo olfatório anterior medial;

AOV: núcleo olfatório anterior ventral;

BA: Áreas de Brodmann

cc: corpo caloso

CEPAE: Comitê de Ética para o Uso de Animais Experimentais

Cg2: área 2 do córtex cingulado;

ChABC: Condroitinase-ABC

CPF: Córtex Pré-Frontal

CPFdl: Córtex Pré-Frontal Dorsolateral

CPFm: Córtex Pré-Frontal Medial

CPFo: Córtex Pré-Frontal Orbitofrontal

CPFvl: Córtex Pré-Frontal Ventrolateral

CSPGs: Proteoglicanos de Sulfato de Condroitina

GAGs: Glicosaminoglicanos

gcc: joelho do corpo caloso

GND: Glicose Oxidase-Níquel-Diaminobenzidina

HA: Hialuronano

HAS: hialuronano sintase

LO: córtex orbital lateral

M1: área motora primária

MEC: Matriz Extracelular

MO: córtex orbital medial

OB: bulbo olfatório

PB: Tampão Fosfato

PrC: córtex pré-central

PrL: córtex pré-límbico

PV: parvalbumina

RPN: Redes Perineuronais

SNC: Sistema Nervoso Central

Tn-R: Tenascina-R

UFPA: Universidade Federal do Pará

VLO: córtex orbital ventro-lateral

VO: córtex orbital ventral

Vv: *Vicia Villosa*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1 Córtex Pré-Frontal</b> .....	14
1.1.1 Localização e divisão do Córtex Pré-Frontal.....	14
1.1.2 Córtex Pré-frontal do rato.....	17
1.1.3 Funções do Córtex Pré-Frontal.....	18
<b>1.2 Plasticidade Neural</b> .....	21
1.2.1 Período crítico de plasticidade .....	23
<b>1.3 Redes Perineuronais</b> .....	25
<b>1.4 Justificativa</b> .....	31
<b>1.5 Hipótese</b> .....	31
<b>2. OBJETIVO</b> .....	31
2.1 Objetivo Geral .....	31
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
<b>3.1 Animais de experimentação</b> .....	32
<b>3.2 Grupos Experimentais</b> .....	32
<b>3.3 Perfusão e fixação do tecido nervoso</b> .....	33
<b>3.4 Processamentos histológicos</b> .....	33
3.4.1 Histoquímica para marcação das RPNs com a lectina Vicia villosa .....	33
3.4.2. Desidratação e Montagem das Lâminas Histológicas .....	34
3.5 Estereologia .....	34
<b>3.6 Análises Quantitativas</b> .....	35
3.7 Estatística.....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	35
<b>4.1 Distribuição das RPNs no CPFm de roedores</b> .....	35
4.1.1 Surgimento das RPNs no CPFm e o número total de células com RPN durante o desenvolvimento pós-natal do córtex pré-frontal de ratos da linhagem Wistar.....	36
4.1.2 Amadurecimento das RPNs e fechamento do período crítico de plasticidade no CPFm.....	37
4.1.3 Distribuição das redes perineuronais no CPFm.....	40
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	42

<b>5.1 Distribuição temporal das RPNs no CPFm de roedores</b> .....	43
5.1.1 Surgimento das RPNs no CPFm .....	43
5.1.2 Amadurecimento das RPNs e fechamento do período crítico de plasticidade no CPFm .....	45
5.1.3 Quantidade de células com RPN o final do período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal .....	47
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>ANEXO A: ARTIGO CIENTÍFICO RELACIONADO A TEMÁTICA DA PESQUISA ACEITO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

A Plasticidade Neural ou Neuroplasticidade refere-se à capacidade do Sistema Nervoso Central (SNC) de realizar mudanças estruturais e funcionais em resposta à experiência sensorial prévia e em resposta à lesão do tecido nervoso (ISMAIL, 2017). Essa maleabilidade do SNC é realizada principalmente pela modulação de um subconjunto de mecanismos genéticos, moleculares e celulares que estimulam a dinâmica das conexões sinápticas e, finalmente, a formação de circuitos neurais que levam ao ganho ou perda de função e, conseqüentemente, mudanças de comportamento ou função (ISMAIL, 2017).

Em seres humanos, o SNC é mais sensível à experiência prévias durante a infância, quando está mudando de forma mais dramática. Por exemplo, é consideravelmente mais fácil aprender uma segunda língua quando criança do que como adulto (ISMAIL, 2017). Embora a aquisição da linguagem não seja impossível na idade adulta, alcançar a fluência em língua estrangeira requer muito mais exposição e prática do que na infância (WERKER; HENSCH, 2015).

No final do período crítico de plasticidade, uma estrutura especializada da matriz extracelular chamada rede perineuronal (RPN) deposita-se em torno de alguns subtipos de neurônios, ajudando a estabilizar as conexões neurais recentemente estabelecidas (CARULLI, 2016) O período de formação e amadurecimento das RPNs divergem entre áreas funcionais distintas do córtex cerebral, sustentando a ideia de que a maturação da RPN está funcionalmente relacionada ao fechamento de períodos críticos de plasticidade para a aquisição de funções específicas (CARSTENS *et al.*, 2016).

Elucidar os mecanismos pelos quais as RPNs atuam é desafiador, mas possui uma aplicação prática importante e fundamental para a compreensão dos mecanismos de plasticidade neural com ênfase no fechamento do período crítico de plasticidade. No presente trabalho, propomos avaliar a evolução temporal do surgimento e a distribuição espacial das RPNs no desenvolvimento pós-natal do córtex pré-frontal (CPF) de pequenos roedores (ratos) e assim poder ter este parâmetro para determinar a sua janela de tempo do período crítico de plasticidade. Saliento que nas últimas décadas, a importância do CPF no funcionamento, integração e evolução do comportamento em primatas não humanos e humanos tem sido investigada e destacada, associando-se com um maior desenvolvimento de

habilidades cognitivas superiores e como uma região chave na articulação do comportamento e das emoções (WIDGE; HEILBRONNER; HAYDEN, 2019).

## 1.1 Córtex Pré-Frontal

O CPF está relacionado a processos diversos que vão desde a cognição até atividade motora complexa para interações sociais (RAY, 2012). Uma vez que essa área cortical cerebral recebe grande número de aferências de diferentes estruturas cerebrais e de uma vasta gama de estruturas subcorticais como, por exemplo, o tronco encefálico e o tálamo (KOLB *et al.*, 2012), ela se torna essencial para a integração multissensorial, função executiva, linguagem, cognição social e a regulação do comportamento emocional (LAUBER, 2016).

O CPF tem sido foco de inúmeras pesquisas científicas publicadas nos últimos anos, por exemplo, só nos últimos 4 anos são 17.329 novos artigos científicos publicados segundo a plataforma de busca de literatura científica PUBMED (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Prefrontal+cortex&filter=years.2018-2022>). Isso se deve à sua associação com distúrbios psiquiátricos 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). Além disso, o CPF é área do córtex cerebral mais importante para coordenar/articular respostas comportamentais, neuroendócrinas e autonômicas, particularmente para estressores antecipatórios (MCKLVEEN, 2018). Entretanto, até o presente momento, não está bem estabelecido qual a janela temporal do período crítico de plasticidade do CPF. No presente trabalho, abordamos esta questão avaliando a distribuição espacial e temporal de redes perineuronais no CPF de pequenos roedores.

### 1.1.1 Localização e divisão do Córtex Pré-Frontal

O CPF está situado no lobo frontal no encéfalo dos mamíferos (BADRE; D'ESPOSITO, 2009). O lobo frontal corresponde a cerca de um terço do córtex cerebral humano. Seu amadurecimento durante a evolução dos mamíferos está associado ao surgimento de funções cognitivas cada vez mais complexas (DEFELIPE,

2011). Em humanos, o lobo frontal é dividido anatomicamente do lobo parietal pelo sulco central. O sulco lateral segrega os lobos frontal e temporal. Várias áreas motoras estão localizadas lobo frontal, além do córtex pré-frontal, que se situa na sua porção mais anterior (FUSTER, 2003; FELTEN, 2021), ver Figura 1.

Uma vez que o córtex cerebral pode ser dividido em diversas áreas citoarquitetônicas distintas baseadas nas diferenças do tamanho e do tipo neuronal baseado em sua morfologia e das suas conexões para as várias camadas corticais cerebrais, assim como também nas diferenças de densidade celular, presença ou ausência de certas camadas e a espessura relativa das camadas (PEDRIDES, 2012) o CPF tem suas subdivisões baseadas nesses parâmetros arquitetônicos.

Segundo os estudos de Brodmann acerca da organização cortical utilizando parâmetros citoarquitetônicos para encéfalo de primatas, as áreas de Brodmann (BAs) para o CPF de humano foram definidas usando critérios citoarquitetônicos e topográficos (PETRIDES, 2012), ver Figura 1. Tradicionalmente, as BAs correspondentes ao CPF em humanos são BA8 a 14 e BA44 a 47 (FUSTER, 2015; ÖNGÜR, 2003), Figura 1, A. Essas áreas constituem aproximadamente à parte granular do córtex pré-frontal (PEDRIDES, 2012).

Todavia, as regiões pré-frontais granulares apresentam alterações sistemáticas na estrutura laminar e, portanto, são divididas em diferentes tipos corticais: granular (homotípica ou eulaminada), com uma camada IV conspícua, e disgranular- que exhibe uma camada IV discreta- (FUSTER, 2015; WISE, 2008), ver Figura 2, A e B. Diversas regiões pré-frontais apresentam mais de um tipo cortical e algumas também possuem partes agranulares (ou seja, não possuem a camada IV). O córtex cingulado anterior agranular (BA24, 25 e 32, em alguns estudos também BA33; Figura 1, A e B, Figura 2, A e B) é uma linha média, região em forma de colar que envolve a parte frontal. O córtex cingulado anterior recebe projeções do núcleo mediodorsal do tálamo e, portanto, alguns consideram essa estrutura como parte do córtex pré-frontal (PREUSS, 1995).



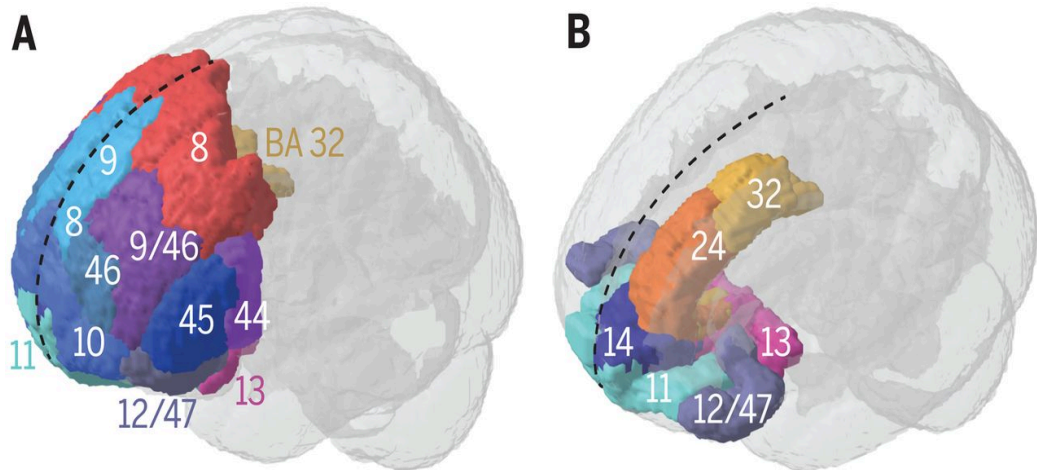


Figura 1 - **Áreas de Brodmann do córtex pré-frontal humano.** Visão ântero-lateral (esquerda) do encéfalo humano. **A.** Desenho esquemático das áreas de Brodmann (BAs) no córtex pré-frontal, incluindo ACg. Note que nem todas as BAs pré-frontais são visíveis. **B.** Ilustração esquemática de BAs mediais e ventrais no córtex pré-frontal, incluindo ACg. A linha preta tracejada indica a linha média sagital (CARLÉN, 2017).

Muitos estudos relatam uma divisão do CPF humano com ênfase na sua organização funcional (MAUNEY *et al.*, 2013; FUSTER, 2015; CARLÉN, 2017). Nos seres humanos, funcionalmente o CPF pode ser subdividido anatomicamente em córtex pré-frontal orbitofrontal (CPFof), córtex pré-frontal dorsolateral (CPFdl) e córtex pré-frontal ventrolateral (CPFvl) que estão conjuntamente relacionados ao comportamento cognitivo complexo, tomada de decisão, regulação de comportamentos sociais direcionados por objetivos, respectivamente (KO, 2017). Apesar de espacial e funcionalmente distintos, os córtices pré-frontais estão conectados por várias redes neurais incluindo córtico-corticais, límbicas, córtico-cerebelares e subcorticais (HENRI-BHARGAVA, 2018).

Anatomicamente, CPFdl abrange várias áreas de Brodmann (BA), incluindo BA 9, BA 8a, BA 8b e a parte dorsal de BA 46 (SALLET *et al.*, 2013). Posteriormente, é inclinado pelo giro pré-central e abrange o giro frontal médio, o sulco frontal superior e o aspecto lateral do giro frontal superior (SEMINOWICZ, 2017). Por sua vez, o CPFvl é uma região quase plana e está adjacente à superfície medial do lobo frontal contralateral, correspondendo às áreas BA 12, BA 24 e BA 32, além de partes das áreas BA 8, BA 9, BA 10 e BA 11. Por fim, o CPFof, ligeiramente côncavo e localizado diretamente acima da órbita, condizentes com as áreas 13, 47, e partes inferiores de 10, 11 e 13 (FUSTER, 2002), ver Figura 1 A e B.

Destes, o CPFdl recebeu interesse especial, pois em primatas esta área cerebral cortical recebe projeções do núcleo mediodorsal do tálamo, enquanto em roedores o núcleo mediodorsal do tálamo não realiza projeções para as áreas frontais dorsolaterais. O CPFdl granular é, portanto, considerado uma especialização dos primatas (WISE, 2008). O núcleo mediodorsal do tálamo tem como alvo os córtices medial e orbital em ratos, como em primatas.

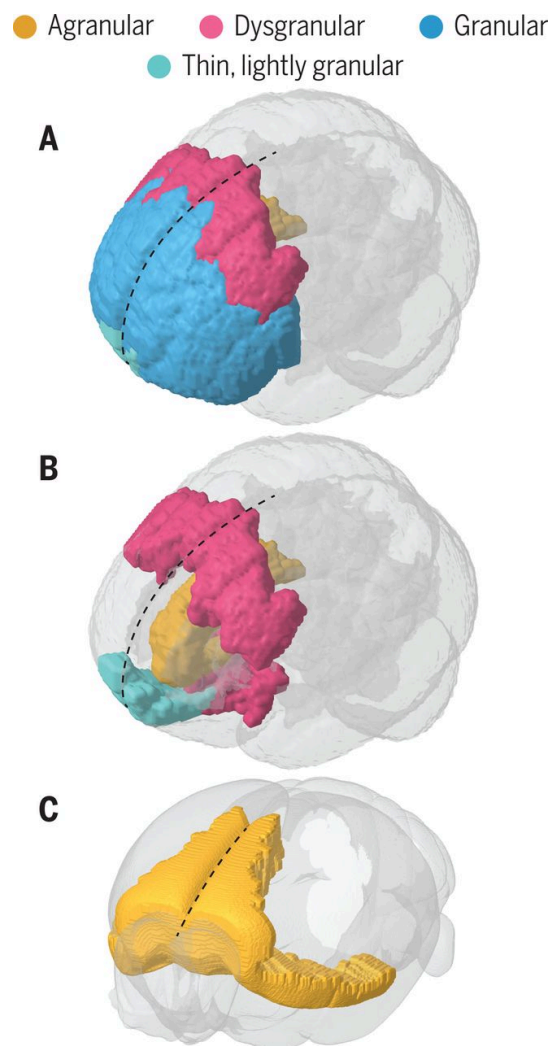


Figura 2 - **Tipos corticais no córtex pré-frontal humano e de camundongo.**

**A e B.** Visão ântero-lateral (esquerda) do cérebro humano. Desenho esquemático das quatro subdivisões funcionais do córtex pré-frontal, incluindo ACg. **C.** Vista frontal inclinada (esquerda) do cérebro do camundongo representando o córtex pré-frontal agranular. A linha preta tracejada indica a linha média sagital (CARLÉN, 2017).

### 1.1.2 Córtex Pré-frontal do rato

O córtex pré-frontal de ratos é essencialmente importante na mediação de várias funções cognitivas (KOLB, 1984; ALVAREZ; EMORY, 2006) e autonômicas (NEAFSEY, 1990; FRYSZTAK; NEAFSEY, 1994), porém essa estrutura anatômica ainda não é totalmente descrita.

Sabe-se que no CPF de ratos há menos áreas no lobo frontal do que primatas, e todas as áreas no CPF são agranulares (Figura 2 C). Às vezes, a citoarquitetura agranular é utilizada como uma definição do CPF do roedor (VAN DER WERD, 2014). As áreas agranulares são compartilhadas por todos os mamíferos (WISE, 2008). Quanto a sua divisão o CPF de roedores pode ser dividido em três áreas principais que incluem o córtex pré-frontal medial (CPFm), córtex pré-frontal ventral (CPFv) e córtex pré-frontal lateral (CPFli) (FUSTER, 2015, LAUBACH *et al.*, 2018). Essas regiões são atores críticos subjacentes às funções executivas, incluindo memória, atenção, tomada de decisão e flexibilidade comportamental (DALLEY *et al.*, 2004; SCHOENBAUM *et al.*, 2009), ver abaixo.

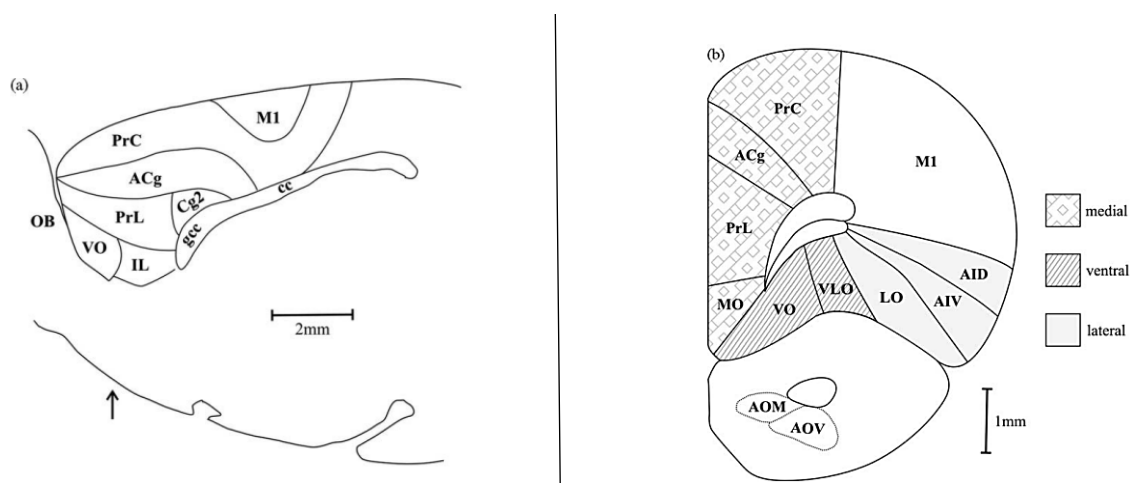


Figura 3 - **Desenho esquemático mostrando regiões e subdivisões do córtex pré-frontal de ratos.** **A:** vista em um plano sagital; **B:** vista em um plano coronal, cujo ponto da secção está indicado pela seta assinalada na em A. Legenda: ACg: córtex cingulado anterior; AID: córtex insular agranular 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).

### 1.1.3 Funções do Córtex Pré-Frontal

Em estudos em primatas, Goldman-Rakic (1995) demonstrou que além das diferenças estruturais entre as sub-regiões do CPF, o processamento neural de

funções cognitivas e emocionais entre as sub-regiões do CPF também é distinto. As funções do CPF são o resultado das inúmeras conexões que esta área mantém com outras regiões cerebrais e não podem ser compreendidas fora de um contexto de conectividade (FUSTER, 2003). Efetivamente, a importância das áreas do lobo frontal deve-se à variabilidade de conexões aferentes e eferentes com quase todas as outras partes do SNC (STUSS; BENSON, 1984).

As funções dos córtices pré-frontais incluem processos cognitivos e socioemocionais, motivacionais, perceptuais, além das funções executivas (HENRI-BHARGAVA; STUSS, 2018). De acordo com Carlén (2017) pesquisas em humanos e animais apontaram papel central das regiões frontais no processamento da cognição, por exemplo, atenção, memória de trabalho e tomada de decisão são funções cognitivas comuns atribuídas ao CPF (CARLÉN, 2017).

O CPF é um importante coordenador de respostas comportamentais, neuroendócrinas e autonômicas. Nos últimos anos, a função do CPFm emergiu como uma área-chave no processamento de tomada de decisão e memória de ordem superior (KESTEREN, 2014). É uma área cerebral cortical relativamente grande em seres humanos, funcionalmente e citoarquiteticamente diversa, cuja conectividade direta com os lobos temporais mediais pode estar subjacente ao seu envolvimento em uma infinidade de tarefas relacionadas à memória (KESTEREN, 2014).

A capacidade de referenciar experiências passadas e gerar uma resposta específica do contexto é atribuída ao CPFm, dado seu papel nas funções executivas, incluindo: planejamento, tomada de decisão e inibição de resposta (MCKLVEEN, 2018). Diversos estudos indicam papel seletivo do CPFm na consolidação e evocação de memórias remotas, memórias adquiridas em um passado distante – ao menos algumas semanas (MAVIEL, 2004; TAKASHIMA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Em contrapartida, outros trabalhos apresentam evidências de que o CPFm também desempenha importante papel no processamento de memórias recentes (NARAYANAN; LAUBACH, 2006; CORCORAN; QUIRK, 2007).

Com base nas descobertas de Warren *et al.*, (2014), o funcionamento do CPFm pode agir como um mecanismo de acesso flexível às memórias baseadas em informações contextuais, incluindo regras e objetivos da tarefa (KROES; FERNÁNDEZ, 2012). Lesões no CPFm levam à uma série de alterações nas tomadas de decisões, julgamento e flexibilidade cognitiva (KESTEREN, 2014).

Por sua vez, a região CPFdl é associada em maior grau à atividade cognitiva e processamento básico para atividade de ordem superior e tem sido considerada uma região cortical cerebral essencial para a retenção ativa da memória de trabalho, apesar de guardar temporariamente informações relevantes para uma dada tarefa (KESTEREN, 2014). A informação retida/mantida na memória de curta duração é submetida ao processamento dos circuitos neurais, o que permite que o ato prospectivo seja realizado com sucesso (SEAMANS, 2008). A memória de trabalho, portanto, tem uma perspectiva futura (FUSTER, 2015). Os paradigmas de resposta tardia são mais frequentemente usados para sondar a memória de trabalho, embora o que é codificado pelo CPFdl durante o atraso tenha sido objeto de debate (LARA, 2015).

Já o CPFo é considerado importante para o entendimento do valor da recompensa e a contingência de recompensa (PADOA-SCHIOPPA, 2011; WALLIS, 2007). O “valor da recompensa”, no contexto atual, refere-se ao valor subjetivo baseado na preferência ou conveniência de um determinado resultado alimentar em oposição ao valor como comumente computado na teoria econômica (probabilidade  $\times$  magnitude). As lesões no córtex orbitofrontal granular de primatas interrompem a capacidade de usar informações sobre a conveniência e a probabilidade de recompensar os resultados para orientar a tomada de decisão (CAMILLE *et al.*, 2011; WALTON *et al.*, 2010).

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, ver Figura 4.

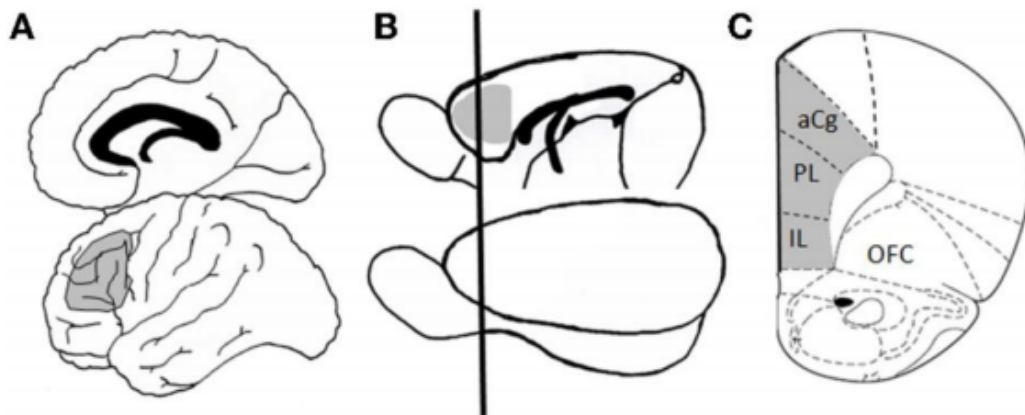


Figura 4 - **Desenhos esquemáticos dos córtices pré-frontais de primatas humanos e de pequenos roedores (rato)**. O córtex pré-frontal de humanos (**A**) e de ratos (**B & C**) que apresentam homologia de função entre si. A região em cinza delimitada em "A" corresponde à área 46 de Brodmann e seu correlata região homóloga visto em "B" e em "C", evidenciando o córtex pré-frontal medial no rato e dorsolateral nos humanos. A linha vertical em "B" determina posição de seccionamento no plano coronal e a visualização frontal no desenho esquemático em "C". Abreviaturas: aCg: córtex cingulado anterior; PL: córtex pré-límbico; PL: córtex infralímbico; OFC: córtex orbito-frontal. *Fonte: Retirado de Bizon et al. (2012).*

Destacamos aqui o papel do CPFdl que recebe aferências diretas das regiões límbicas e áreas multimodais do córtex cerebral, estabelecendo conexões eferentes com a região orbitofrontal do CPF (PANDYA et al., 1998). A riqueza conectiva que o CPFdl mantém com uma diversidade de outras regiões cerebrais, tanto corticais como sub-corticais, implica na dependência (ou funcionamento conjunto) das funções cognitivas desta área em relação às restantes funções do córtex frontal ou estruturas anatómicas subjacentes à hierarquia executiva de processamento neural (FUSTER, 2000).

## 1.2 Plasticidade Neural

O termo "plasticidade", usado pela primeira vez ao SNC em 1890 por William James e posteriormente chamado de "plasticidade neural" em 1948 por Jerzy Konorski é o fenômeno pelo qual o SNC, saudável ou alterado, pode se adaptar em resposta às influências do meio, mudando sua estrutura e/ou função (BOADAS-VAELLO, 2017). De acordo com Johnston (2009) essa maleabilidade do SNC é atingida principalmente pela modulação de subconjuntos de mecanismos celulares, moleculares e genéticos que influenciam a dinâmica das conexões sinápticas e a

formação de circuitos neurais culminando em ganho ou perda de função e/ou comportamento.

A plasticidade neural, também conhecida como neuroplasticidade, é um processo maturacional complexo e geneticamente codificado do tecido nervoso que é estritamente regulado por eventos homeostáticos internos e é influenciado por experiências ambientais externas (ISMAIL, 2017). Dennis (2013) descreve que a plasticidade neural envolve mudanças essenciais na neurogênese, migração de células neuronais, formação de sinapses e especialização de redes neuronais estruturais e funcionais levando à aquisição comportamental que são marcos de desenvolvimento motor, não-motor e de adaptação à um ambiente em constante mudança através da aprendizagem e memória. Esse fenômeno pode ser observado em múltiplas escalas com o comportamento adaptativo, a aprendizagem e a memória estando no topo de sua hierarquia (SHAW, 1994). O mesmo autor destaca que a base dessa pirâmide é formada por moléculas e suas interações, que fundamentam os níveis de circuitos e redes subcelulares / sinápticas, celulares e neuronais.

A plasticidade neural pode ocorrer através do crescimento de novos terminais axonais, do crescimento e reorganização dos dendritos e da ativação de sinapses existentes cujas funções estavam silenciadas por influências inibitórias (DEMARIN, 2014). Tais mudanças podem ocorrer tanto em estruturas já existentes, que nesse caso irão tornar-se capazes de realizar funções de outras regiões, como podem influenciar células neurais a recompor conexões úteis e funcionais danificadas/perdidas, possibilitando assim que funções desejadas sejam realizadas (DEMARIN, 2014).

Esse processo dinâmico que possibilita adaptar-se a diversos estímulos sensoriais e armazenar os aprendizados também é um fator de recuperação após lesão do tecido nervoso visto que a reabilitação objetiva reconstruir as conexões entre os neurônios, “reconectando” as áreas funcionais do SNC (GULYEVA, 2017). O autor supracitado relata que a especificidade da organização do encéfalo, por exemplo, a multiformidade das células e distribuição espacial das células neuronais, e a função chave do cérebro na sobrevivência animal elucidam a necessidade de plasticidade que possibilita mudanças adaptativas na estrutura e funções corticais cerebrais.

Um fato de suma importância é que o SNC mantém capacidade de mudanças funcionais e estruturais ao longo da vida (BOADAS-VAELLO, 2017). De uma

perspectiva biológica, a neurogênese, a sinaptogênese e a poda sináptica representam um dos mais importantes blocos de construção para a plasticidade do SNC. Esses processos biológicos são submetidos a períodos geneticamente programados e limitados no tempo, durante os quais o SNC é mais receptivo a mudanças (MEREDITH, 2015).

### 1.2.1 Período crítico de plasticidade

O intervalo de tempo em que a plasticidade neural está aumentada no início da vida de um indivíduo é conhecido como período crítico de plasticidade (LEBLANC; FAGIOLINI, 2011; SELEMON, 2013). A descrição original do período crítico de plasticidade foi cunhado a partir dos experimentos realizados nos anos 1960-70 em que Hubel e Wiesel realizaram privação monocular precoce em gatos (HUBEL; WIESEL, 1962; 1970). Eles demonstraram que a privação visual durante um certo período do desenvolvimento do SNC jovem leva a alteração permanente e irreversível nas colunas de dominância ocular do córtex visual primário desses animais (HUBEL; WIESEL, 1962). Eles consideraram que a experiência visual durante esse período é “crítica” para o desenvolvimento normal do circuito neural e que a restauração visual normal depende de experiência prévia durante o período crítico de plasticidade e, após esse período, não se corrige mais as “anormalidades” dos circuitos visuais (ISMAIL, 2017). Hoje, sabe-se que há diferentes intervalos de tempo para os períodos críticos das diferentes áreas funcionais do SNC, cada um com sua própria duração ao longo do desenvolvimento. Por exemplo, em muitas espécies, incluindo humanos, existem períodos críticos para o desenvolvimento dos diferentes sistemas sensoriais, comportamento vocal, funções cognitivas e características emocionais (REH, *et al*, 2020).

Segundo Knudsen (2004), existem três pré-requisitos para o início de um período sensível (incluindo crítico) no SNC em desenvolvimento que incluem:

- 1) estabelecimento de circuito confiável e preciso para permitir que ele desempenhe sua função;
- 2) processamento neuronal adequado para as informações adquiridas dos meios externos e internos através de estruturas de rede neural apropriadas contendo conexões excitatórias e inibitórias;



3) A existência de mecanismos de ativação neuronal que permitem plasticidade incluindo, mas não se limitando a, mecanismos de formação de sinapses, poda e consolidação de redes.

É neste intervalo de tempo do desenvolvimento do SNC em questão que as conexões neurais e rearranjos sinápticos se dão com maior dinamismo, pois os sistemas sensoriais, motores e cognitivos estão mais receptíveis e suscetíveis para se adaptarem aos estímulos ambientais, principalmente do ambiente externo, e se modificam/sofrem refinamento em resposta aos estímulos recebidos a partir do meio (LEBLANC; FAGIOLINI, 2011; SELEMON, 2013). A ideia de que o SNC em desenvolvimento tem capacidade intrinsecamente maior de plasticidade neural em comparação com o SNC adulto provém de muitas observações clínicas relativas à capacidade aumentada de aprendizagem e memória em crianças, evidenciada pela facilidade de aprender uma segunda língua com mais rapidez e eficientemente (KLEIN, 2014; LI *et al.* 2014), assim como aquisição de habilidades motoras complexas, como visto na prática musical inicial (BARRETT, 2013) e capacidade de recuperação funcional após lesões cerebrais como demonstrado através da recuperação de habilidades motoras grossas após hemisferectomia (KASTRUP, 2000), ver Figura 5.

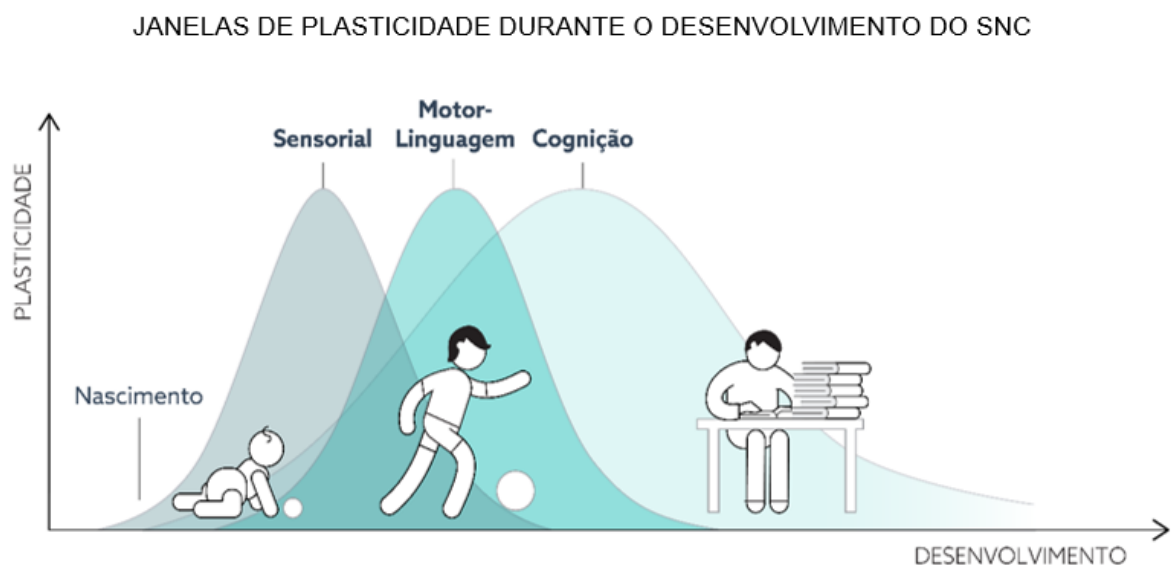


Figura 5 - **Diagrama esquemático das janelas temporais de plasticidade durante o desenvolvimento do SNC.** Períodos críticos de plasticidade do SNC para os sistemas sensoriais (p.ex. visão e audição) ocorrem logo no início da infância e têm fechamentos definitivos no início da adolescência. Períodos críticos de plasticidade para a linguagem e cognição ocorrem mais tardiamente e não fecham completamente, permitindo que alguma plasticidade do SNC persista até o final da vida. Fonte: Adaptado de Hensch (2005). Nature Reviews Neuroscience.

Desta forma, a dinâmica desses eventos plásticos no SNC, embora sempre presentes ao longo de toda a vida, não são constantes em intensidade e tempo à medida em que são mais robustos nas idades precoces de um indivíduo para, em seguida, apresentar num declínio gradual em idades mais tardias, justificando assim as limitações de recuperação funcional do SNC observadas em indivíduos mais velhos (FERNÁNDEZ-BALLESTEROS, 2012), ver Figura 6.

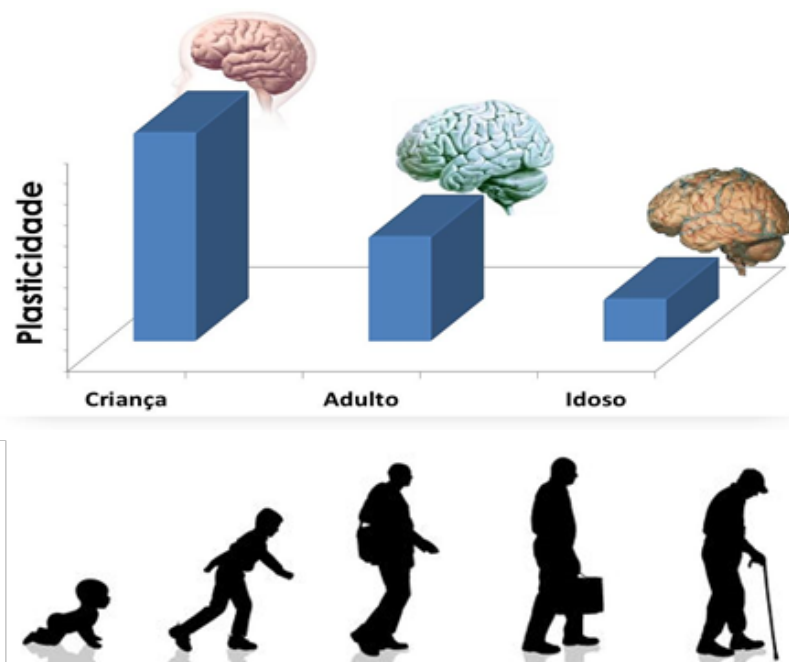


Figura 6 - **A plasticidade neural ao longo da vida.** Diagrama esquemático da intensidade da plasticidade neural em função do tempo de vida. Note que quanto mais tempo de vida, menor a intensidade da plasticidade neural. Fonte: Klebson Rodrigues, Tese de Doutorado, 2015.

Em resumo, os substratos da plasticidade neural presente no desenvolvimento pós-natal do SNC abrangem alterações moleculares, adaptações celulares, alterações eletrofisiológicas, montagem e refinamento de redes neurais estruturais, assim como funcionais, todos esses processos biológicos são vigorosos durante períodos de desenvolvimento conhecido como período crítico de plasticidade e decaem ao longo da vida (ISMAIL, 2017).

### 1.3 Redes Perineuronais

As redes perineuronais (RPNs), um componente especializado da matriz extracelular tipicamente encontrada em torno de neurônios inibitórios, são

consideradas inibidoras da plasticidade (HAYANI; SONG; DITYATEV, 2018). As RPNs foram descritas, pela primeira vez, por Camilo Golgi no final dos anos 1800 como sendo estruturas reticulares (SPREAFICO *et al.*, 1999), mas só recentemente houve foco intenso sobre o papel das RPNs no SNC como aprendizagem, memória, em distúrbios do SNC ou neuropatologias como esquizofrenia, derrame de Alzheimer, epilepsia, autismo e dependência de drogas (SORG *et al.*, 2016).

As RPNs são componentes especializados da matriz extracelular que envolvem o corpo celular, os dendritos proximais e o segmento axonal inicial dos neurônios fisiologicamente maduros que, geralmente, também são parvalbumina (PV) positivos e são críticos para a regulação da plasticidade neuronal (PAYLOR *et al.*, 2018). Seus componentes principais incluem hialuronano (HA), proteínas de ligação, proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs) e tenascina-R (Tn-R). Dentro das RPNs, estas moléculas de MEC formam grandes agregados moleculares estáveis na superfície do corpo de celular e dendritos proximais de neurônios (WANG; FAWCETT, 2012). Dentro do espaço extracelular, CSPGs interagem com cadeias de polímero de HA na superfície celular, as proteínas de ligação estabilizam as interações entre os CSPGs e HA. Já o domínio C-terminal nas proteínas do núcleo CSPG liga-se à proteína trimérica Tn-R para formar a estrutura altamente organizada do RPN (WANG; FAWCETT, 2012). Juntos, estes componentes formam uma matriz extracelular que se manifesta como um revestimento na superfície neuronal, ver Figura 7.

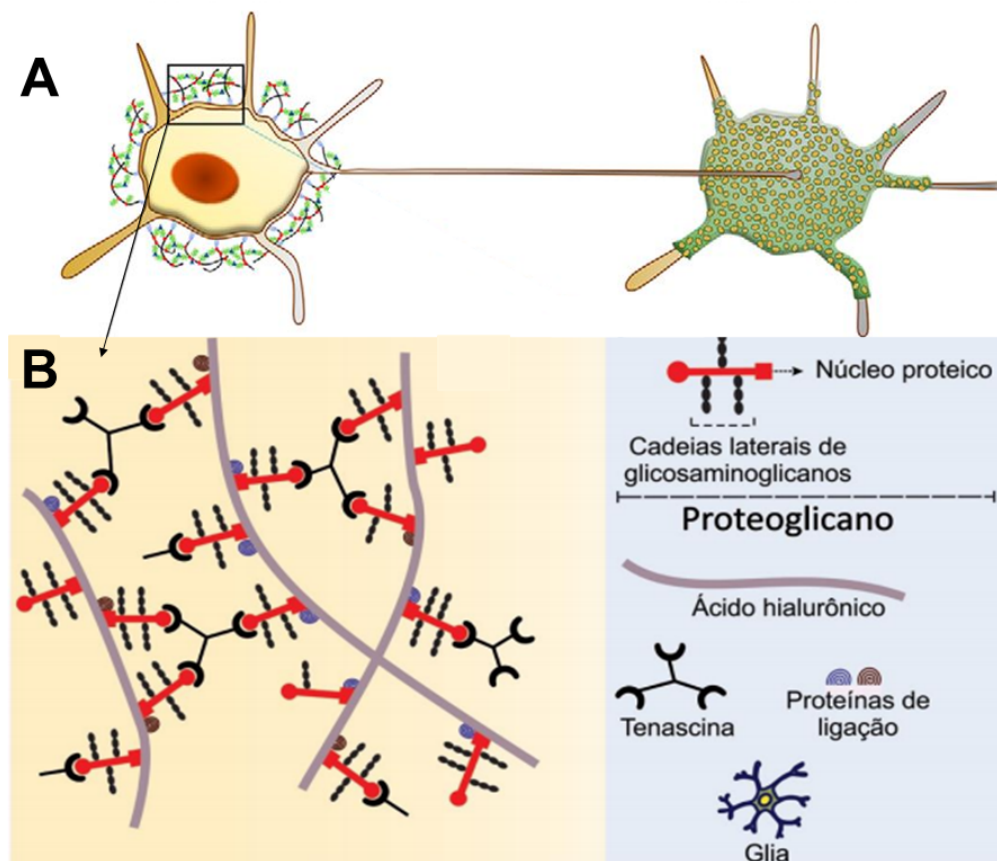


Figura 7 - **Representações esquemáticas das redes perineuronais.** As RPNs são vistas em **A** em torno do neurônio, em **B** com os detalhes de seus constituintes. *Fonte:* Adaptado de Sorg *et al.* (2016) e Rodrigues (2015)

Quanto as funções das RPNs, sabe-se que estas moléculas ajudam a estabilizar as conexões neurais recentemente estabelecidas, além de restringir a plasticidade neuronal, promover proteção neuronal e modular a patogênese de várias doenças do SNC (CARULLI, 2016). As RPNs também possuem um papel importante para manter a homeostase local dos íons (MORAWSKI *et al.*, 2015) e proteger os neurônios contra o estresse oxidativo (CABUNGCAL *et al.*, 2013). Particularmente, as RPNs controlam a atividade e excitabilidade dos neurônios que expressam PV (BALMER, 2016; FAVUZZI *et al.*, 2017). De fato, a atenuação enzimática das RPNs altera a contribuição excitatória para os interneurônios que expressam PV com rápido pico (HAYANI; SONG; DITYATEV, 2018). Ademais, alterações na glicoproteína tenascina-R, que auxilia na estabilização dessas regiões da matriz extracelular, prejudicam a entrada inibitória perissomática nos neurônios piramidais (SAGHATELYAN, *et al.*, 2003).

A formação de RPN é detectada relativamente tarde no desenvolvimento pós-natal do SNC de mamíferos, à medida que o circuito neural e a atividade sináptica do SNC maduro é estabelecido e estabilizado (WANG; FAWCETT, 2012). Sua distribuição é única nas diferentes regiões do SNC, o momento de sua expressão e as mudanças que sofre após lesão do tecido nervoso, todos apontam para funções diversas e importantes que ela pode desempenhar como neuroproteção, estabilização sináptica, desenvolvimento neuronal e plasticidade do SNC (WANG; FAWCETT, 2012). Além disso, várias pesquisas indicaram que as RPNs são essenciais para a aprendizagem e a memória (GOGOLLA, *et al.*, 2009; ROMBERG, *et al.*, 2013).

As RPNs são escassas no início do desenvolvimento do SNC, quando o potencial plástico é geralmente alta, e aumentam em quantidade ao longo da vida pós-natal, particularmente após o final do período crítico de plasticidade (MAUNEY *et al.*, 2013). Dentro período crítico de plasticidade, o tecido nervoso pode sofrer reorganização estrutural e funcional da conectividade neural em resposta ao estímulo apropriado (HENSCH, 2005). Essas mudanças são sucedidas por um período de poda sináptica e, em seguida, estabilização da rede neural a longo prazo (HENSCH, 2005). De acordo com papel na regulação da plasticidade neural, a expressão da RPN aumenta no fechamento do período crítico de plasticidade e a degradação dos RPNs pode, portanto, reabrir essas janelas de maior plasticidade do SNC na idade adulta (PIZZORUSSO *et al.*, 2002; LENSJO *et al.*, 2017).

Estes dados corroboram com estudos que demonstram o papel importante das RPNs nas funções cognitivas. Por outro lado, a perda das RPNs está relacionada a alterações comportamentais em vários distúrbios do SNC (PANTAZOPOULOS; BERRETTA, 2016), porém poucas pesquisas examinaram diretamente o efeito da degradação da RPN na cognição. Slaker *et al.* (2015) apontou que a degradação da RPN no CPFm diminui a frequência de correntes microelétricas inibitórias em células piramidais desta área e prejudica a formação de memória de longa duração (SLAKER *et al.*, 2015).

Os efeitos da degradação da RPN na estrutura e função neuronal ainda são pouco compreendidos, mas podem ser considerados a partir das funções conhecidas das RPNs que segundo Paylor *et al.*, (2018) incluem:

1. Regulação da transmissão GABAérgica;
2. Restrição da plasticidade neural;

### 3. Proteção contra o estresse oxidativo e outros fatores ambientais;

A perda de RPNs também foi relacionada à quebra da homeostase iônica e auxiliar mudanças na atividade funcional dos neurônios, por exemplo, hiperexcitabilidade (BRÜCKNER *et al.*, 2000). As RPNs também desempenham um papel essencial na regulação da plasticidade neural, destacado pelo seu papel regulador de períodos críticos de plasticidade elevada durante o desenvolvimento (TAKESIAN; HENSCH, 2013; SORG *et al.*, 2016).

Segundo Wang e Fawcett (2012), vários mecanismos foram propostos para explicar como as RPNs limitam a plasticidade no SNC e três dos mecanismos possíveis são discutidos abaixo (Figura 8). O primeiro mecanismo possível é através da restrição da formação de novos contatos neuronais (sinapses). Isto pode acontecer devido as capacidades gerais de CSPGs para inibir o crescimento de neuritos ou indiretamente através de receptores para alguns dos componentes das RPNs (WANG; FAWCETT, 2012). O segundo mecanismo possível das RPNs limitar plasticidade neural pode resultar de suas ligações a moléculas que afetam a plasticidade, já que os glicosaminoglicanos (GAGs) de CSPGs interagem entre si como moduladores de crescimento, tais como o fator de crescimento de ligação à heparina como demonstrado *in vitro* (WANG; FAWCETT, 2012). O terceiro mecanismo possível para a ação das RPNs postula que elas possam atuar como um tampão iônico ao redor dos neurônios de disparo rápido de potenciais de ação que são partes das vias inibitórias críticas para a plasticidade durante o período crítico de plasticidades (WANG; FAWCETT, 2012). É, portanto, provável que as RPNs sejam capazes de restringir a plasticidade do SNC através de vários/diferentes mecanismos (WANG; FAWCETT, 2012), ver Figura 8 abaixo.

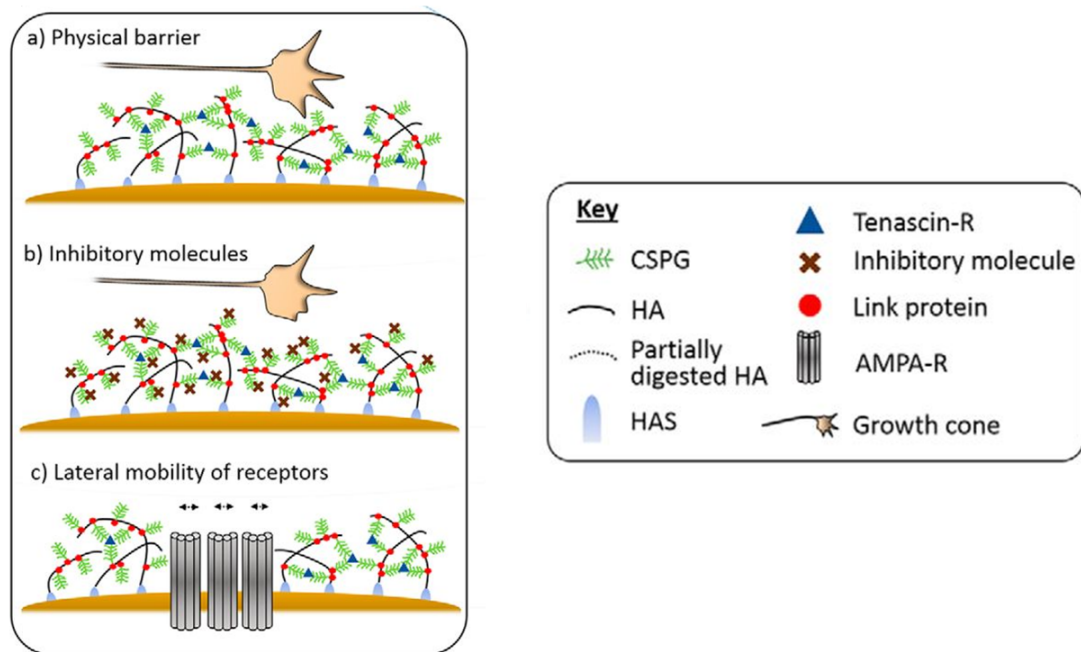


Figura 8 - Diagrama esquemático de três possíveis mecanismos pelos quais as RPNs podem agir para restringir a plasticidade no SNC. **A.** Formação de uma barreira física contra o estabelecimento de novas conexões sinápticas. A presença de RPNs ao redor de dendritos e corpos celulares neuronais pode formar uma barreira física contra o avanço dos axônios. **B.** Atuando como um andaime para a ligação de moléculas que podem então inibir a formação sináptica. **C.** Restrição da mobilidade do receptor nas sinapses, influenciando a troca de receptores; o receptor AMPA é um exemplo conhecido (FRISCHKNECHT *et al.*, 2009). HAS: hialuronano sintase; HA: hialuronano; CSPGs: proteoglicanos de sulfato de condroitina; AMPA-R: Receptor AMPA. Fonte: Adaptado de Sorg *et al.* (2016).

No córtex visual, por exemplo, o aparecimento de RPNs coincide com o fechamento do período crítico para a plasticidade das colunas de dominância ocular e a sua remoção, através do uso da enzima bacteriana Condroitinase-ABC (ChABC), reabre a janela do período crítico de plasticidade e permite a remodelação/reorganização das colunas de dominância ocular em animais adultos (SLAKER; HARKNESS; SORG *et al.*, 2016). Da mesma forma, injeções de ChABC no córtex visual de camundongos adultos podem melhorar a dinâmica da coluna de dominância ocular e contribuir para a plasticidade sináptica funcional a longo prazo (PIZZORUSSO *et al.*, 2006; DE VIVO *et al.*, 2013). Fenômeno semelhante envolvendo a degradação de RPN, acontece nas células piramidais do hipocampo que, após o uso de microinjeções de ChABC, apresenta aumento da dinâmica de formação de novas sinapses (ORLANDO *et al.*, 2012). Portanto, é possível que as RPNs determinem o fechamento do período crítico de plasticidade no tecido nervoso e

descrever sua dinâmica espacial e temporal pode ser decisivo para a determinação da janela de tempo de período crítico de plasticidade no CPF.

#### **1.4 Justificativa**

As RPNs têm sido fortemente estudados por suas contribuições para o período crítico de plasticidade dentro do sistema visual, sistema motor e sistema somatossensorial (PIZZORUSSO *et al.*, 2002; BARRITT *et al.*, 2006; MASSEY *et al.*, 2006). A janela de tempo de desenvolvimento para a formação do RPNs é significativa, pois delimita o período em que a plasticidade começa a sofrer declínio e quando o período crítico termina (SORG *et al.* 2016).

Nesse cenário, a presente pesquisa, propõe descrever, pela primeira vez, a distribuição espacial e temporal das RPNs no CPF de pequenos roedores (ratos) e, assim, determinar qual a janela temporal do período crítico de plasticidade desta área cerebral cortical assim como determinar o início da fase fisiologicamente adulta do CPF de ratos.

#### **1.5 Hipótese**

H<sub>0</sub>: A distribuição espacial e temporal das RPNs durante o desenvolvimento pós-natal de ratos estão relacionadas ao período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal em ratos e podem ser usadas como seu marcador biológico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Descrever a distribuição espacial e temporal das redes perineuronais no CPFm de ratos durante o desenvolvimento pós-natal para ser usada como referência de duração do período crítico de plasticidade do CPFm.

### **2.2 Objetivos Específicos**



- a) Quantificar o número total de células com RPN durante o desenvolvimento pós-natal do CPFm de ratos da linhagem *Wistar*;
- b) Correlacionar a quantidade de células com RPN o final do período crítico de plasticidade do CPF.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais de experimentação

Neste projeto, foram utilizados 21 ratos jovens (*Rattus norvegicus*), todos machos da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério central da Universidade Federal do Pará (UFPA), com massa corporal variando entre 50g e 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 3 animais, sob condições ambientais controladas de temperatura ( $27^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ), ventilação adequada à circulação, luminosidade (12 horas de claro e 12 horas de escuro), acesso à água e ração (Labina – Purina) *ad libitum* e liberdade de movimentos aos animais dentro das caixas padrão de biotério. 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) 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>).

#### 3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em sete grupos experimentais, compostos por 3 animais cada grupo, conforme descrito abaixo:



Figura 9 - Diagrama esquemático representativo dos grupos experimentais e da linha de tempo de vida pós-natal (em dias) dos animais em cada grupo.

### 3.3 Perfusão e fixação do tecido nervoso

Nos tempos de vida estipulados no presente projeto (7, 14, 20, 26, 58, 75 e 135 dias pós-natal, respectivamente – ver Figura 9), 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 por via intraperitoneal (i.p.), respectivamente, e então foram 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% durante 24 horas. Após isso, os encéfalos foram separados e submersos sequencialmente em solução de sacarose a 10, 20 e 30% para crioproteção. Os encéfalos foram então seccionados no plano coronal a uma espessura de 60 µm em um criostato (Leica CM 1900).

### 3.4 Processamentos histológicos

Realizamos reação histoquímica para a lectina *Vicia villosa* aglutinina que marca as RPNs, o que nos permite avaliar o curso temporal de surgimento e a localização espacial durante o desenvolvimento pós-natal das RPNs no CPFm, além de permitir a marcação e a quantificação de corpos celulares.

#### 3.4.1 Histoquímica para marcação das RPNs com a lectina *Vicia villosa*

As secções histológicas foram coletadas em tampão fosfato (PB) 0,1M e em seguida foram 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 biotinilada (Sigma-Aldrich), 6% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 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 foram incubadas por 8 horas ininterruptas numa solução contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (complexo ABC, Vector Lab – PK 6000) e Triton X-100 (Sigma-Aldrich) a 3% diluídos em PB 0,1 M. Após nova lavagem em PB 0,1M por 20 minutos, as secções seguiram para a etapa de reação da marcação da lectina *Vicia villosa* 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.

#### 3.4.2. Desidratação e Montagem das Lâminas Histológicas

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

### 3.5 Estereologia

Para a contagem do número total de células *Vicia villosa* positivas (Vv+), utilizamos o método estereológico para quantificação das RPNs positivas (células Vv+). Utilizamos o método do fracionador óptico que consiste em uma estimativa imparcial e sistemática para uma dada população de células, as Vv+ no caso do presente projeto, a partir de uma amostra aleatória que correspondem ao tecido nervoso da região do CPFm do encéfalo de ratos em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal. Para estimar a quantidade total de células, utilizamos o programa *Estereologer* (versão 2.1). A estimativa do número total de células Vv+ marcadas foi realizada usando caixas de contagem com área de 2500  $\mu\text{m}^2$  para o CPFm, no hemisfério direito.

### 3.6 Análises Quantitativas

Para análise quantitativa do número total de células marcadas pela histoquímica da lectina *Vicia villosa* aglutinina, as células Vv+ foram contadas usando-se um microscópio binocular de luz transmitida (Opto 4 – Nikon, Japão) equipado com gradícula de contagem (0,0625  $\text{mm}^2$ ) com objetiva de 40x e equipado com platina motorizada acoplada à um computador que utiliza o programa de computação *Stereologer*. O número total de células Vv+ contadas foram tabulados e usados para

análise estatística e os resultados foram expressos em médias com os respectivos desvios-padrão do número total de Células Vv+ em cada grupo experimental.

### 3.7 Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se análise de variância de uma via e pós-teste de correção de *Tukey*. O nível de significância estipulado é de  $p < 0,05$  (ANOVA, um critério, *post-hoc Tukey*,  $p < 0,05$ ). A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas com o auxílio do programa de computação *GraphPad (Prism 5.0)*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Distribuição das RPNs no CPFm de roedores

Durante o desenvolvimento pós-natal do CPFm de ratos, usando-se a histoquímica para a lectina *Vicia villosa* (Vv) biotinizada, demonstramos que não existem RPNs em idades precoces do desenvolvimento pós-natal do animal, correspondendo aos dias pós-natal P7, P14 e P20 (Figura 10).

A marcação Vv+ foi primeiramente evidente em P26 visto nas supragranulares com a presença do envelope neuronal das RPNs por meio de manchas difusamente separadas por regiões de menor intensidade de marcação, ainda sem a forma peculiar das RPNs comumente vistas em animais adultos (Figura 11). Nossos resultados demonstram que as RPNs pode ser identificada pela primeira vez na região do córtex pré-central (PrC) e córtex cingulado anterior (ACg) do CPFm localizadas dorso-lateralmente a região medial do hemisfério cerebral.

Em P58, a marcação difusa de Vv+ ainda estava presente. No entanto, também encontramos marcação de RPN maduras, porém em menor quantidade. Considerando a organização citoarquiteticamente, em P58 as RPNs já estão presentes nas camadas supra e infragranulares das sub-regiões PrC, ACg e Córtex Pré-Límbico (PrL) localizadas medial e dorso-lateralmente a região medial do hemisfério cerebral (Figura 12). Nos grupos P75 e P135, as quantidades de PNNs nas

sub-regiões PrL e córtex infralímbico (IL) aumentaram gradualmente e sua marcação seguiu bem delimitada em PrC e ACg.

Assim, a disposição espacial das RPNs foi marcada tanto nas camadas mais profundas quanto nas camadas mais superficiais do córtex cerebrais e em sua disposição dorsal e ventral, principalmente nas sub-regiões PrC, ACg e PrL localizadas medial e dorso-lateralmente a região medial do hemisfério cerebral.

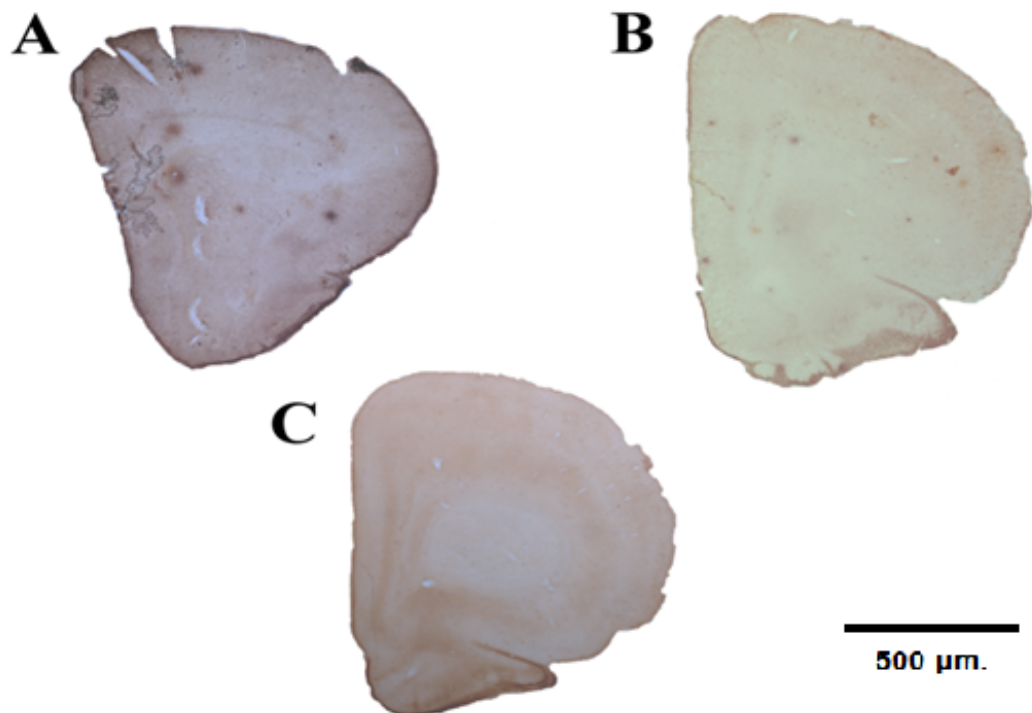


Figura 10 - **Fotomicrografia do hemisfério esquerdo de animais com idades precoces.** No CPFm em A, animal com 7 dias pós-natal, em B animal com 14 e em C animal com 20 dias pós-natal, respectivamente. Note que não há neurônio Vv+ marcado. Aumento de 10x com reação histoquímica para a lectina *Vicia villosa*.

#### 4.1.1 Surgimento das RPNs no CPFm e o número total de células com RPN durante o desenvolvimento pós-natal do córtex pré-frontal de ratos da linhagem Wistar

O surgimento das RPNs, assim como o gradual aumento quantitativo do número total de células Vv+ e contado pelo método estereológico *Estereologer*, pode ser identificada pela primeira vez nos animais do grupo P26 (Figura 11) em que o CPFm já apresenta neurônio Vv+ marcada pela lectina *Vicia villosa* biotinilada (P26D=6,83s ± 4 1,94; P26E=7,33 ± 1,63; P26=7,08 ± 1,73).

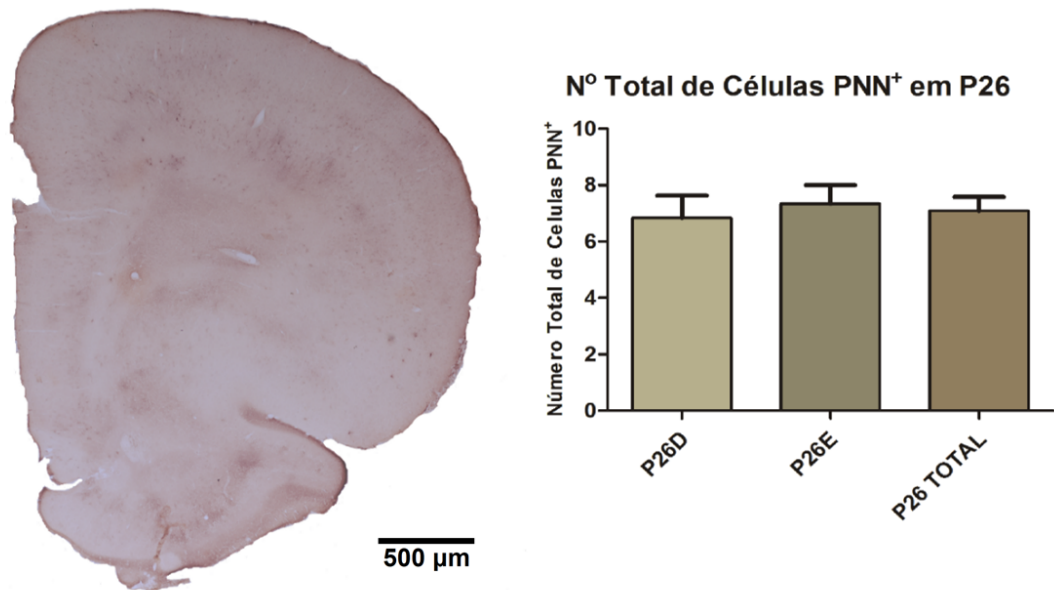


Figura 11 - Fotomicrografia do hemisfério esquerdo de animais com 26 dias pós-natal e análise estatística da contagem de RPNs em ambos os hemisférios. P26D = Animais com 26 dias pós-natal, CPF do hemisfério cerebral direito; P26E = Animais com 26 dias pós-natal, CPF do hemisfério cerebral esquerdo; P26 = 7 Animais com 26 dias pós-natal, média total CPF do número de células Vv+ de ambos os 8 hemisférios cerebrais. Não há diferença estatística entre o número de Vv+ marcadas no CPFm 9 do hemisfério cerebral direito e o número de Vv+ marcadas no CPFm do hemisfério cerebral 10 esquerdo dos animais P26. Aumento de 10x com reação histoquímica para a lectina *Vicia villosa*.

#### 4.1.2 Amadurecimento das RPNs e fechamento do período crítico de plasticidade no CPFm

Em P58, as RPNs já estão bem definidas, entretanto o número de redes imaturas é maior do que aquelas consideradas maduras. A partir de P58 ocorre aumento considerável das RPNs com perfil maduro, em detrimento das mais imaturas, como é visto em P75 (Figura 13), em que demonstramos que havia o dobro de neurônios Vv+ marcado em relação aos animais do grupo P26 (P75D=14,00 ± 2,60; P75E=15,33 ± 4,22; P75=14,83 ± 3,48). Esse aumento no número de células Vv+ continua em idades posteriores até P135, quando a grande maioria das RPNs apresenta perfil maduro, onde o CPFm apresenta mais neurônios Vv+ marcado em relação aos animais do grupo P75 (P135D=20,67 ± 4,08; P135E=19,83 ± 2,71; P135=20,25 ± 3,33). (Figura 14).



Figura 12 - Fotomicrografia do hemisfério cerebral esquerdo apresentando o CPFm de animais com 58 dias pós-natal. Note que as RPNs já estão bem definidas. Entretanto o número de redes imaturas é maior do que aquelas consideradas maduras. Aumento de 20x com reação histoquímica para a lectina *Vicia villosa*.

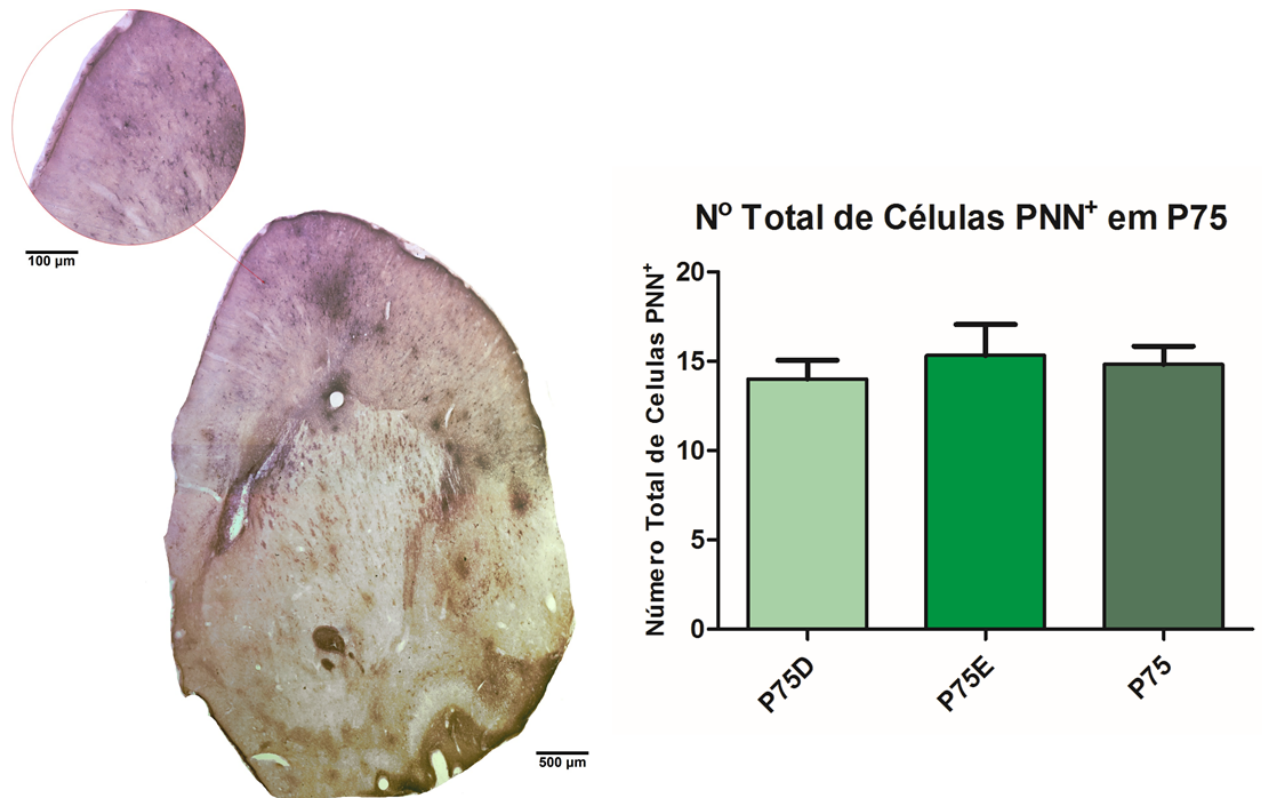


Figura 13 - Fotomicrografia do córtex pré-frontal de animais com 75 dias pós-natal e análise estatística da contagem de RPNs em ambos os hemisférios. Aumento de 20x com reação histoquímica para a lectina *Vicia villosa*. P75D = Animais com 75 dias pós-natal, CPF do hemisfério cerebral direito; P75E = Animais com 75 dias pós-natal, 7 CPF do hemisfério cerebral esquerdo; P75 = Animais com 75 dias pós-natal, média total CPF do número de células Vv+ de ambos os hemisférios cerebrais. Não há diferença estatística entre o número de Vv+ marcadas no CPFm do hemisfério cerebral direito e o número de Vv+ marcadas no CPFm do hemisfério cerebral esquerdo dos animais P75.



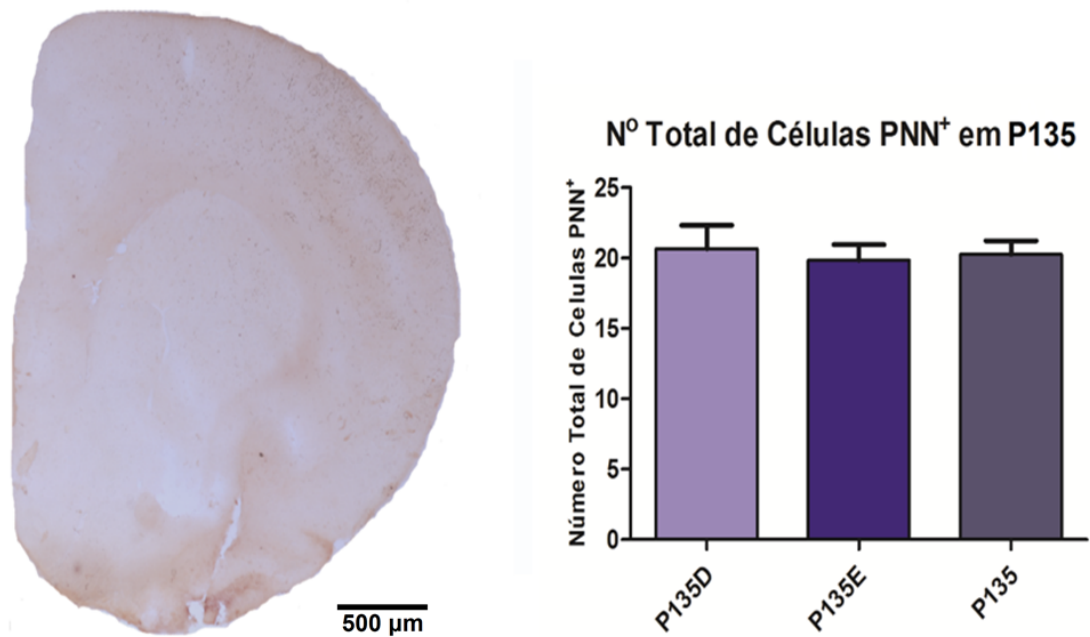


Figura 14 - **Fotomicrografia do córtex pré-frontal de animais com 135 dias pós-natal e análise estatística da contagem de RPNs em ambos os hemisférios.** Aumento de 10X com reação histoquímica para a lectina *Vicia villosa*. P135D = Animais com 135 dias pós-natal, CPF do hemisfério cerebral direito; P135E = Animais com 135 dias pós natal, CPF do hemisfério cerebral esquerdo; P135 = Animais com 135 dias pós-natal, média total CPF do número de células Vv+ de ambos os hemisférios cerebrais. Não há diferença estatística entre o número de Vv+ marcadas no CPFm do hemisfério cerebral direito e o número de Vv+ marcadas no CPFm do hemisfério cerebral esquerdo dos animais P135.

Ao final, nossos resultados demonstram que o fechamento do período crítico de plasticidade no CPFm de ratos da linhagem *Wistar* criados em condição padrão de laboratório ocorre a partir de P75.

#### 4.1.3 Distribuição das redes perineuronais no CPFm

Quanto à distribuição espacial de células com RPNs com perfis maduros e imaturos no CPFm é possível observar que há um aumento progressiva de RPNs com perfil imaturo e um aumento concomitante de RPNs maduras no CPFm.

A partir da análise do número de células Vv+ marcadas nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo, representadas abaixo em forma de gráfico *box plot* (Figura 16), demonstramos que não há diferença significativa entre o número de células Vv+ nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo de animais com a mesma idade ( $P < 0,63$ ). Entretanto, o número de células Vv+ aumenta com o passar do tempo ( $P < 0,001$ ; Anova com pós-teste de 6 Tukey).

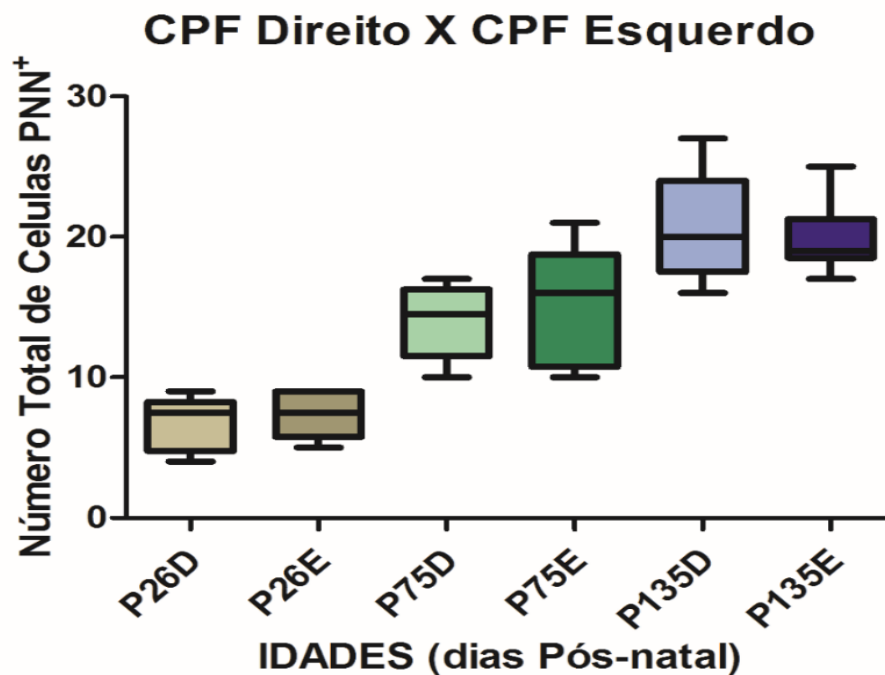


Figura 15 - Gráfico *box plot* representativo do número de células Vv<sup>+</sup> marcadas nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo. Note que não há diferença estatística entre o número de células Vv<sup>+</sup> nos hemisférios cerebrais de animais com a mesma idade ( $P < 0,63$ ). Entretanto, o número de células Vv<sup>+</sup> aumenta com o envelhecimento ( $P < 0,001$ ; Anova com pós-teste de Tukey).

Além disso, ao analisar o número de células Vv<sup>+</sup> marcadas nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo e número total de células Vv<sup>+</sup> marcadas por idade, demonstramos que não há diferença entre o número de células Vv<sup>+</sup> no CPFm nos hemisférios cerebrais direito ou esquerdo, mas há diferença da quantidade de células Vv<sup>+</sup> positivas marcadas entre os animais com idades diferentes, anova de uma via:  $P < 0,001$ ;  $F = 51,46$  e  $R \text{ square} = 0,80$ ), ver figura abaixo.

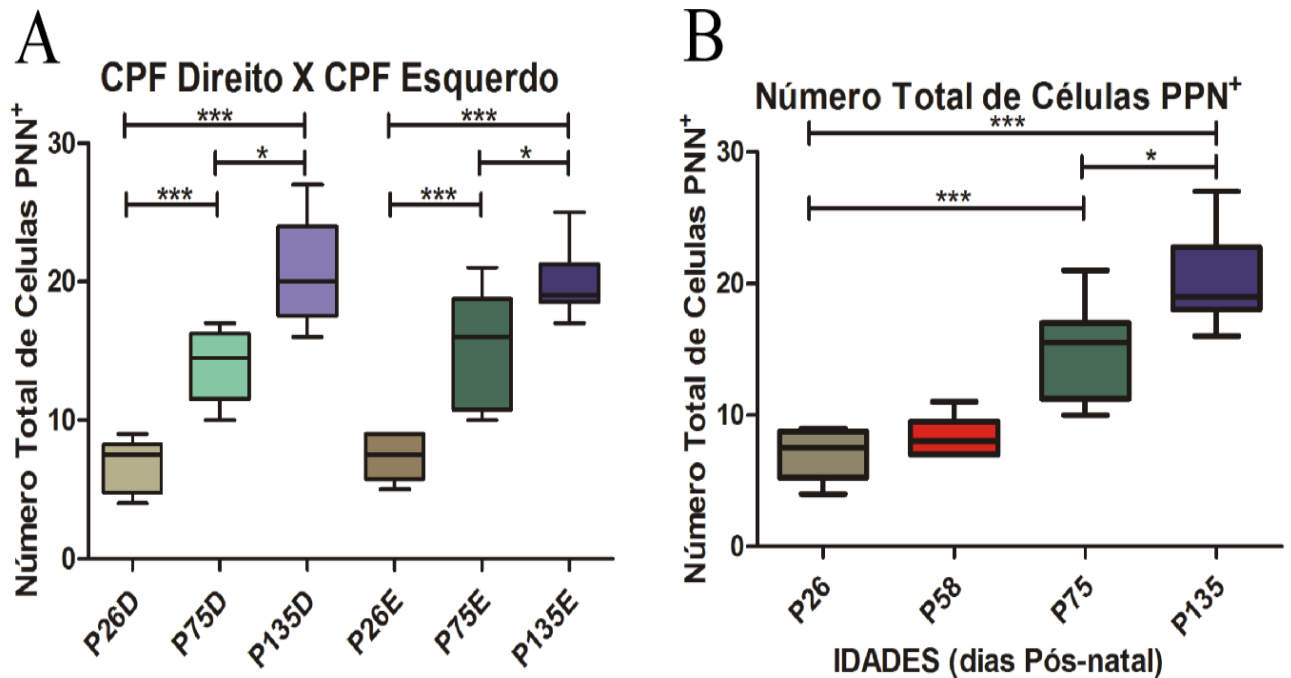


Figura 16 - Gráfico *box plot* representativo do número total de Vv<sup>+</sup> marcadas nos hemisférios cerebrais direito e esquerdo e total por idade. Note que há diferença entre o número de células Vv<sup>+</sup> no CPFm nos hemisférios cerebrais direito ou esquerdo em animais com idades diferentes e também entre o número de neurônios Vv<sup>+</sup>totais (HD+DH). Anova de uma via:  $P < 0,001$ ;  $F = 51,46$  e  $R \text{ square} = 0,80$ .

## 5. DISCUSSÃO

A MEC do SNC regula diversos eventos durante o desenvolvimento pré e pós-natal, que vão desde a neurogênese/gliogênese à formação de circuitos neurais e, assim, afeta respostas à danos no tecido nervoso, plasticidade neural e regeneração (CARULLI, 2016). Carulli e colaboradores (2016) relatam que ao final do período crítico de plasticidade, uma estrutura especializada da MEC chamada rede perineuronal deposita-se em torno de subpopulação de neurônios, ajudando a estabilizar as conexões sinápticas recém estabelecidas.

Segundo Fawcett e colaboradores (2019) as RPNs são agregados de moléculas da matriz extracelular especializada envolvendo o corpo celular, os dendritos proximais e os segmentos iniciais dos axônios de vários neurônios no SNC fisiologicamente maduro possuindo orifícios nos quais estão contidos botões sinápticos em torno dos neurônios inibitórios e excitatórios do córtex cerebral à medula espinhal (CARULLI; VERHAAGEN, 2021). Outros estudos demonstram que as RPNs

são bem desenvolvidas em várias espécies, incluindo camundongos, ratos, porquinhos-da-índia, gatos, cães, ovelhas, macacos e humanos (SEEGER, 1994; HÄRTIG, 1995; HAUSEN, 1996; BRÜCKNER, 2003; VIDAL *et al.* 2006).

No presente trabalho, descrevemos a distribuição espacial e temporal das RPNs no CPFm de ratos da linhagem *Wistar* desde o nascimento até a fase adulta do desenvolvimento pós-natal e, deste modo, tornar possível a determinação da janela temporal do período crítico de plasticidade desta área cortical cerebral e também determinarmos o início da fase fisiologicamente adulta do CPF de ratos.

Nos últimos anos, diversas funções das RPNs foram descritas, por exemplo, restrição da plasticidade neuronal, proteção neuronal e modulação da patogênese de várias doenças do SNC (CARULLI, 2016). Elucidar os mecanismos pelos quais as RPNs agem é desafiador, contudo, possuem um grande potencial terapêutico para o tratamento de várias condições do SNC (CARULLI, 2016). Diversos métodos são utilizados para identificar as RPNs, incluindo aglutininas de plantas como a Vv, que tem alta afinidade para os resíduos N-acetilglucosamina presentes nos proteoglicanos (SEEGER, 1994; BERTOLOTTI, 1996). Na presente investigação, utilizamos a lectina *Vicia vilosa* biotinilada para demonstrar as RPNs no CPFm de ratos em várias etapas do desenvolvimento pós-natal destes animais para determinar o período crítico de plasticidade do CPFm.

## **5.1 Distribuição temporal das RPNs no CPFm de roedores**

### **5.1.1 Surgimento das RPNs no CPFm**

Vários estudos demonstram que os neurônios com RPNs estão amplamente distribuídos em todo o SNC e (DICK, 2013; NAKAMURA *et al.*, 2009; GIAMANCO, MORAWSKI, MATTHEWS, 2010), mais que isso, existem várias evidências de que há um padrão incremental tempo-dependente de expressão, formação e aparecimento das RPNs associados ao desenvolvimento pós-natal do SNC (NOWICKA *et al.*, 2009; MIYATA *et al.*, 2012; NABEL; MORISHITA, 2013). Mais especificamente, sua maturação coincide com o encerramento de períodos críticos de plasticidade em muitas regiões do SNC (REH, 2020). Em mamíferos, estudos demonstraram que as RPNs são formadas no final do período crítico para a plasticidade nas colunas de dominância ocular no córtex visual de ratos

(PIZZORUSSO *et al.*, 2002), para a plasticidade do córtex em barril induzida por criação *univibrissa* (NOWICKA *et al.*, 2009) e para sensibilidade à leptina de neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo que regulam a ingestão de alimentos e o metabolismo energético (MIRZADEH *et al.*, 2019).

O início e o fechamento dos períodos críticos de plasticidade do SNC são controlados por diversos mecanismos moleculares e celulares (REH, 2020). No presente trabalho, demonstramos que o há pelo menos um “controle molecular” no padrão de maturação e fechamento do período crítico de plasticidade do CPFm de ratos, ou seja, à medida que os animais se desenvolvem do período peri e pós-natal até a idade adulta, as RPNs vão sendo expressas concomitantes, surgindo no CPF logo após o fechamento do período crítico de plasticidade e aumentando o número de neurônios Vv+ com o aumento de idade.

As RPNs aparecem primeiro no tecido nervoso do CPFm em torno do 26 dia pós-natal (P26) e aumenta gradualmente com a idade. Diversos estudos têm demonstrado que este mesmo fenômeno de expressão temporal das RPNs acontece em outras áreas corticais cerebrais assim como diferentes regiões do SNC, muitas vezes coincidindo com o final de janelas dos períodos críticos de plasticidade sináptica (HORII-HAYASHI, 2015; HENSCH, 2005). Contudo, é importante ressaltar que nossos resultados demonstram que não houve marcação de RPNs no CPFm de ratos nas idades pós-natal P7, P14 e P20, por isso estamos assumindo que o CPFm amadurece de forma mais lenta quando comparado com outras áreas cerebrais corticais de ratos.

Quanto à distribuição espacial das RPNs no CPFm, considerando que o CPF do rato pode ser descrito por diversos critérios neuroanatômicos distintos com base na conectividade e citoarquitetura: sub-regiões (ACg, IL, PL) (GROENEWEGEN, 1988, RAY; PRICE, 1992), camadas médio-laterais: camada I (principalmente axônios), camadas II/III e camadas V/VI (BRODMANN, 1909), fibras dopaminérgicas aferentes do mesencéfalo ventral, e até mesmo combinar esses padrões mencionados (THIERRY *et al.*, 1973; UYLINGS; VAN EDEN, 1990; WILLIAMS; GOLDMAN-RAKIC, 1998). O CPFm, que se localiza em uma posição dorsal ao joelho do corpo caloso (UYLINGS; VAN EDEN, 1990). Essa região é agranular e a aferência para estruturas subcorticais surge tanto das camadas infragranulares (V/VI) quanto das camadas granulares II/III (HEIDBREder; GROENEWEGEN, 2003).

A regiões dorsais do PFCm (PrC e ACg), devido às ricas conexões com áreas corticais sensório-motoras e associativas estão relacionadas a vários comportamentos motores, enquanto a região ventral do PFCm (IL e PL), por causa das densas conexões com a amígdala, córtex temporal e outros córtices associativos límbicos tem sido associada com processamento relacionados às emoções, cognição e à memória (HEIDBREder; GROENEWEGEN, 2003).

Segundo Seeger *et al.* (1994) e Ueno *et al.* (2017) com a expressão das RPNs é possível afirmar que elas possuam funções únicas em cada uma das subdivisões de PFCm. Por exemplo, no PL e IL são diferentemente alterados em padrões específicos de idade e sexo após estresse no início da vida (GILDAWIE *et al.* 2020).

#### 5.1.2 Amadurecimento das RPNs e fechamento do período crítico de plasticidade no CPFm

O período de formação das RPNs difere entre áreas cerebrais distintas, sustentando a ideia de que a maturação das RPNs está funcionalmente relacionada ao fechamento de períodos críticos para a aquisição de funções específicas (CARULLI, 2016).

De uma perspectiva biológica, a neurogênese, a sinaptogênese e a poda sináptica representam os blocos de construção para a plasticidade do SNC e esses processos biológicos são submetidos a períodos geneticamente programados, limitados no tempo e chamados de períodos críticos ou sensíveis à plasticidade durante os quais o SNC é mais receptivo a mudanças e adaptações a partir de estímulos do meio (ISMAIL, 2017).

A partir de P26 do desenvolvimento pós-natal é possível visualizar apenas o envelope neuronal das RPNs, o que significa que as redes ainda estão em seu estágio imaturas de expressão e desenvolvimento. Em animais com P58, as RPNs já se apresentam amadurecidas, porém a partir de P75 aumenta-se o número de RPNs maduras e esse crescimento da quantidade de RPNs maduras também é visto em P135. Resultados disponíveis na literatura demonstram que outras áreas corticais cerebrais de roedores apresentam surgimento mais precoce das RPNs, cujo período crítico de plasticidade fecha antes de P30 (BAHIA, 2008). Como esperado para o CPFm, entretanto, demonstramos que a forma madura das RPNs é prevalente em

idades mais avançadas, por volta dos 3 meses de idade, quando os animais já são considerados adultos jovens (RODRIGUES, 2016).

As RPNs estão distribuídas em quantidade desigual por todo o encéfalo e medula espinhal (NAKAMURA *et al.*, 2009). Elas se formam durante o desenvolvimento em diferentes taxas de surgimento e de amadurecimento (BRÜCKNER, 2000; BRÜCKNER, 2001), completada no início da idade adulta no córtex cerebral de roedores (PIZZORUSSO *et al.*, 2002). A ideia de que os RPNs efetivamente contribuem para o fim dos períodos críticos surgiu quando foi demonstrado que a digestão de CS-GAGs pela enzima condroitinase ABC (ChABC) restaura os níveis de plasticidade semelhantes a períodos críticos no SNC adulto (CARULLI; VERHAAGEN, 2021). A janela de tempo de desenvolvimento para a formação das RPNs é significativa porque marca o período em que a plasticidade neural é grandemente reduzida, já que os dois fenômenos aparentemente são inversamente proporcionais, e marca quando o período crítico de plasticidade termina.

Embora componentes da MEC tenham sido implicados na promoção da plasticidade sináptica, as RPNs, uma forma especializada de MEC tipicamente encontrada em torno de neurônios inibitórios, parecem inibir a plasticidade (DITYATEV; RUSAKOV, 2011). Os CSPGs, componente das RPNs, mostraram inibir o crescimento axonal (WARREN, 2018), portanto, o surgimento das RPNs pode ser usado como um bioindicador do fechamento do período crítico de plasticidade.

Embora a aprendizagem seja possível ao longo da vida, ela é aprimorada durante janelas de oportunidade específicas das regiões do SNC envolvidas (HENSCH, 2005). A capacidade de plasticidade sináptica e, conseqüentemente, de aprendizado e memória não é constante ao longo da vida; muitas vezes atinge um pico relativamente breve após o nascimento e depois declina, a taxas variáveis, com o aumento da idade em diferentes taxas de amadurecimento e fechamento do período crítico de plasticidade (HUBENER, 2014). Com a deposição das RPNs durante o desenvolvimento pós-natal, acredita-se que essas estruturas funcionem para atenuar a plasticidade sináptica durante o fechamento de períodos críticos. Por exemplo, estudos demonstraram uma associação entre a presença e ausência das RPNs no córtex visual e o fechamento e reabertura da plasticidade da dominância ocular, apoiando fortemente o papel das RPNs em limitar a plasticidade dependente de experiência sensorial prévia (CARULLI; VERHAAGEN, 2021).

As RPNs está vinculada à limitação da plasticidade neural seja devido à sua associação com neurônios não piramidais, ou seja predominantemente neurônios inibitórios, especificamente interneurônios positivos à proteína parvalbumina (CARSTENS, 2016). No nível microestrutural, há evidências de que as RPNs restringem o crescimento de neuritos (axônios e dendritos em crescimento) e o desenvolvimento de novos botões sinápticos (WARREN, 2018). No nível sináptico, as RPNs compartimentam a superfície neuronal e restringem a mobilidade dos receptores de glutamato, fornecendo assim suporte para a plasticidade sináptica, estabilizando as sinapses formadas (CARSTENS, 2016).

### 5.1.3 Quantidade de células com RPN o final do período crítico de plasticidade do córtex pré-frontal

A quantidade de células que apresentam RPN e sua distribuição espacial no CPFm demonstram que há diminuição progressiva do número de células com RPNs de perfil imaturo e um aumento concomitante progressivo no número de células com RPNs de perfil maduras no CPFm. Neste sentido, Begum e colaboradores (2017) sugerem que as RPNs consolidam o estado de maturação das conexões sinápticas atuando como um freio estrutural de matriz extracelular do tecido nervoso à plasticidade sináptica (BEGUM, 2017) e a expressão de moléculas que formam as RPNs coincide com o fechamento do período crítico durante o desenvolvimento do SNC (DZYUBENKO, 2016).

Desta forma, como as RPNs contribuem para o fechamento de períodos crítico, a degradação das RPNs pode, por exemplo, reabrir a janela de oportunidade plástica do SNC aos níveis juvenis de plasticidade nas colunas de dominância ocular no córtex visual primário de ratos adulto (CARULLI *et al.* 2010; PIZZORUSSO *et al.* 2002) e aumentar a plasticidade sináptica no córtex peririnal (ROMBERG *et al.* 2013). Dado seu papel na restrição da plasticidade neural, as RPNs em regiões cerebrais corticais e sub-corticais têm sido implicados em uma ampla gama de funções comportamentais, incluindo comportamentos de busca de drogas, reversão de aprendizagem e perda de condicionamento ao medo (BLACKTOP; SORG, 2019; GOGOLLA *et al.*, 2009; HAPPEL *et al.*, 2014; SLAKER *et al.*, 2015).



Além disso, estudos demonstraram que durante o desenvolvimento e também já na idade adulta, as RPNs e seus respectivos receptores de superfície celular medeiam uma ampla gama de funções regulatórias sinápticas que afetam a estrutura e a plasticidade de dendritos e de sinapses, bem como a transmissão glutamatérgica e GABAérgica (SORG *et al.* 2016). Em geral, a diminuição da intensidade de marcação das RPNs pode estar associada ao aumento do estímulo inibitório aos neurônios subjacentes, enquanto o aumento de marcação da sua intensidade pode estar associado ao aumento do estímulo excitatório a esses neurônios (SORG *et al.* 2016).

Uma vez que os períodos críticos de plasticidades em regiões cerebrais distintas ocorrem em diferentes idades, quando uma rede neuronal termina a sua estruturação e formação de conectividade, as RPNs se formam e reduzem assim a plasticidade dos neurônios que eles envolvem (KWOK *et al.*, 2015). Apesar de os períodos críticos de plasticidade tenham sido bem definidos nas idades iniciais do desenvolvimento pós-natal, salienta-se que o CPF possui desenvolvimento tardio em seus diversos aspectos (FUHRMANN *et al.*, 2015; LARSEN; LUNA, 2018), ou seja, sofre desenvolvimento de diversos aspectos micro-anatômico prolongado ao longo da adolescência e grande parte dessa maturação do tecido nervoso do CPF corresponde ao aumento de controle do funcionamento das funções executivas e a capacidades de inibição comportamental (ANDERSON *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2013).

Devido à sua complexidade e variabilidade, a determinação do início e do fim do período crítico de plasticidade ainda não está completamente claro. Os resultados aqui apresentados corroboram com a literatura atual onde é salientado que a forma mais madura das RPNs é mais prevalente em idades mais avançadas, por volta dos 3 meses de idade, quando os animais já são considerados adultos jovens. Acreditamos que um melhor conhecimento da estrutura e função dos RPNs em condições fisiológicas e patológicas tem um forte potencial para o desenvolvimento de terapias para melhorar a plasticidade neural e a recuperação funcional em várias condições do SNC, desde transtornos do neurodesenvolvimento por lesões do SNC até dependência de drogas.

Assim, os presentes resultados apresentados podem ser úteis e usados para determinar o fechamento do período crítico no CPF, sugerindo assim que o CPFm começa a apresentar restrição à plasticidade neural a partir do dia 26 pós-natal,

aumentando sua restrição à formação de novas sinapses no dia 75 pós-natal, de acordo com nossas demonstrações experimentais.

## 6. CONCLUSÃO

No CPFm, as RPNs surgem em P26 com pequeno número de células Vv+, aumentando em números totais até a fase adulta. De modo mais específico, apresentamos as seguintes conclusões:

- a) O fechamento do período crítico de plasticidade no CPFm de ratos da linhagem *Wistar* criados em condição padrão de laboratório inicia a partir de P75 quando surgem as primeiras RPN amadurecidas marcadas.
- b) A distribuição espacial das RPNs foi marcada tanto nas camadas profundas (V/VI) quanto das camadas II/III e nos seus componentes dorsais e ventrais, principalmente nas sub-regiões PrC, ACg e PrL localizadas medial e dorso-lateralmente a região medial do hemisfério cerebral.
- c) Há uma diminuição progressiva de RPNs com perfil imaturo e um aumento concomitante de RPNs maduras no CPFm, verificados na contagem de células Vv+ no desenvolvimento pós-natal do CPFm.
- d) A formação das RPNs, bem como a integridade estrutural das RPNs indicam o grau de amadurecimento do CPFm e pode ser usado como indicador biológico da janela de período crítico de plasticidade.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, J.; EMORY, E. Executive function and the frontal lobes: A meta-analytic review. **Neuropsychol. Rev.**, 2006.
- BADRE, D.; D'ESPOSITO, M. Is the rostro-caudal axis of the frontal lobe hierarchical? **Nat Rev Neurosci.** 2009; 10: 659-69.
- BAHIA, C. *et al.* Spatiotemporal distribution of proteoglycans in the developing rat's barrel field and the effects of early deafferentation. **Journal of Comparative Neurology**, v. 510, n. 2, pág. 145-157, 2008.
- BALMER, T. Perineuronal nets enhance the excitability of fast-spiking neurons. **eneuro**, v. 3, n. 4, 2016.
- BARRETT, L.; SATPUTE, A. Large-scale brain networks in affective and social neuroscience: towards an integrative functional architecture of the brain. **Current opinion in neurobiology**, v. 23, n. 3, p. 361-372, 2013.
- BARRITT, A. *et al.* Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 42, p. 10856-10867, 2006.
- BEGUM, M.; SNG, J. Molecular mechanisms of experience-dependent maturation in cortical GABAergic inhibition. **Journal of neurochemistry**, v. 142, n. 5, p. 649-661, 2017.
- BERTOLOTTO, A.; MANZARDO, E.; GUGLIELMONE, R. Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfate proteoglycan in the rat central nervous system. **Cell and tissue research**, v. 283, n. 2, p. 283-295, 1996.
- BOADAS-VAELLO, P. *et al.* Neuroplasticity of supraspinal structures associated with pathological pain. **The Anatomical Record**, v. 300, n. 8, p. 1481-1501, 2017.
- BRODMANN, K. **Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues.** Barth, 1909.
- BRÜCKNER, G. *et al.* Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 26, n. 1, p. 37-50, 2003.
- BRÜCKNER, G. *et al.* Desenvolvimento pós-natal de redes perineuronais em camundongos do tipo selvagem e em um mutante deficiente em tenascina-R. **Journal of Comparative Neurology**, v. 428, n. 4, pág. 616-629, 2000.
- BRÜCKNER, G.; GROSCHE, J. Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. **Experimental brain research**, v. 137, n. 1, p. 83-93, 2001.

CABUNGICAL, J. *et al.* Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. 9130-9135, 2013.

CAMILLE, N.; TSUCHIDA, A.; FELLOWS, L. Double dissociation of stimulus-value and action-value learning in humans with orbitofrontal or anterior cingulate cortex damage. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 42, p. 15048-15052, 2011.

CARSTENS, K. *et al.* Perineuronal nets suppress plasticity of excitatory synapses on CA2 pyramidal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 23, p. 6312-6320, 2016.

CARULLI, D.; KWOK, J. C.; PIZZORUSSO, T. Perineuronal Nets and CNS Plasticity and Repair. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 4327082-4327082, 2016.

CARULLI, D.; VERHAAGEN, J. Uma perspectiva extracelular da maturação do SNC: redes perineuronais e o controle da plasticidade. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, pág. 2434, 2021.

CORCORAN, K. A.; QUIRK, G. J. Activity in Prelimbic Cortex Is Necessary for the Expression of Learned, But Not Innate, Fears. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 840 – 844, 2007.

DALLEY, J.; CARDINAL, R.; ROBBINS, T. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neurosci Biobehav Rev.** 2004; 28: 771-84.

DE VIVO, L. *et al.* Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2013.

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.

DEMARIN, Vida; MOROVIĆ, SANDRA. Neuroplasticity. **Periodicum biologorum**, v. 116, n. 2, p. 209-211, 2014.

DENNIS, M. *et al.* Age, plasticity, and homeostasis in childhood brain disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2760-2773, 2013.

DICK, G. *et al.* Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27384-27395, 2013.

DITYATEV, A.; RUSAKOV, D. Sinais moleculares de plasticidade na sinapse tetrapartite. **Opinião atual em neurobiologia** , v. 21, n. 2, pág. 353-359, 2011.

DZYUBENKO, E.; GOTTSCHLING, C.; FAISSNER, A. Neuron-glia interactions in neural plasticity: contributions of neural extracellular matrix and perineuronal nets. **Neural plasticity**, v. 2016, 2016.

FAVUZZI, E. *et al.* Activity-dependent gating of parvalbumin interneuron function by the perineuronal net protein brevican. **Neuron**, v. 95, n. 3, p. 639-655. e10, 2017.

FAWCETT, J.; OOHASHI, T.; PIZZORUSSO, T. The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 8, p. 451-465, 2019.

FELTEN, D. *et al.* **Netter's Atlas of Neuroscience E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2021.

FRYSZTAK, R.; NEAFSEY, E. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. **Brain Res.**, 1994.

FUSTER, J. Executive frontal functions. **Experimental brain research**, v. 133, n. 1, p. 66-70, 2000.

FUSTER, J. M. The prefrontal cortex and the temporal organization of action. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 63, n. 5, 2003.

FUSTER, J. The prefrontal cortex. **Academic Press**, 2015.

GIAMANCO, K.; MORAWSKI, M.; MATTHEWS, R. T. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1314-1327, 2010.

GILDAWIE, K. *et al.* Region-specific effects of maternal separation on perineuronal net and parvalbumin-expressing interneuron formation in male and female rats. **Neuroscience**, v. 428, p. 23-37, 2020.

GOGOLLA, Nadine *et al.* Perineuronal nets protect fear memories from erasure. **science**, v. 325, n. 5945, p. 1258-1261, 2009.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, p. 477 – 485, 1995.

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, n. 2, p. 379-431, 1988.

HÄRTIG, W. *et al.* Allocation of perineuronal nets and parvalbumin-, calbindin-D28k- and glutamic acid decarboxylase-immunoreactivity in the amygdala of the rhesus monkey. **Brain research**, v. 698, n. 1-2, p. 265-269, 1995.

HAUSEN, D. *et al.* Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. **Neuroreport**, v. 7, n. 11, p. 1725-1729, 1996.

HAYANI, H.; SONG, I.; DITYATEV, A. Increased excitability and reduced excitatory synaptic input into fast-spiking CA2 interneurons after enzymatic attenuation of extracellular matrix. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 12, p. 149, 2018.

HEIDBREder, C.; GROENEWEGEN, H. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 6, p. 555-579, 2003.

HENRI-BHARGAVA, A.; STUSS, D.; FREEDMAN, M. Clinical assessment of prefrontal lobe functions. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 24, n. 3, p. 704-726, 2018.

HENSCH, T. Critical period plasticity in local cortical circuits. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 877-888, 2005.

HORII-HAYASHI, N. *et al.* Development and structural variety of the chondroitin sulfate proteoglycans-contained extracellular matrix in the mouse brain. **Neural plasticity**, v. 2015, 2015.

HUBEL, D.; WIESEL, T. Campos receptivos, interação binocular e arquitetura funcional no córtex visual do gato. **The Journal of physiology**, v. 160, n. 1, p. 106, 1962.

HUBEL, D.; WIESEL, T. O período de suscetibilidade aos efeitos fisiológicos do fechamento ocular unilateral em gatinhos. **The Journal of physiology**, v. 206, n. 2, p. 419-436, 1970.

HÜBENER, Mark; BONHOEFFER, Tobias. Neuronal plasticity: beyond the critical period. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 727-737, 2014.

ISMAIL, F.; FATEMI, A.; JOHNSTON, M. Cerebral plasticity: windows of opportunity in the developing brain. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 21, n. 1, p. 23-48, 2017.

JOHNSTON, Michael V. Plasticity in the developing brain: implications for rehabilitation. **Developmental disabilities research reviews**, v. 15, n. 2, p. 94-101, 2009.

KASTRUP, O. *et al.* Cortical motor reorganization following early brain damage and hemispherectomy demonstrated by transcranial magnetic stimulation. **Clinical neurophysiology**, v. 111, n. 8, p. 1346-1352, 2000.

KLEIN, D.; WATKINS, K. Neuroplasticity, neuroimaging, and bilingualism: Commentary on Baum and Titone. **Applied Psycholinguistics**, v. 35, n. 5, 2014.

KNUDSEN, E. Sensitive periods in the development of the brain and behavior. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 1412-1425, 2004.

KO, J. Neuroanatomical substrates of rodent social behavior: the medial prefrontal cortex and its projection patterns. **Frontiers in neural circuits**, v. 11, p. 41, 2017.

KOLB, B. *et al.* Experience and the developing prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. Supplement 2, p. 17186-17193, 2012.

KOLB, B. Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. *Brain Res.* 1984.

KROES, M.; FERNÁNDEZ, G. Os sistemas neurais dinâmicos permitem memórias adaptáveis e flexíveis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 7, p. 1646-1666, 2012.

LARA, A.; WALLIS, J. The role of prefrontal cortex in working memory: a mini review. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 9, p. 173, 2015.

LAUBACH, M. *et al.* What, if anything, is rodent prefrontal cortex?. **eneuro**, v. 5, n. 5, 2018.

LAUBER, E.; FILICE, F.; SCHWALLER, B. Prenatal valproate exposure differentially affects parvalbumin-expressing neurons and related circuits in the cortex and striatum of mice. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 9, p. 150, 2016.

LEBLANC, J.; FAGIOLINI, M. Autism: a “critical period” disorder?. **Neural plasticity**, 2011.

LENSJO, K. *et al.* Removal of perineuronal nets unlocks juvenile plasticity through network mechanisms of decreased inhibition and increased gamma activity. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 5, p. 1269-1283, 2017.

LI, P.; LEGAULT, J.; LITCOFSKY, K. Neuroplasticity as a function of second language learning: anatomical changes in the human brain. **Cortex**, v. 58, p. 301-324, 2014.

MASSEY, J. *et al.* Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 16, p. 4406-4414, 2006.

MAUNEY, S. *et al.* Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 74, n. 6, p. 427-435, 2013.

MAVIEL, T. Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory.

MCKLVEEN, J.; MYERS, B.; HERMAN, J. The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. **Journal of neuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 446-456, 2015.

MEREDITH, R. M. Sensitive and critical periods during neurotypical and aberrant neurodevelopment: a framework for neurodevelopmental disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 50, p. 180-188, 2015.

MORAWSKI, M. *et al.* Ion exchanger in the brain: quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2015.

NABEL, E.; MORISHITA, H. Regulating critical period plasticity: insight from the visual system to fear circuitry for therapeutic interventions. **Frontiers in psychiatry**, v. 4, p. 146, 2013.

NAKAMURA, M. et al. Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in barrel field of mouse and rat somatosensory cortex. **Brain research**, v. 1252, p. 117-129, 2009.

NARAYANAN, N. S.; LAUBACH, M. Top-down control of motor cortex ensembles by dorsomedial prefrontal cortex. **Neuron**, v. 52, p. 921 – 931, 2006.

NEAFSEY, E. Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: Anatomical and physiological observations. **Prog. Brain Res.**, 1990.

NOWICKA, D. *et al.* Parvalbumin-containing neurons, perineuronal nets and experience-dependent plasticity in murine barrel cortex. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 11, p. 2053-2063, 2009.

ÖNGÜR, D.; FERRY, A.; PRICE, J. Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 460, n. 3, p. 425-449, 2003.

ORLANDO, C. et al. Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 50, p. 18009-18017, 2012.

PADOA-SCHIOPPA, C.; CAI, X. Orbitofrontal cortex and the computation of subjective value: consolidated concepts and new perspectives. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1239, p. 130, 2011.

PANDYA, D. YETERIAN, E. H. Comparison of prefrontal architecture and connections. In Roberts, A.C., Robbins, T. W. & Weiskrantz, L. (Eds.) *The prefrontal cortex: executive and cognitive functions* (Pp. 51-66). **Oxford University Press**, 1998.

PANTAZOPOULOS, H.; BERRETTA, S. In sickness and in health: perineuronal nets and synaptic plasticity in psychiatric disorders. **Neural plasticity**, v. 2016, 2016.

PAYLOR, J. *et al.* Impaired cognitive function after perineuronal net degradation in the medial prefrontal cortex. **Eneuro**, v. 5, n. 6, 2018.

PETRIDES, M. *et al.* The prefrontal cortex: comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. **Cortex**, v. 48, n. 1, p. 46-57, 2012.

PIZZORUSSO, T. *et al.* Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. **Science**, v. 298, n. 5596, p. 1248-1251, 2002.

RAY, J.; PRICE, J. The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain–prefrontal cortex topography. **Journal of Comparative Neurology**, v. 323, n. 2, p. 167-197, 1992.



RAY, R.; ZALD, D. Anatomical insights into the interaction of emotion and cognition in the prefrontal cortex. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 1, p. 479-501, 2012.

REH, R. *et al.* Critical period regulation across multiple timescales. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 38, p. 23242-23251, 2020.

RODRIGUES, K. **Plasticidade aumentada no córtex pré-frontal de ratos com a remoção de redes perineuronais.** (Tese de Doutorado) – Belém: Instituto de Ciências Biológicas, UFPA; 2016.

ROMBERG, C. *et al.* Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 16, p. 7057-7065, 2013.

SAGHATELYAN, A. *et al.* Recognition molecule associated carbohydrate inhibits postsynaptic GABAB receptors: a mechanism for homeostatic regulation of GABA release in perisomatic synapses. **Molecular and cellular neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 271-282, 2003.

SALLET, J. *et al.* The organization of dorsal frontal cortex in humans and macaques. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 30, p. 12255-12274, 2013.

SCHOENBAUM, G. *et al.* A new perspective on the role of the orbitofrontal cortex in adaptive behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 885-892, 2009.  
**Science**, v. 305, p. 96 – 99, 2004.

SEAMANS, J.; LAPISH, C.; DURSTEWITZ, D. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. **Neurotoxicity research**, v. 14, n. 2-3, p. 249-262, 2008.

SELEMON, L. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. **Translational Psychiatry**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.238-242, mar. 2013.

SEMINOWICZ, D.; MOAYEDI, M. The dorsolateral prefrontal cortex in acute and chronic pain. **The Journal of Pain**, v. 18, n. 9, p. 1027-1035, 2017.

SLAKER, M. *et al.* Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 10, p. 4190-4202, 2015.

SLAKER, M.; HARKNESS, J.; SORG, B. A standardized and automated method of perineuronal net analysis using Wisteria floribunda agglutinin staining intensity. **IBRO reports**, v. 1, p. 54-60, 2016.

SORG, B. *et al.* Casting a wide net: role of perineuronal nets in neural plasticity. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 45, p. 11459-11468, 2016.

SPREAFICO, R. *et al.* The perineuronal net: a weapon for a challenge. **Journal of the history of the neurosciences**, v. 8, n. 2, p. 179-185, 1999.

STUSS, D.; BENSON, D. F. Neuropsychological studies of the frontal lobes. **Psychological bulletin**, v. 95, n. 1, p. 3, 1984.

TAKASHIMA, A. *et al.* **Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 103, p. 756 – 761, 2006.

TAKESIAN, A.; HENSCH, T. Balancing plasticity/stability across brain development. **Progress in brain research**, v. 207, p. 3-34, 2013.

TEIXEIRA, C. M. *et al.* Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. **The Journal of neuroscience**, v. 26, p. 7555 – 7564, 2006.

THIERRY, A. M. *et al.* Dopaminergic terminals in the rat cortex. **Science**, v. 182, n. 4111, p. 499-501, 1973.

UYLINGS, H. B. M. *et al.* The prenatal and postnatal development of rat cerebral cortex. **The cerebral cortex of the rat**, p. 35-76, 1990.

UYLINGS, H. *et al.* Do rats have a prefrontal cortex?. **Behavioural brain research**, v. 146, n. 1-2, p. 3-17, 2003.

VIDAL, E. *et al.* Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains. **Journal of virological methods**, v. 136, n. 1-2, p. 137-146, 2006.

WALLIS, J. Neuronal mechanisms in prefrontal cortex underlying adaptive choice behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1121, n. 1, p. 447-460, 2007.

WALTON, M. *et al.* Separable learning systems in the macaque brain and the role of orbitofrontal cortex in contingent learning. **Neuron**, v. 65, n. 6, p. 927-939, 2010.

WANG, D.; FAWCETT, J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 1, p. 147-160, 2012.

WARREN, D. *et al.* False recall is reduced by damage to the ventromedial prefrontal cortex: implications for understanding the neural correlates of schematic memory. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 22, p. 7677-7682, 2014.

WARREN, P. *et al.* Regulação da plasticidade do SNC através da matriz extracelular. **Oxford Handbook of Developmental Neural Plasticity** 2018.

WERKER, F.; HENSCH, T. Critical periods in speech perception: new directions. **Annual review of psychology**, v. 66, p. 173-196, 2015.

WIDGE, A.; HEILBRONNER, S.; HAYDEN, B. Prefrontal cortex and cognitive control: new insights from human electrophysiology. **F1000Research**, v. 8, 2019.

WILLIAMS, S.; GOLDMAN-RAKIC, P. Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. **Cerebral cortex (New York, NY: 1991)**, v. 8, n. 4, p. 321-345, 1998.

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

# ANEXO A: ARTIGO CIENTÍFICO RELACIONADO A TEMÁTICA DA PESQUISA ACEITO PARA PUBLICAÇÃO



## Time Window of the Critical Period for Neuroplasticity in S1, V1, and A1 Sensory Areas of Small Rodents: A Systematic Review

Lais Resque Russo **Pedrosa**<sup>†</sup>, Gabriele dos Santos **Coimbra**<sup>†</sup>, Márcio Gonçalves **Corrêa**, Ivanira Amaral **Dias** and Carlomagno Pacheco **Bahia**<sup>\*</sup>

Laboratory of Neuroplasticity, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará, Belém, Brazil

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Jean-Pierre Hornung,  
University of Lausanne, Switzerland

#### Reviewed by:

Julia U. Henschke,  
University Hospital  
Magdeburg, Germany  
Irene Chaves-Coira,  
Autonomous University of  
Madrid, Spain

#### \*Correspondence:

Carlomagno Pacheco Bahia  
carlomagnobahia@gmail.com

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

**Received:** 23 August 2021

**Accepted:** 04 January 2022

**Published:** xx xx 2022

#### Citation:

**Pedrosa LRR, Coimbra GdS, Corrêa MG, Dias IA and Bahia CP** (2022) Time Window of the Critical Period for Neuroplasticity in S1, V1, and A1 Sensory Areas of Small Rodents: A Systematic Review. *Front. Neuroanat.* 16:763245. doi: 10.3389/fnana.2022.763245

The plasticity of the central nervous system (CNS) allows the change of neuronal organization and function after environmental stimuli or adaptation after sensory deprivation. The so-called critical period (CP) for neuroplasticity is the time window when each sensory brain region is more sensitive to changes and adaptations. This time window is usually different for each primary sensory area: somatosensory (S1), visual (V1), and auditory (A1). Several intrinsic mechanisms are also involved in the start and end of the CP for neuroplasticity; however, which is its duration in S1, V1, and A1? This systematic review evaluated studies on the determination of these time windows in small rodents. The careful study selection and methodological quality assessment indicated that the CP for neuroplasticity is different among the sensory areas, and the brain maps are influenced by environmental stimuli. Moreover, there is an overlap between the time windows of some sensory areas. Finally, the time window duration of the CP for neuroplasticity is predominant in S1.

**Keywords:** critical period, neural plasticity, primary sensory cortex, primary somatosensory cortex (S1), primary visual cortex (V1), primary auditory cortex (A1)

### INTRODUCTION

Neuroplasticity is the capacity of the central nervous system (CNS) to undergo structural and functional changes in response to environmental sensory experiences or even to adapt following injury (Ismail et al., 2017). Several genetic, molecular, and cellular mechanisms can modulate the synapses of neuronal circuits and cause functional improvement, loss, and/or behavioral changes (Johnston, 2009). The plasticity of the nervous tissue after stimuli or injury is more evident during the early postnatal period, i.e., a time window known as the critical period (CP) for neuroplasticity (Pascual-Leone et al., 2005). This short postnatal time window is characterized by heightened nervous system receptivity for adapting to stimuli provides a stable and long-term experiential foundation (Wiesel and Hubel, 1965).

Small rodents such as rats and mice have a lissencephalic brain with well-established primary sensory areas and have been used to investigate the CP for neuroplasticity (Stafford, 1984; Schlaggar et al., 1993; de Villiers-Sidani et al., 2007). However, there is still no consensus on the time window start and end of all sensory areas. For instance, the CP for neuroplasticity of somatosensory (S1) may start at birth, i.e., P0 (Rice and Van Der Loos, 1977; Schlaggar et al., 1993), followed by visual (V1) and auditory (A1) areas (Stafford, 1984; Levine et al., 2017; Park et al., 2019).

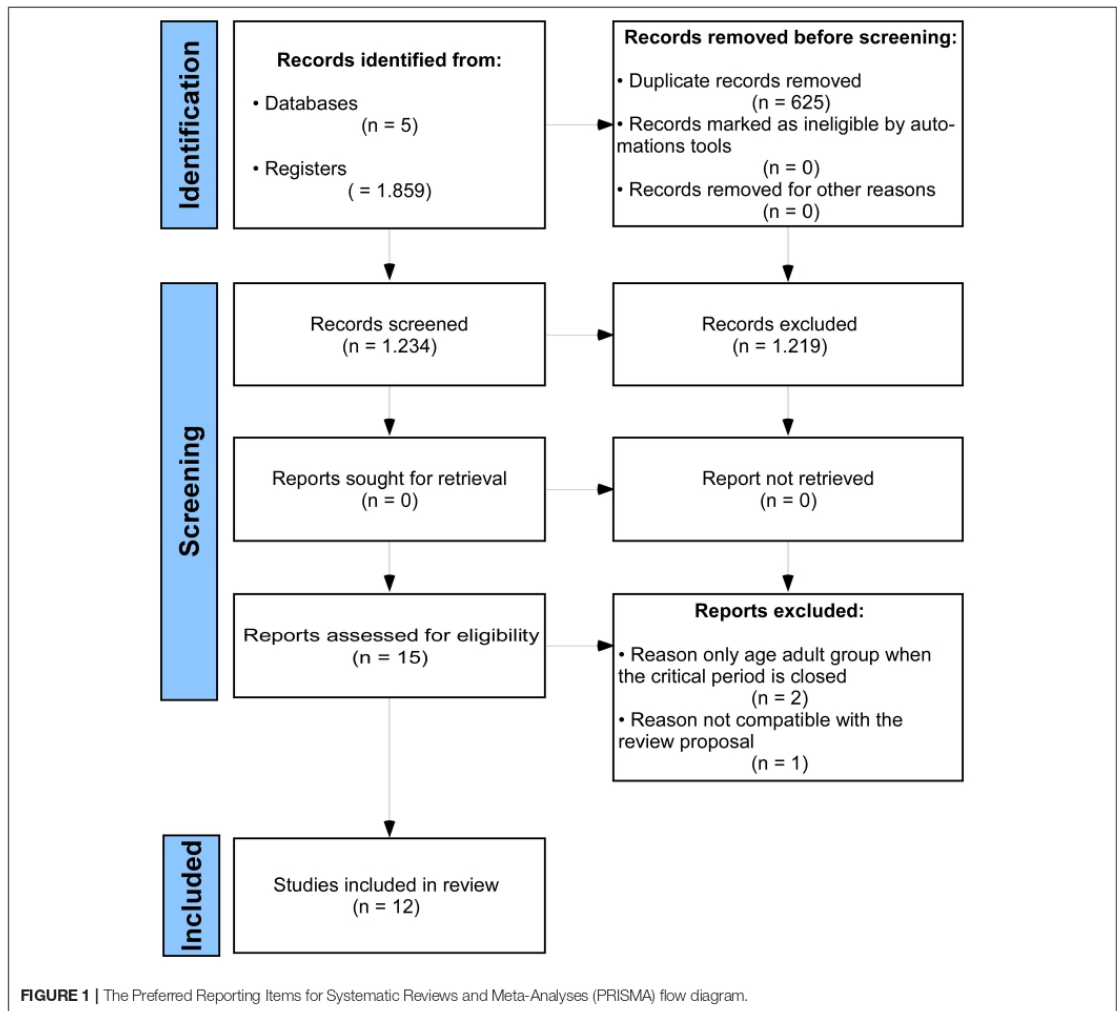
115 Therefore, the CP for neuroplasticity can vary in accordance  
 116 with the primary sensory areas related to different brain maps. In  
 117 addition, environmental stimuli can influence the organization  
 118 of S1, V1, and A1 in their respective sensorial maps. The effects  
 119 of different stimuli and intrinsic mechanisms on the CNS have  
 120 been investigated by several neuroscience researchers to establish  
 121 the duration of the CP for neuroplasticity related to different  
 122 primary sensory areas (Stafford, 1984; Goodman and Shatz,  
 123 1993; Schlaggar et al., 1993; Antonini et al., 1999; de Villers-  
 124 Sidani et al., 2007, 2008; Fischer et al., 2007; Faguet et al.,  
 125 2009; Zhou et al., 2011; Seelke et al., 2012; Levine et al., 2017;  
 126 Park et al., 2019; van der Bourg et al., 2019). Considering the  
 127 complexity of the CP for neuroplasticity and the respective  
 128 time windows for each primary sensory area, preclinical studies  
 129  
 130  
 131

172 can help to develop treatments for brain injuries such as the  
 173 use of cochlear implants in cases of auditory deprivation (Kral,  
 174 2013). Therefore, this systematic review aimed to investigate and  
 175 compare the time window of the CP for neuroplasticity in S1, V1,  
 176 and A1 areas.  
 177  
 178

179 **METHODS**

180 **Protocol and Registration**

181 This systematic review of animal studies was registered  
 182 in a database (10.17605/OSF.IO/XNT6R) and conducted  
 183 by following the Preferred Reporting Items for Systematic  
 184 Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement  
 185 (Page et al., 2021).  
 186  
 187  
 188



Q11  
Q8

**Eligibility Criteria, Information Sources, and Search**

This Population/Problem, Interest, and Context (PICO) review included randomized controlled studies that evaluated neuroplasticity (P) through experimental interventions during the CP (I) and reported the time window duration (start and end) in the primary sensory areas of the cerebral cortex (Co).

English-language studies without the date of the publication restriction were searched in the PubMed, Web of Science, ScienceDirect, Embase, and Virtual Health Library databases by two reviewers (LP and GC) using the MeSH descriptors “neuronal plasticity,” “critical period,” and “cerebral cortex.” Additional primary studies were also searched throughout the reference lists of the retrieved articles. The search strategy was slightly adapted in each database and followed the PICO inclusion criteria described in the **Supplementary Material**. Search alerts for novel studies were also created.

**Study Selection and Data Collection**

The studies were selected by following the criteria: (1) descriptor in the title or abstract, (2) English language, (3) original studies, and (4) animal model with small rodents. Reviews, case reports, descriptive studies, opinion articles, technical reports, guidelines, human, and *in vitro* studies were excluded.

The retrieved articles were uploaded to the Rayyan review assistance tool (<https://rayyan.ai/>) to exclude duplicated articles and studies with titles and abstracts that did not meet the eligibility criteria. After full-text reading, two independent reviewers (LP and GC) performed the final selection, and any disagreement was resolved by a third reviewer (CB). Then, the

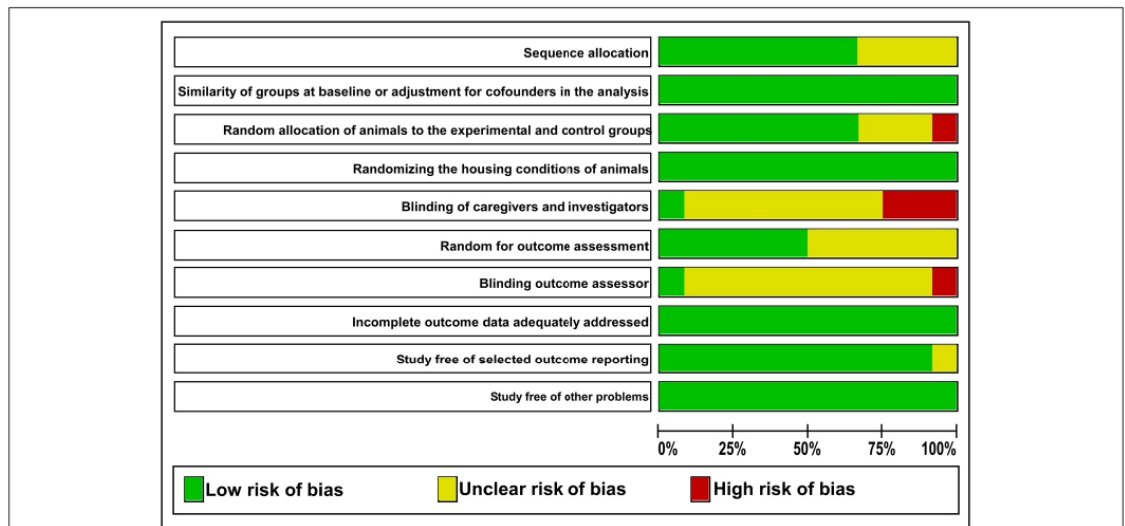
following data of the selected articles were extracted: publication year, analyzed cortical sensory area, characteristics of the animals, and main outcomes regarding the time window of the CP for neuroplasticity in S1, V1, and A1 areas.

**Risk of Bias in Individual Studies**

The risk of bias for each study was independently assessed by two reviewers using the SYStematic Review Center for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE), which is based on the Cochrane RoB tool and has been adjusted for biases that play a specific role in animal intervention studies (Hooijmans et al., 2014). The following domains were evaluated: allocation sequence, similarity among groups at baseline or confounder adjustment, randomized allocation of experimental and control groups, random housing conditions, blinding of caregivers and researchers, outcome assessor blinding, incomplete outcome data, selective outcome reporting, and other sources of bias. The interpretation of domains regarding allocation, housing, baseline similarities, and animal group assessment is known to influence the study outcomes. Hence, they were carefully analyzed to reduce the risk of bias and to guarantee the quality of this systematic review (van Zutphen et al., 2001).

In addition, “yes” or “no” questions were answered by the reviewers to assess the risk of bias: (1) Is there a possibility that the results are biased? (2) Do the results have factors that confuse the interpretation of the results? (3) Could the study results occur by chance? Articles that received mostly “no” answers were considered methodologically viable and with a low risk of bias.

Q20



**FIGURE 2 |** The judgments of the reviewer of each risk of bias item are presented as percentages. The green color indicates a low risk of bias. The yellow color indicates an unclear risk of bias. The red color indicates a high risk of bias.

**RESULTS**

**Study Selection**

Among 1,859 articles, 625 duplicates and other 1,219 articles were excluded during the title and abstract reading. Thus, 15 articles were fully read. Two articles were excluded since the CP for neuroplasticity was associated with neurodegenerative diseases, while one study did not meet the aim of this review. Then, 12 articles were eligible for the qualitative assessment (Figure 1).

**Study Characteristics**

Studies regarding the S1 area were performed by using electrophysiological recordings (Seelke et al., 2012), biopolymer implant loaded with glutamate receptor antagonist (Schlaggar et al., 1993), and standard stimulation patterns of the vibrissa system (van der Bourg et al., 2019). Researches on the V1 area reported some experimental interventions such as visual deprivation by eyelid suture (Stafford, 1984; Antonini et al., 1999; Fischer et al., 2007; Faguet et al., 2009; Levine et al., 2017) or monocular enucleation (Faguet et al., 2009), and environmental enrichment to increase the stimuli of V1 afferences (Levine et al., 2017). The investigation of the A1 area included continuous pure-tone exposure and electrophysiological recording of the auditory processing (de Villers-Sidani et al., 2007; Fischer et al., 2007), different standard sound stimuli (de Villers-Sidani et al., 2008), and/or cochlear ablation (Park et al., 2019). These characteristics are summarized in Figure 2 and fully described in the Supplementary Material.

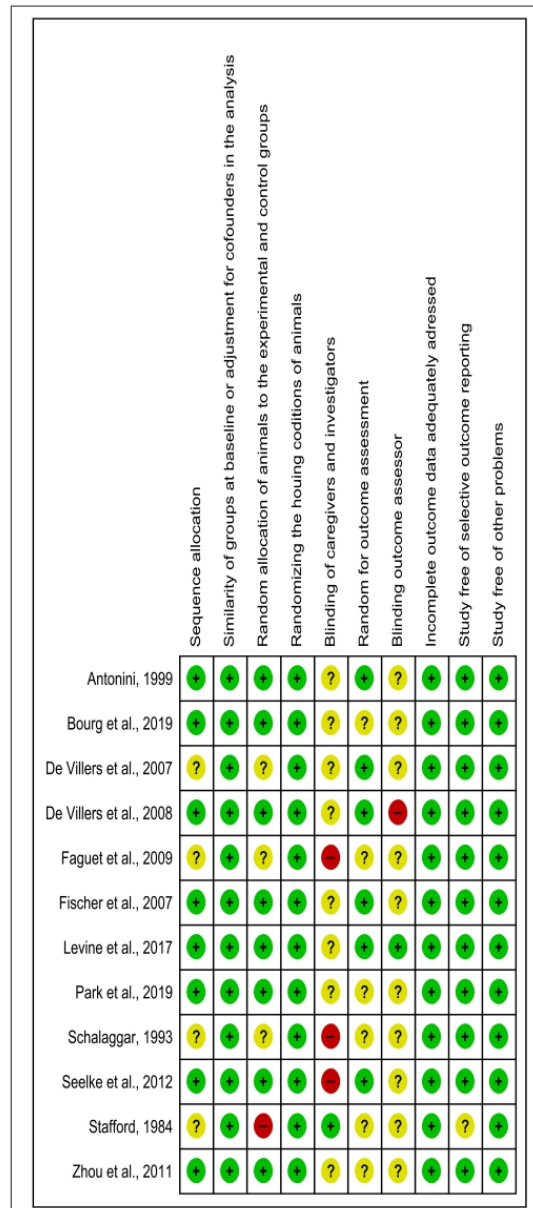
The murine model was predominantly found in this review since seven studies used Sprague Dawley (Schlaggar et al., 1993; de Villers-Sidani et al., 2007, 2008; Zhou et al., 2011; Park et al., 2019) and Long Evans rat lineages (Stafford, 1984; Seelke et al., 2012) and five articles used C7BL6 mice (Antonini et al., 1999; Fischer et al., 2007; Faguet et al., 2009; Levine et al., 2017; van der Bourg et al., 2019).

**Risk of Bias Within Studies**

The detailed analysis of the 10 main risk of bias domains indicated a low risk of bias regarding allocation sequence since most items were classified as “yes.” No study was classified with a high risk of bias. The domains “random housing conditions,” “incomplete outcome data,” and “others sources of bias” were found to be 100% adequate, while the “blinding of caregivers and researchers” and “outcome assessor blinding” were classified as high or unclear risk of bias in most of the studies (Figures 3, 4).

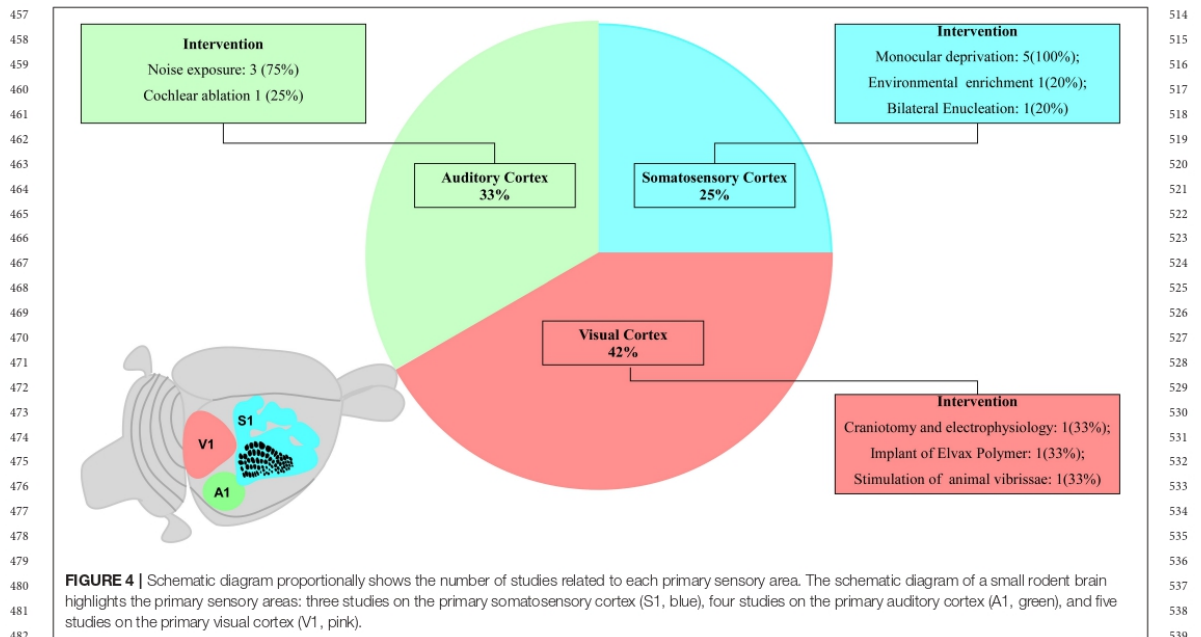
**Results of Individual Studies and Summary**

The summary of the main results is shown in Table 1. Schlaggar et al. (1993) investigated the influence of postsynaptic activity on the time window of the CP for neuroplasticity in S1 during 5 days after birth. Other authors evaluated the S1 cortex development from birth until adulthood. Seelke et al. (2012) affirmed that postsynaptic inactivation interferes in the time window of the CP for neuroplasticity in the S1 area of rats submitted to vibrissae deprivation. Subsequently, all anatomical and functional alterations in S1 under sensorial deprivation from birth to early-adult lifetime were summarized



**FIGURE 3** | Risk of bias chart of studies included in the qualitative analysis by using 10 domains. Green, yellow, and red colors indicate a low, unclear, and high risk of bias, respectively.

on a topographic map. van der Bourg et al. (2019) evaluated the sharpening of response specificity to paired and sequential whisker deflections.



Stafford (1984) originally investigated the time window of the CP for neuroplasticity in V1 at 2 (eye-opening), 4, 6, and 10 postnatal weeks by the modulation of the luminance stimulus. Conversely, Antonini et al. (1999) examined V1 responses from P17 to P60 and suggested that visual deprivation induces anatomical changes followed by functional plasticity until P30. In V1, the peak of the CP for neuroplasticity is influenced by the electrical activity of both contralateral and ipsilateral eye pathways (Faguet et al., 2009). However, visual deprivation associated with posterior environmental enrichment can induce the recovery of V1 plasticity after the post-CP P30/P40 (Fischer et al., 2007), albeit this late recovery was usually partial without significant changes in the neuronal network (Levine et al., 2017).

Three studies investigated the electrophysiological cortical responses in A1 at the second postnatal week (de Villers-Sidani et al., 2007, 2008; Park et al., 2019). The first potentials in A1 were recorded at P10 and P14, when the complete neural electrical response associated with the maturation of parvalbumin-positive inhibitory neurons were recorded (de Villers-Sidani et al., 2008). Stimuli from distinct harmonic sound patterns changed the time window of the CP for neuroplasticity in specific A1 subregions (de Villers-Sidani et al., 2008). Since early unilateral deafening reorganizes A1 ipsilateral, early intervention may be crucial to recovering binaural hearing (Park et al., 2019). Conversely, prolonged exposure to continuous noise after the end of the CP for neuroplasticity can cause a partial reversal of the maturation changes related to the adult functional state (Zhou et al., 2011).

## DISCUSSION

This systematic review aimed to assess the time windows of the CP for neuroplasticity in small rodents. The findings of selected studies indicated different time windows for each primary sensory area (S1, V1, and A1). The time window of the CP for neuroplasticity in the S1 area starts early, followed by A1 and V1 areas. S1 and A1 were found with the longest and shortest time windows, respectively. Moreover, the S1 completely and partially overlaps the A1 and V1 time windows of the CP, respectively (Figure 5).

Considering that the outcome of a systematic review depends on the methodological quality of the studies (Hooijmans et al., 2014), 10 domains were used to avoid a high risk of bias, and any essential domain was considered with a high risk of bias (Figures 3, 4). Both “blinding of caregivers and researchers” and “outcome assessor blinding” were considered “unclear” in most studies since some conditions or outcome assessments were not accurately detailed. However, these domains were not considered essential for assessing the methodological quality.

Although small rodents are widely used to investigate neuroplasticity, only 12 studies met the eligibility criteria (Figure 1). These animals are easy to handle, and their mechanisms of molecular glues or cellular events involved in the CP for neuroplasticity are very similar to those observed in large mammals (Reagan-Shaw et al., 2008). Thus, anatomical, physiological, and biochemical mechanisms investigated in experimental models with rats and mice have provided applicable



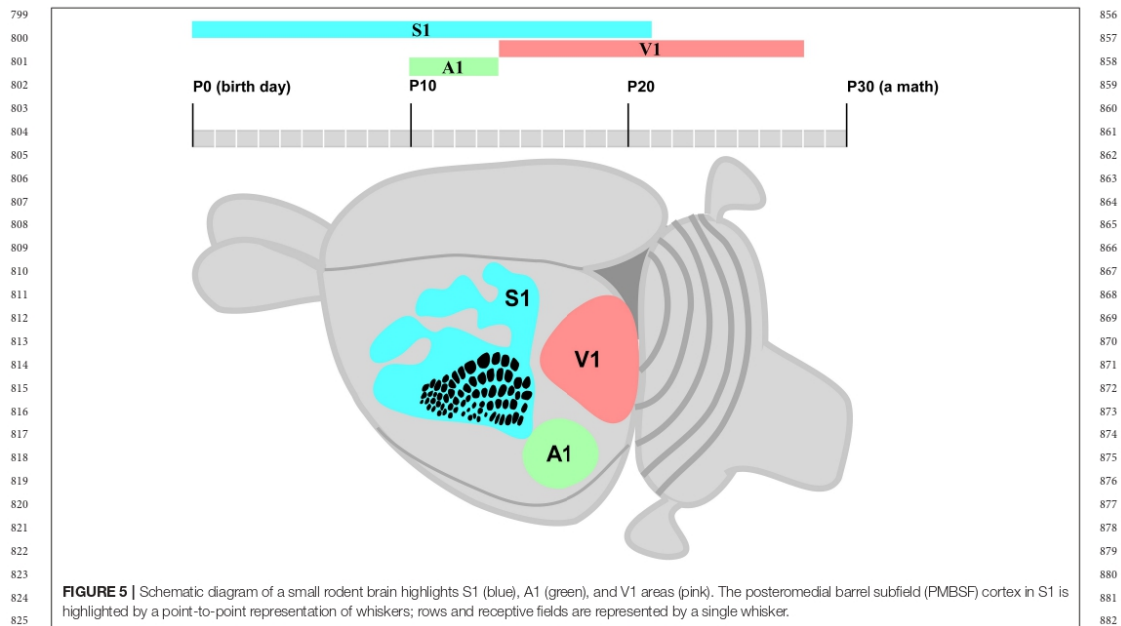
**TABLE 1** | Results of individual studies and synthesis of results.

References	Cortical area	Objective	Experimental and control group	Main results
Schlaggar et al. (1993)	S1	To test whether the somatosensory columns' developmental plasticity is similar to the competitive plasticity of ocular dominance columns, under postsynaptic blockade conditions	Sprague-Dawley rats at P0–P8 age; blockade of postsynaptic activation by inserting Elvax (polymer loaded with the glutamate receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonovaleric acid for prolonged, controlled release) over the right S1 in P0 rat pups within 6 h of birth; electrocauterization of C row of vibrissae at either P0, P1, P2, P3, or P6; AChE activity analysis. Three groups: control group without subdural lesion, Control Elvax group loaded with a vehicle solution (inactive isomer of APV) and Elvax group	The interruption of postsynaptic activity reduced the responses to changes in the cortical region of both the compromised and adjacent barrel row. There is an important correlation between postsynaptic and presynaptic activity in the stabilization process of their connections and in the plasticity performance of the critical period
Seelke et al. (2012)	S1	To examine the developmental time course of the topography maps' emergence in S1 using rats as animal model	<i>Long Evans</i> rats at postnatal ages: P5, P10, P15, P20, and adults (P60); electrophysiological records from multiple sites in medial S1 correlating these data to architectonic distinctions; cytochrome oxidase; serotonin (5-HT) and myelin stainings	In P5, the S1 region is dominated by afferent vibrissae and its anatomical edges are already present. Topographic maps appear in the subsequent two weeks and become adult-like at the end of the third postnatal week (P20)
van der Bourg et al. (2019)	S1	To investigate the cortical processing of whisker-evoked responses and its maturation during development of mouse barrel cortex	C7BL/6 mice at P11–P27 age; single- and dual-whisker stimuli (C1 and C2) in a systematic manner; high-density multi electrode recordings <i>in vivo</i> ; analyse de multi-unit activity and local potential fields across all layers of C1 and C2; cytochrome-oxidase (COX) histology to identify the barrel map	A gradual reduction in paired-pulse stimuli suppression during development related to development of early and distinct responses; the trans-columnar spread of early activity increased during development; Sequential activation of two neighborhood whiskers revealed a strong suppression of the second response, which was most pronounced in >P13 animals. Whisker stimulation evoked distinct responses and profiles in activated barrel columns due to significant changes in S1: greater temporal precision and sharpening of response specificity
Stafford (1984)	V1	To define the critical period in visually deprived mice	<i>Long Evans</i> rats by recording visual evoked potentials (VEPs) from the cortical surface after monocular deprivation at different stages of development between 2 and 10 weeks after birth	Monocular deprivation in young animals reduces both the visual acuity and the contrast sensitivity of the deprived eye and that the depth of attenuation depends upon the age at onset of deprivation. This suggests that the critical period is almost over by 6 weeks post-natally
Antonini (1999)	V1	To elucidate the correlation between anatomical changes and functional plasticity in the development of the visual cortex, both during normal development and after plasticity induced by monocular deprivation	C57Bl/6 mice at P17–P60 age; monocular deprivation with eyelids trimmed within P17–P44; Tracer injections at lateral geniculate nucleus (LGN) sites to reconstruct single axons serving the contralateral eye and innervating the binocular portion of V1; single-unit electrophysiological recordings; biocytin histochemistry; Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin PHA-L immunohistochemistry	Monocular deprivation ending at P40 appeared to promote the growth of the open eye's contralateral projection without causing the closed eye's contralateral input to shrink. Continued deprivation to P60 prevented the growth of the closed eye's contralateral inputs
Fischer et al. (2007)	V1	To answer whether adult V1 can recover from prolonged DM	C57BL mice at P21 to P45 ages; long term monocular deprivation from early development to mature ages (well past the critical period); using electrophysiological methods	Partial recovery in V1 after deprivation and almost complete recovery of visual acuity and Ocular Dominance (OD) after reopening the eye followed by occlusion of the non-deprived eye. This findings suggest that adult visual experience can restore visual functions which fail to develop properly as a result of deprivation in early development

(Continued)

TABLE 1 | Continued

References	Cortical area	Objective	Experimental and control group	Main results
Faguet et al. (2009)	V1	To characterize possible differences in the contralateral and ipsilateral pathways at the peak of the critical plasticity period	C57BL mice at P-28 age, monocular deprivation by suture and contralateral eye enucleation; by imaging intrinsic optical responses	Visual deprivation results in a loss of the ability of cortical response to stimulation through the private eye. In addition, the ipsilateral eye pathway is affected by the quality of vision through the opposite eye. This findings indicate that although both contra and ipsilateral eye pathways require visual experience for their maintenance, ipsilateral eye projections bear an additional, unique sensitivity to binocular interactions
Levine et al. (2017)	V1	To determine the effect of Monocular Deprivation during the critical period and test whether Environmental Enrichment can rescue the post-critical period binocular correspondence	C57BL mice/6; monocular deprivation to P19/20 to P30/P40 ages; both single-unit electrophysiology and two-photon calcium imaging; environmental enrichment	The results show that for cells that are clearly dominated by one of the two eyes, the input representing the weaker eye changes its orientation preference to align with that of the dominant eye, to achieve binocularly matched orientation preference. These studies thus reveal ocular dominance as a key driver of the binocular matching process, consistent with a Hebbian mechanism whereby the dominant input instructs the weaker input to adopt its tuning properties
de Villiers-Sidani et al. (2007)	A1	To examine the effects of exposure to pure tones on the auditory cortex of developing rats at different postnatal ages	<i>Sprague-Dawley</i> rats at P10 and P60 ages; stimulation of the left ear with 7 kHz pure tones at eight sound intensities [0–70 dB] at a rate of two stimuli per second; electrophysiological recordings of a single or small cluster of A1 neurons; A1 cortical mapping according to electrophysiological characteristics	Evoked potentials at A1 are recorded for the first time at P10 and, by P14, all components of an adult-like evoked response (P60) are present. Pure-tone exposure resulted in profound, persistent alterations in sound representations in A1 only if the exposure occurred during a brief period extending from postnatal day 11 (P11) to P13
de Villiers-Sidani et al. (2008)	A1	To investigate whether the closing of the critical period should be considered as a uniform event or as a process controlled by progressive, local, activity-oriented changes in this cortical area	<i>Sprague-Dawley</i> rats before hearing onset at P7 and up to 1 week after the normal closure of the critical period for spectral tuning; different from auditory stimuli	The closing of the critical period is not unitary to the entire cortex, it occurs locally in cortical subregions according to experience. These results indicate that the control of the duration and closure of the critical period are dependent on the local state of cortical (or limited-sector system) maturation.
Zhou et al. (2011)	A1	Understanding the critical period should be seen as an early stage of development of brain growth	<i>Sprague Dawley</i> rats were exposed to moderate level continuous acoustic noise from Pw8–Pw13; auditory brainstem response measurement; quantitative immunoblotting and ELISA	There is a broad reversal of maturational changes that mark a substantial reversal of the adult functional state back toward a less mature. The present study indicates that this non-structured sensory bombardment can by itself drive a change in inhibitory and excitatory circuits, and a reduction in elements of the extracellular matrix linked to the reinstatement of plasticity in the cortex
Park et al. (2019)	A1	To examine the serial change of sound-specific auditory cortical activation patterns in age-matched normal hearing (NH) and young single-sided deafness (YSSD) rats to understand the critical period that influences a benefit of a binaural hearing	<i>Sprague-Dawley</i> rat at age; left-side cochlear ablations at the P10; sound stimulation of the right ear; multi neural recording in the bilateral auditory cortices during P14–P73; sound-evoked multi neural recording in bilateral auditory cortex.	NH group: larger peak amplitude and total responsive area of the contralateral hemisphere to sound stimulation in all ages. YSSD group: reactive area in the contralateral side was significantly smaller than that in the ipsilateral side at post-deafening (PD) 2 weeks (W) and PD4W, indicating the disappearance of contralateral dominance within PD4W. Monaural stimulation from the hearing ear exclusively activated the contralateral hemisphere at PD6W and PD8W that leads to loss of capacity for plastic reorganization. The early unilateral deafening leads to an alternation of contralateral dominance by a more rapid and massive reorganization toward the ipsilateral cortex.



findings regarding the time window of the CP for neuroplasticity (Reagan-Shaw et al., 2008).

The time window of the CP for neuroplasticity usually starts at neurogenesis followed by neuronal migration during the first postnatal week (Berry and Rogers, 1965). The time window in S1 starts earlier than in the V1 and A1 areas (Figure 5). The fundamental mechanisms of the brain formation of mice and rats are under continued debate. Thus, the early cortical patterning centers such as fibroblast growth factors (FGFs) have been suggested to define the border of each cortical area by controlling the expression of regulatory genes (Schubert et al., 2015). These genes encode cell adhesion molecules such as cadherins and axon guidance molecules such as ephrins, which characterize neocortex arealization (O'Leary and Wilkinson, 1999; Pallas, 2001). The shift of the gamma-aminobutyric acid (GABA) from excitatory to inhibitory activity is also an important subject (Represa and Ben-Ari, 2005). Furthermore, the end of the time window of the CP for neuroplasticity is modulated by GABAergic interneurons that restrict the pruning of excess connections: Hebbian Theory (Martens et al., 2015). In addition, environmental stimuli play an important role to connect the thalamocortical afferents to the correct cortical primary sensory area (Hanganu-Opatz, 2010). Interestingly, the peak of the time window of the CP for neuroplasticity may occur halfway of topographic map formation (Seelke et al., 2012) and at different moments from the first postnatal day in the S1, V1, and A1 areas (Figure 5).

This systematic review indicated that the time window of the CP for neuroplasticity in S1 starts at P0 (Figure 5) due to the influence of intrinsic and extrinsic factors. For instance, sensory deprivation at the early postnatal development of whiskers changes the functional and morphological organization of the barrel field (Schlaggar et al., 1993) and leads to adult-like anatomical and functional S1 map (Seelke et al., 2012). All findings related to the time window of the CP for neuroplasticity in S1 were found from P0 to P21. The endocannabinoid CB1 receptor and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) may regulate the development of interneurons in a specific S1 subregion such as the barrel field, forelimb, hind limb, and trunk (Li et al., 2009; Seelke et al., 2012; van der Bourg et al., 2019).

The time window of the CP for neuroplasticity can simultaneously occur in different cortical areas. The CP for neuroplasticity in A1 only starts when the time window in S1 is already halfway (Figure 5), followed by the refinement of cerebral cortical responses and simultaneous significant changes in the cochlea (Kalish et al., 2020). Since the duration of the CP for neuroplasticity in A1 may not extend beyond the first month of postnatal life (Park et al., 2019), early auditory stimulus seems important for the development of binaural hearing (Polley et al., 2013). It is very complex to determine the time window of the CP for neuroplasticity in A1 since different sound levels stimulate only some specific subregions (de Villiers-Sidani et al., 2008), and the inhibitory neuronal activity is involved in the bilateral hearing development and the maturation of auditory refinement responses that end within P11–P14 (Kalish et al., 1912).

2020). Similar to S1, the extension of the CP for neuroplasticity in A1 may occur due to environmental stimuli that modulate intrinsic mechanisms such as continuous BDNF downregulation and tropism change of GABA receptor subunits (Zhou et al., 2011; refer to **Figure 5**).

The time window of the CP for neuroplasticity ends in A1 when it virtually starts in V1 represented by the eyes of the small rodent opening at P14. Stanford et al. (1984) reported that monocular deprivation causes severe effects from the second up to the fourth postnatal week. However, the reorganization of contralateral and ipsilateral eye pathways is less affected at P40 (Antonini et al., 1999). Similar to S1 and A1, the time window of the CP for neuroplasticity in V1 is very complex to understand since the regulatory molecules involved in the determination of binocular zone are very different from those related to the monocular zone (Fischer et al., 2007; Faguet et al., 2009; Levine et al., 2017). At the same time, the environmental visual stimulus also activates the expression of some immediate early genes (IEGs) related to neuroplasticity modulation (Mower et al., 2002; Taha et al., 2002).

The data available in the studies of this systematic review indicate that the time window of the CP for neuroplasticity (**Table 1**) remains unclear (Ribot et al., 2021) since this complex event involves several different knowledge subjects (Wang et al., 2010; Erzurumlu and Gaspar, 2012; Levelt and Hübener, 2012; Takesian et al., 2018). In addition, it involves different molecular, cellular, and morphological mechanisms in S1, A1, and V1 that are influenced by environmental stimuli. This background supports novel approaches for further clinical trials on the treatment of reversible sensory deprivations by using prostheses, implants, and robotic exoskeletons.

## CONCLUSION

Although both the start and end of the time window of the CP for neuroplasticity in S1, V1, and A1 are still not precisely determined, this review roughly estimated the time window in the primary sensory areas of small rodents in the function of several intrinsic and extrinsic factors. In addition, S1 showed the longest time window of the CP for neuroplasticity followed by V1 and then A1. Due to its complexity and variability,

## REFERENCES

- Antonini, A., Fagiolini, M., and Stryker, M. P. (1999). Anatomical correlates of functional plasticity in mouse visual cortex. *J. Neurosci.* 19, 4388–4406. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-11-04388.1999
- Berry, M., and Rogers, A. W. (1965). The migration of neuroblasts in the developing cerebral cortex. *J. Anat.* 99, 691–709.
- de Villers-Sidani, E., Chang, E. F., Bao, S., and Merzenich, M. M. (2007). Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. *J. Neurosci.* 27, 180–189. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3227-06.2007
- de Villers-Sidani, E., Simpson, K. L., Lu, Y. F., Lin, R. C. S., and Merzenich, M. M. (2008). Manipulating critical period closure across different sectors of the primary auditory cortex. *Nat. Neurosci.* 11, 957–965. doi: 10.1038/nn.2144

the determination of both the start and end of the CP for neuroplasticity and the mechanisms involved is still unclear. Moreover, advanced clinical trials on therapies for neuronal dysfunctions are encouraged to better understand its clinical relevance for humans.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB contributed to the study concept and design, obtained funding, and performed supervision. LP, GC, and MC contributed to data acquisition. LP and GC contributed to the drafting of the manuscript. ID and CB contributed to critical revision for important intellectual content. All authors had full access to all data and took responsibility for the integrity of the information, text, and the accuracy of the analysis. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This review was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grants 310054/2018-4, 447835/2014-9, 483404/2013-6, 444967/2020-6, and 444982/2020-5) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, grant PROCAD 21/2018).

## ACKNOWLEDGMENTS

The Health Science Institute and the Federal University of Para are acknowledged for their technical support.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2022.763245/full#supplementary-material>

- Erzurumlu, R. S., and Gaspar, P. (2012). Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1540–1553. doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.08075.x
- Faguet, J., Maranhao, B., Smith, L. S., and Trachtenberg, J. T. (2009). Ipsilateral eye cortical maps are uniquely sensitive to binocular plasticity. *J. Neurophysiol.* 101, 855–861. doi: 10.1152/jn.90893.2008
- Fischer, Q. S., Aleem, S., Zhou, H., and Pham, T. A. (2007). Adult visual experience promotes recovery of primary visual cortex from long-term monocular deprivation. *Learn. Mem.* 14, 573–580. doi: 10.1101/lm.676707
- Goodman, C. S., and Shatz, C. J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72(Suppl.), 77–98. doi: 10.1016/S0092-8674(05)80030-3
- Hanganu-Opatz, I. L. (2010). Between molecules and experience: role of early patterns of coordinated activity for the development of

- cortical maps and sensory abilities. *Brain Res. Rev.* 64, 160–176. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.03.005
- Hooijmans, C. R., Rovers, M. M., de Vries, R. B. M., Leenaars, M., Ritskes-Hoitinga, M., and Langendam, M. W. (2014). SYRCL's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* 14, 43. doi: 10.1186/1471-2288-14-43
- Ismail, F. Y., Fatemi, A., and Johnston, M. V. (2017). Cerebral plasticity: windows of opportunity in the developing brain. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 21, 23–48. doi: 10.1016/j.ejpn.2016.07.007
- Johnston, M. V. (2009). Plasticity in the developing brain: implications for rehabilitation. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 15, 94–101. doi: 10.1002/ddrr.64
- Kalish, B. T., Barkat, T. R., Diel, E. E., Zhang, E. J., Greenberg, M. E., and Hensch, T. K. (2020). Single-nucleus RNA sequencing of mouse auditory cortex reveals critical period triggers and brakes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 11744–11752. doi: 10.1073/pnas.1920433117
- Kral, A. (2013). Auditory critical periods: a review from systems perspective. *Neuroscience* 247, 117–133. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.021
- Levelt, C. N., and Hübener, M. (2012). Critical-period plasticity in the visual cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 309–330. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113813
- Levine, J. N., Chen, H., Gu, Y., and Cang, J. (2017). Environmental enrichment rescues binocular matching of orientation preference in the mouse visual cortex. *J. Neurosci.* 37, 5822–5833. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3534-16.2017
- Li, P., Rudolph, U., and Huntsman, M. M. (2009). Long-term sensory deprivation selectively rearranges functional inhibitory circuits in mouse barrel cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 12156–12161. doi: 10.1073/pnas.0900922106
- Martens, M. B., Celikel, T., and Tiesinga, P. H. E. (2015). A developmental switch for hebbian plasticity. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004386. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004386
- Mower, A. M. F., Liao, D. S., Nestler, E. J., Neve, R., and Ramoa, A. S. (2002). *CAMP/Ca<sup>2+</sup> Response element-binding protein function is essential for ocular dominance plasticity.* *J. Neurosci.* 22, 2237–2245. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-06-02237.2002
- O'Leary, D. D. M., and Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 65–73. doi: 10.1016/S0959-4388(99)80008-7
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., et al. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 372, n71. doi: 10.1136/bmj.n71
- Pallas, S. L. (2001). Intrinsic and extrinsic factors that shape neocortical specification. *Trends Neurosci.* 24, 417–423. doi: 10.1016/S0166-2236(00)01853-1
- Park, S. K., Lee, S., Kim, D. H., Lee, M. Y., and Oh, S. (2019). Auditory cortical plasticity and reorganization in rats with single-sided deafness during early developmental period. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 128, 16S–25S. doi: 10.1177/0003489419837687
- Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F., and Merabet, L. B. (2005). The plastic human brain cortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 377–401. doi: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144216
- Polley, D. B., Thompson, J. H., and Guo, W. (2013). Brief hearing loss disrupts binaural integration during two early critical periods of auditory cortex development. *Nat. Commun.* 4, 2547. doi: 10.1038/ncomms3547
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., and Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22, 659–661. doi: 10.1096/fj.07-9574LSF
- Represa, A., and Ben-Ari, Y. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci.* 28, 278–283. doi: 10.1016/j.tins.2005.03.010
- Ribot, J., Breton, R., Calvo, C. F., Moulard, J., Ezan, P., Zapata, J., et al. (2021). Astrocytes close the mouse critical period for visual plasticity. *Science* 373, 77–81. doi: 10.1126/science.abb5273
- Rice, F. L., and Van Der Loos, H. (1977). Development of the barrels and barrel field in the somatosensory cortex of the mouse. *J. Compar. Neurol.* 171, 545–560. doi: 10.1002/cne.901710408
- Schlaggar, B. L., Fox, K., and O'Leary, D. M. (1993). Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature* 364, 623–626. doi: 10.1038/364623a0
- Schubert, D., Martens, G. J. M., and Kolk, S. M. (2015). Molecular underpinnings of prefrontal cortex development in rodents provide insights into the etiology of neurodevelopmental disorders. *Mol. Psychiatry* 20, 795–809. doi: 10.1038/mp.2014.147
- Seelke, A. M. H., Dooley, J. C., and Krubitzer, L. A. (2012). The emergence of somatotopic maps of the body in S1 in rats: the correspondence between functional and anatomical organization. *PLoS ONE* 7, e32322. doi: 10.1371/journal.pone.0032322
- Stafford, C. A. (1984). Critical period plasticity for visual function: definition in monocularly deprived rats using visually evoked potentials. *Ophthalm. Physiol. Opt.* 4, 95–100. doi: 10.1111/j.1475-1313.1984.tb00339.x
- Taha, S., Hanover, J. L., Silva, A. J., and Stryker, M. P. (2002). Autophosphorylation of *AcAMKII* is required for ocular dominance plasticity. *Neuron* 36, 483–491. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00966-2
- Takesian, A. E., Bogart, L. J., Lichtman, J. W., and Hensch, T. K. (2018). Inhibitory circuit gating of auditory critical-period plasticity. *Nat. Neurosci.* 21, 218–227. doi: 10.1038/s41593-017-0064-2
- van der Bourg, A., Yang, J. W., Stüttgen, M. C., Reyes-Puerta, V., Helmchen, F., and Luhmann, H. J. (2019). Temporal refinement of sensory-evoked activity across layers in developing mouse barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 50, 2955–2969. doi: 10.1111/ejn.14413
- van Zutphen, L. F., Baumans, V., and Beynen, A. C. (2001). *Principles of Laboratory Animal Science.* Amsterdam, NY: Elsevier.
- Wang, B. S., Sarnaik, R., and Cang, J. (2010). Critical period plasticity matches binocular orientation preference in the visual cortex. *Neuron* 65, 246–256. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.002
- Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. (1965). Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J. Neurophysiol.* 28, 1029–1040. doi: 10.1152/jn.1965.28.6.1029
- Zhou, X., Panizzutti, R., de Villers-Sidani, E., Madeira, C., and Merzenich, M. M. (2011). Natural restoration of critical period plasticity in the juvenile and adult primary auditory cortex. *J. Neurosci.* 31, 5625–5634. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6470-10.2011

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Pedrosa, Coimbra, Corrêa, Dias and Bahia. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.