



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E
MODELAGEM MOLECULAR

RAFAELA MARTINS REIS

**CURSO TEMPORAL DA DEGRADAÇÃO E RESTAURAÇÃO DE REDES
PERINEURONIAIS APÓS A AÇÃO DA ENZIMA ChABC ENTREGUE VIA
IMPLANTE DE BIOMEMBRANA NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

BELÉM/PA

2020

RAFAELA MARTINS REIS

CURSO TEMPORAL DA DEGRADAÇÃO E RESTAURAÇÃO DE REDES PERINEURONAIS APÓS A AÇÃO DA ENZIMA ChABC ENTREGUE VIA IMPLANTE DE BIOMEMBRANA NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

BELÉM/PA

2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

R375c Reis, Rafaela Martins
Curso temporal da degradação e restauração de redes
perineuronais após a ação da enzima ChABC entregue via
implante de biomembrana no córtex cerebral de ratos /
Rafaela Martins Reis. — 2020.
61 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém,
2020.

1. Redes perineuronais. 2. Matriz extracelular. 3.
Condroitinase ABC. 4. Córtex somestésico primário. I.
Título.

CDD 615.1900724

RAFAELA MARTINS REIS

CURSO TEMPORAL DA DEGRADAÇÃO E RESTAURAÇÃO DE REDES PERINEURONAIS APÓS A AÇÃO DA ENZIMA ChABC ENTREGUE VIA IMPLANTE DE BIOMEMBRANA NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Belém/PA, 18 de Março de 2020

Banca examinadora:

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

**Profa. Dra. Karen Renata Matos
Oliveira ICB – UFPA (Membro
interno)**

**Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira
Batista NMT – UFPA (Membro
externo)**

**Profa. Dra. Ivanira Amaral Dias ICS
– UFPA (Suplente)**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Delmo Reis e Elci Martins e irmão Raphael Martins, por todo suporte, carinho e amor que me foi dedicado, pelo cuidado com a minha educação, por me incentivarem todos os dias a não desistir dos meus sonhos, devo a eles essa conquista.

A minha família, em sua maioria, de educadores, que sempre estiveram presentes e torcendo por mim, em especial, minha madrinha, Herciléia Martins e minha prima/irmã Heloisa Martins.

Ao meu orientador, Carlomagno Pacheco Bahia, pelos ensinamentos e comprometimento devotados a este trabalho.

Ao Laboratório de Neuropatologia Experimental, especialmente a Anderson Valente Amaral, pela ajuda com a estereologia e ao Laboratório de Protozoologia, por que as horas passadas ao microscópio foram de grande valia ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial, Ana Camila Araujo, Raissa Tancredi, Vanessa Vidal, que me acompanham nessa jornada desde a graduação e Jade Vilhalva, por estar comigo nos melhores e piores momentos.

Aos meus amigos e companheiros do LNP, por dividirem a árdua tarefa de ser cientista no Pará e a Thamyres Bastos que por meses revezou comigo as ditas horas no microscópio.

A todas as mulheres que fazem ciência.

A todos, meus mais sinceros agradecimentos!

Viver é arriscar tudo. Caso contrário, você é apenas um pedaço de moléculas montadas aleatoriamente à deriva, onde o universo te sopra.

GAO; GUTERMAN; RIDLEY. RICK AND MORTY.

RESUMO

Os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PSGs) são componentes especializados da matriz extracelular (MEC) do tecido nervoso relacionados à restrição da neuroplasticidade, à estabilização sináptica e a concentração de fatores de essenciais à fisiologia celular. Quando condensados, formam as redes perineuronais (RPNs) e seu surgimento coincide com o fim do período crítico de plasticidade e redução do potencial de reorganização sináptica no sistema nervoso central (SNC). A degradação das RPNs, pela enzima condroitinase ABC (ChABC), vem sendo usada como ferramenta para “reabertura” da neuroplasticidade no SNC adulto. Neste trabalho, analisamos a dinâmica temporal de degradação e ressurgimento das RPNs no córtex somestésico primário (S1) após degradação pela enzima ChABC em modelo experimental *in vivo* usando um veículo para entrega focal e sem lesionar o tecido nervoso. Deste modo, utilizamos *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar* adultos que foram submetidos ao implante da biomembrana feita com etileno-vinil-acetato saturada com a enzima ChABC no hemisfério cerebral esquerdo (HE). Os tempos de vida pós-implante foram 1, 3 e 7 dias, utilizando hemisfério cerebral não implantado (hemisfério direito – HD) como controle. Nossos resultados demonstraram que a degradação das RPNs via implante da biomembrana saturada com ChABC aconteceu a partir do dia 1 pós-implante com redução do número total de células com RPNs maduras no hemisfério implantado (HE). Também houve aumento significativo no número total de células com RPNs imaturas no HD 7 dias após o implante. Não houve processo neuroinflamatório ou ativação glial, mas a retirada de componentes da MEC alterou a imunomarcagem das células nervosas 7 dias após o implante da biomembrana com a ChABC. Portanto, a biomembrana de polímero de *etileno-vinil-acetato* foi eficiente para entrega focal da enzima ChABC e promoveu degradação das RPNs na área S1 de ratos adultos, não provocou lesão mecânica no tecido nervoso, nem ativou reatividade glial e a área de degradação enzimática diminuiu com o passar do tempo (de 1 para 7 dias).

Palavras chave: Redes Perineuronais, Matriz Extracelular, Condroitinase ABC, Córtex Somestésico Primário, Microglias, Astrócitos.

ABSTRACT

The chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) founded on the extracellular matrix (ECM) of nervous tissue are the main components related to the restriction of neuroplasticity. When condensed, they form the perineuronal nets (PNNs) and their appearance coincides with the end of the critical period of plasticity and reduction of the reorganization potencial of the central nervous system (CNS). The degradation of PNNs by the enzyme chondroitinase ABC has been used as a tool for reopening periods of neuroplasticity in adult nervous system.. In this work, we analyzed the temporal dynamics of PNNs degradation and restoration in the primary somesthetic cortex (S1) after degradation by the enzyme ChABC in an *in vivo* experimental model using a biomembrane vehicle for focal delivery and without damaging nervous tissue. In this way, we used adult Wistar rats that were submitted to the implantation of the biomembrane made with ethylene-vinyl-acetate saturated with the enzyme ChABC, with 1, 3 and 7 days of survival time after implantation, using the non-implanted side cerebral hemisphere as a control. Our results demonstrated that degradation via implantation of the biomembrane saturated with ChABC was efficient from day 1, with a drastic reduction in the implanted hemisphere (LH) of mature PNNs. There was also a significant increase in the number of immature PNNs in the HD even 7 days after implantation. Neither the biomembrane or the enzyme triggered signs of a neuroinflammatory process or glial activation, but the removal of ECM components interfered with the immunostaining of nerve cells 7 days after the implantation of the biomembrane with ChABC. Therefore, we concluded that the ethylene-vinyl-acetate polymer biomembrane was efficient for focal delivery of the ChABC enzyme and promoted degradation of PNNs in the S1 area of adult rats, did not cause mechanical damage to the nervous tissue, nor activated glial reactivity and the area of enzymatic degradation decreases over time (from 1 to 7 days).

Key words: Perineuronal nets, Extracellular Matrix, Chondroitinase ABC, Primary Somesthetic Cortex, Microglia, Astrocytes.

LISTAS DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Composição das lecticanas | 14 |
| Figura 2: Desenho esquemático das Redes Perineuronais | 15 |
| Figura 3: Imagem da biomembrana feita com etileno-vinil-acetato | 19 |
| Figura 4: Desenho experimental | 24 |
| Figura 5: Halo de degradação após a ação da enzima ChABC | 30 |
| Figura 6: Número Total de Células <i>Vicia villosa</i> positivas | 31 |
| Figura 7: Número total de células <i>Vicia villosa</i> positivas entre hemisférios cerebrais e tempos de sobrevida | 32 |
| Figura 8: Caracterização de <i>Vicia villosa</i> nos hemisférios cerebrais | 33 |
| Figura 9: Caracterização do número de RPNs imaturas e maduras intra hemisférios cerebrais em 1D | 35 |
| Figura 10: Caracterização do número de RPNs imaturas e maduras intra hemisférios cerebrais em 3D | 36 |
| Figura 11: Número de células VV+ imaturas e maduras nos hemisférios cerebrais implantados com a biomembrana saturada com ChABC em 7D | 37 |
| Figura 12: Efeito da degradação das RPNs sobre células astrocíticas em 1D | 39 |
| Figura 13: Efeito da degradação das RPNs sobre células astrocíticas em 3D | 40 |
| Figura 14: Efeito da degradação de RPNs sobre células astrocíticas em 7D | 42 |
| Figura 15: Efeito da degradação das RPNs sobre as células microgliais em 1D | 44 |
| Figura 16: Efeito da degradação das RPNs sobre as células microgliais em 3D | 45 |
| Figura 17: Efeito da degradação das RPNs sobre as células microgliais em 7D | 46 |

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|--|
| ABC | Complexo avidina-biotina |
| AVE | Acidente Vascular Encefálico |
| BSA | Albumina de Soro Bovino |
| CAGs | Glicosaminoglicanas |
| ChABC | Condroitinase ABC |
| DAB | Diaminobenzidina |
| GFAP | Proteína Ácida Fibrilar Glial |
| GND | Glicose oxidase-diaminobenzidina-níquel |
| HA | Hialunoran |
| HD | Hemisfério Direito |
| HE | Hemisfério Esquerdo |
| IBA-1 | Molécula Adaptadora Ligante de Cálcio Ionizado-1 |
| MEC | Matriz Extracelular |
| PGSC | Proteoglicanos de Sulfato de Condroitina |
| PV+ | Parvalbumina Positivos |
| S1 | Córtex Somestésico Primário |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TN-R | Tenascina – R |
| V1 | Córtex Visual |
| Vv | <i>Vicia villosa</i> |
| VV+ | <i>Vicia villosa</i> positivas |
| WfA | <i>Wisteria Aglutinina floribunda</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 Matriz extracelular e redes perineuronais: o que são e o que fazem?..... | 13 |
| 1.1.1 Estrutura e composição das Redes Perineuronais..... | 14 |
| 1.1.2 RPNs e a plasticidade do SNC..... | 17 |
| 1.1.3 Degradação de componentes da matriz extracelular do SNC | 18 |
| 1.1.4 As Células da Glia e Neuroplasticidade..... | 19 |
| 1.2 Córtex somestésico primário como modelo experimental | 20 |
| 1.3 Período crítico de plasticidade | 21 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 22 |
| 3. HIPÓTESE..... | 23 |
| 4. OBJETIVOS..... | 23 |
| 4.1 Objetivo geral..... | 23 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 23 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS..... | 24 |
| 5.1 O modelo experimental..... | 24 |
| 5.2 Preparação da membrana feita com o polímero etileno-vinil-acetato | 25 |
| 5.3 Procedimento cirúrgico para implante da membrana feita com o polímero etileno-vinil-acetato..... | 25 |
| 5.4 Perfusão e preparação histológica..... | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 5.5 Procedimentos histoquímicos..... | 26 |
| 5.5.1 Histoquímica para a lecitina <i>Vicia Villosa</i> | 26 |
| 5.5.2 Imunohistoquímica para anti-GFAP e anti-IBA-1..... | 27 |
| 5.6 Lavagem, desidratação e montagem das lâminas..... | 28 |
| 5.7 Procedimentos estereológicos..... | 28 |
| 5.8 Determinação da área de degradação no S1..... | 28 |
| 5.9 Análise estatística..... | 29 |
| 6.0 RESULTADOS..... | 29 |
| 6.1 Área de degradação dos PGSC pela enzima aplicada através da membrana de acetil-vinil-acetato..... | 29 |
| 6.2 O total de células <i>Vicia villosa</i> positivas..... | 30 |
| 6.3 Caracterização e quantificação das células <i>vicia villosa</i> positivas: imaturas e maduras..... | 32 |
| 6.4 Imunomarcção para astrócitos e micróglia após implante de biomembrana saturada com ChABC e degradação das RPNs..... | 38 |
| 7.0 DISCUSSÃO..... | 47 |
| 7.1 Degradação das redes perineuronais no S1 via implante da biomembrana saturada com ChABC..... | 47 |
| 7.2 Padrão de marcação de RPNs após ação da ChABC entregue à área S1 por biomembrana..... | 48 |
| 7.3 Efeito da degradação das RPNs nas as células gliais..... | 48 |
| 8. CONCLUSÃO..... | 52 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 5 |

DEGRADAÇÃO E RESTAURAÇÃO DE REDES PERINEURONAIS APÓS A AÇÃO DA ENZIMA ChABC ENTREGUE VIA IMPLANTE DE BIOMEMBRANA NO CÓRTEX CEREBRAL

1.INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), em uma determinada janela temporal, as respostas do sujeito aos estímulos ambientais ocorrem de forma evidente e em todos os sistemas sensoriais, motor e cognitivos (HENSCH, 2012). Neste momento, o SNC molda-se em resposta aos estímulos ambientais, física e funcionalmente, e esta janela de tempo é chamada de período crítico de plasticidade (LENSJO, 2013). Porém, no início da vida adulta, quando o período crítico de plasticidade se fecha e, assim, a capacidade de regeneração e reorganização funcional do SNC torna relativamente baixa (KNUDSEN, 2004), limitando as respostas adaptativas a danos no encéfalo que podem ser causados, por exemplo, por acidente vascular encefálico (AVE).

Ensaio experimentais têm apontado que os principais componentes da matriz extracelular (MEC) que restringem a neuroplasticidade no tecido nervoso são os Proteoglicanos de Sulfato de Condroitina (PGSC). No SNC adulto, os PGSC atuam como substrato físico para estabilização sináptica e possuem ação inibitória sobre o (re)crescimento axonal e formação de novas sinapses (TANG, 2003). Essa ação é mediada basicamente pelas glicosaminoglicanas (GAGs), o sulfato de condroitina (GAG mais abundante no SNC adulto), sulfato de dermatana, sulfato de keratana e sulfato de heparana (SHERMAN ; BACK, 2007).

No início do desenvolvimento do SNC, os PGSC encontram-se difusos na MEC e vão amadurecendo junto com o sistema nervoso e, quando condensados, formam estruturas especializadas conhecidas como Redes Perineuronais - RPNs (BAHIA et al., 2008). O surgimento das RPNs coincide com fechamento do período crítico de plasticidade e a redução drástica do potencial de reorganização do SNC (HOCKFIELD et al., 1990). As RPNs

podem ser degradadas com uso da enzima Condroitinase ABC (ChABC) e levariam em torno de 30-150 dias para se reorganizar sua estrutura física (BRUCKNER et al., 1998), permitindo a abertura de uma nova janela de plasticidade no SNC e isso pode ser uma alternativa de tratamento à recuperação de danos no SNC (PIZZORUSSO et al., 2006). No entanto, ainda não há descrição precisa sobre o curso temporal do ressurgimento/reorganização das RPNs após a degradação. O presente trabalho propõem, descrever o ressurgimento das RPNs após sua degradação usando-se uma membrana como veículo de entrega da enzima ChABC ao tecido nervoso.

1.1 Matriz extracelular e redes perineuronais: o que são e o que fazem?

Estima-se que a MEC forme cerca de 10-20% do volume encefálico total e está localizada entre as células da glia e neurônios (BIGNAMI et al., 1992). Podendo-se identificar, histologicamente, três tipos de matriz extracelular: **1)** matriz extracelular difusa, dispersa em todo o SNC; **2)** moléculas de matriz extracelular associadas à superfície celular e **3)** matriz extracelular organizada em densas redes perineuronais, envolvendo alguns neurônios nos locais de contato sináptico (DEEPA et al., 2006). A MEC não se configura apenas como um suporte para estabilização estrutural dos tecidos (COWLMAN, 2015), mas também estaria relacionada a interações célula-célula e célula-MEC.(WANG; FAWCETT, 2012; FRANCO, 2011; KWOK et al., 2011).

A composição da MEC encontrada no tecido nervoso é diferente da contida nos outros tecidos, já que não apresenta a mesma proporção de colágeno fibrilar e fibronectina, uma vez que no SNC ela é rica em glicoproteínas como lamininas, tenascinas, integrinas (YAMAGUCHI, 2000) e proteoglicanos (FRANCO, 2011) que são macromoléculas constituídas por um núcleo proteico e pelo menos um glicosaminoglicano (GAG) não ramificado ligado covalentemente à cadeia longa (Figura 2. A). As GAGs que formam os proteoglicanos são o sulfato de dermatana, sulfato de queratana, sulfato de heparana e sulfato de condroitina (KJELLEN AND LINDAHL, 1991).

Os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSC) são macromoléculas compostos pela família das lecticanas, a versicana, neurocana, brevicana e agrecana (Figura 1), comumente encontradas no SNC em desenvolvimento e mostram ter papel indispensável durante o desenvolvimento do tecido nervoso (LUNDELL, 2004), sendo a neurocana e a brevicana as mais abundantes no SNC (MILEV et al., 1998). Os PGSC constituem a maior população de proteoglicanos no SNC e estão presentes nos neurônios GABAérgicos do tipo parvalbumina positivos (CELIO,1993) que apresentam as Redes Perineuronais (RPNs).

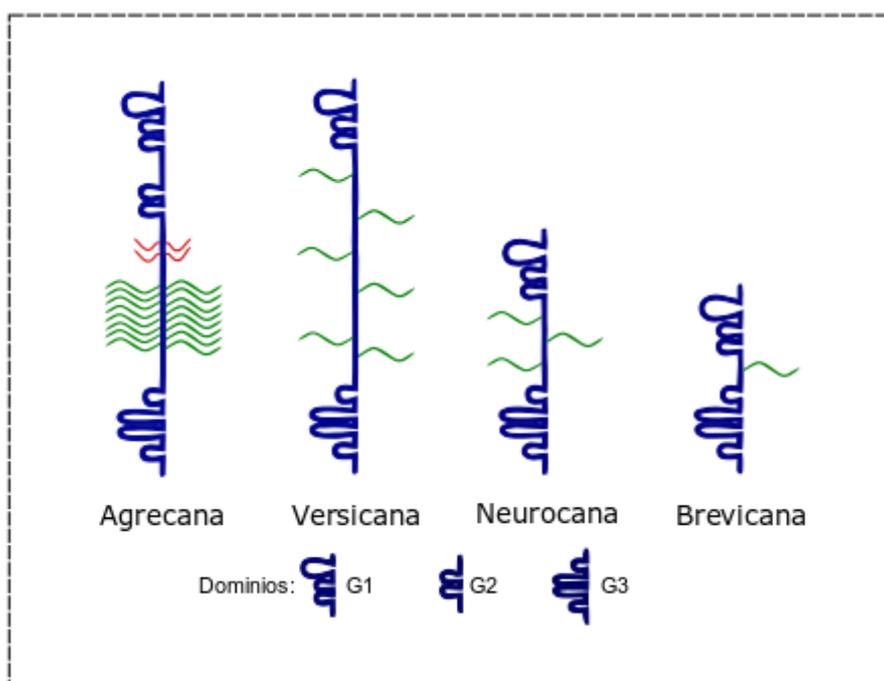


Figura 1: **Desenho esquemático da composição das Lecticanas.** Todas apresentam um domínio *N*-terminal G1 e um domínio *C*-terminal G3 com exceção de agrecana que possui também um domínio G2. Em todas as lecticanas há cadeias de sulfato de condroitina (verde). Agrecana possui cadeias de sulfato de queratana (vermelho). Adaptado de Yamagushi, 2000.

1.1.1 Estrutura e composição das Redes Perineuronais

As RPNs foram caracterizadas pela primeira vez por Camillo Golgi (ver Celio *et al.*, 1998), por meio de sua técnica de coloração por nitrato de prata, e foram consideradas estruturas anastomosadas de astrócitos. Atualmente, são identificadas como estruturas densas da MEC que envolvem as sinapses, o

corpo celular e os dendritos proximais de neurônios parvalbumina positivos (CELIO, 1994; BRUKNER et al., 2000; CARULLI, 2006). Os principais componentes das RPNs incluem agregados moleculares de hialuronan (HA), proteínas de ligação, PGSC e tenascina-R (TN-R) (Figura 2).

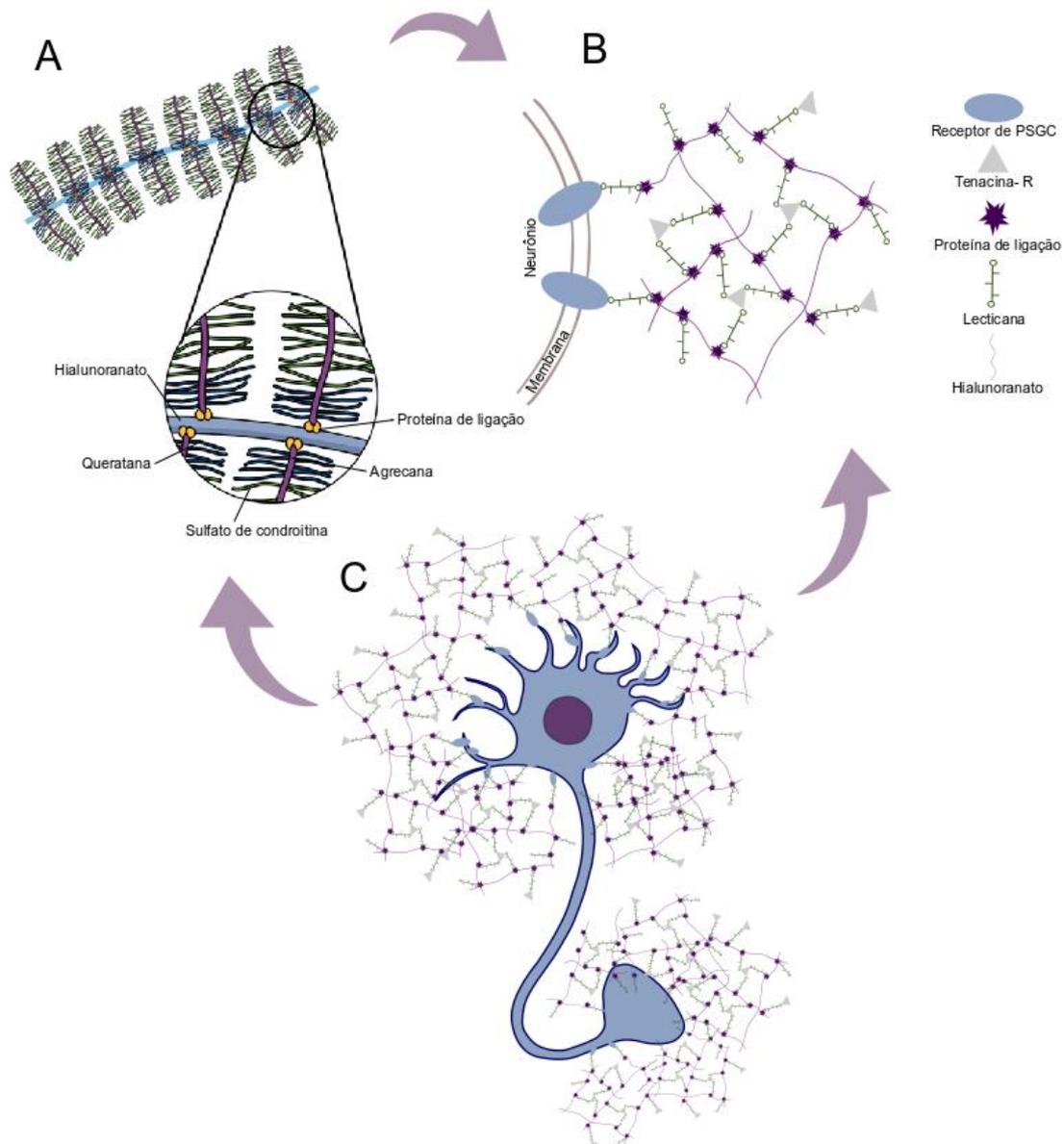


Figura 2: **Desenho esquemático das Redes Perineuronais.** **A)** Estrutura de um PGSC. **B)** Esquema ilustrativo da distribuição dos componentes das RPNs e **C)** organização ao redor de uma célula neuronal.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram interações entre estas moléculas dentro do espaço extracelular, em que os PGSC interagem com cadeias do polímero HA na superfície da célula (OOHASHI et al., 2015). As proteínas de ligação estabilizam as interações entre os PGSC e HA (WANG;

FAWCETT, 2012). O domínio c-terminal das proteínas do núcleo PGSC, ligam-se à proteína trimérica Tn-R (DEEPA et al., 2006; KWOK et al., 2010), formando a estrutura altamente organizada de uma RPN (Figura 2, B).

As RPNs estão desigualmente distribuídas em todo o SNC (BERTOLOTTI et al., 1996; MABUCHI et al., 2001), têm sido observadas no córtex visual (V1), no córtex de barris de pequenos roedores (S1), nos núcleos cerebelares profundos, na substância negra do mesencéfalo, no hipocampo e na medula espinhal (BRUCKNER et al., 2008; CARULLI et al., 2006; MCRAE et al., 2007; MORRIS AND HENDERSON, 2000; PIZZORUSSO et al., 2002). Diferentes métodos de marcação das RPNs foram desenvolvidos como, por exemplo, uso de lectinas extraídas de plantas tais como a aglutinina de *Wisteria* Aglutinina *floribunda* (WfA) e *Vicia villosa* (Vv) que se ligam seletivamente ao terminal alfa e/ou beta da *N*-acetilgalactosamina, ou anticorpos associados a marcadores específicos (BAHIA et al., 2008; WANG; FAWCETT, 2012)

Três diferentes tipos de neurônios foram identificados e indicados através da marcação por WfA (WEGNER et al., 2003), classificando as redes perineuronais de acordo com suas características morfológicas em: **1)** as que envolvem neurônios não piramidais e compõem o maior grupo de redes perineuronais no córtex parietal de ratos (cerca de 67%); **2)** que formam um envoltório de matriz fraca ao redor de células piramidais incluindo o segmento inicial do axônio e a parte proximal do dendrito apical e **3)** as classificadas como redes difusas devido à falta de morfologia clara, porém densas e com alto padrão de marcação por WfA. Estes resultados reforçam a ideia de que as redes perineuronais adaptam-se às diferentes regiões encefálicas e da medula espinhal e aos tipos distintos de neurônios (HORIHASHI, 2015).

Componentes das RPNs como os PGSCs, HA e tenascinas foram detectados no sistema nervoso de animais neonatos mesmo sem a formação de RPNs maduras (HORIHASHI, 2015; DAVID et al., 2013). Durante a fase embrionária e pós-natal tardia do desenvolvimento dos mamíferos, um tipo juvenil de matriz extracelular, composta em sua maioria por neurocanas e tenascin-C, é inicialmente formada no SNC cerca de 2 semanas após o nascimento, ocorrendo um grande processo de remodelação em que há uma diminuição na expressão dessas proteínas, substituindo a maioria da matriz

juvenil por sua forma madura que apresenta em abundância brevicanas e tenacin-R (RAUCH, 2004).

1.1.2 RPNs e a plasticidade do SNC

A plasticidade neural é necessária para a remodelação controlada de circuitos neuronais durante o desenvolvimento do SNC (DZYUBENKO, 2016) e o papel das RPNs na plasticidade sináptica foi estudado *in vivo* (FRISCHKNECHT et al., 2012; SONNTAG et al., 2015). Foram demonstradas alterações nas colunas de dominância ocular em ratos adultos que passaram por privação monocular e, em seguida, degradação de PGSC em V1, gerando uma nova janela de plasticidade na área visual primária (V1), sugerindo que a maturação das RPNs é inibitória para a plasticidade do SNC dependente de experiência sensorial prévia (PIZZORUSSO et al., 2002).

As RPNs maduras participam da estabilização sináptica no tecido nervoso adulto, formando uma barreira física e molecular nas áreas de contato sináptico e isto pode reduzir o potencial plástico dos neurônios no SNC adulto (KARETKO; KRAMSKA, 2009). A relação entre o amadurecimento das RPNs e fechamento do período crítico de plasticidade ainda não é clara, porém a expressão dessas moléculas e o padrão temporal e espacial da formação das RPNs coincidem com processos como a sinaptogênese, o refinamento sináptico, a mielinização dos axônios, sugerindo que a formação e maturação das RPNs dependem de atividade neuronal e coincide com a chegada da fase fisiologicamente madura do SNC (CARULLI et al., 2006; GALTREY et al., 2008).

Desta maneira, além de atuar diretamente na restrição do crescimento axonal e dendrítico, o PGSC das RPNs também modulam a plasticidade neural através da ligação a diferentes moléculas na MEC (VO et al., 2013). Nesse sentido, foi demonstrado que proteínas quimiorrepulsivas à orientação axonal, como a Semaforina 3A e Semaforina 3B, estão altamente concentradas na malha estrutural das RPNs de diferentes populações neuronais no córtex cerebral em maturação, interagindo diretamente com os PGSC e são, portanto,

em uma forma de controle da plasticidade neuronal durante e/ou após o período crítico (CARULLI et al., 2013).

1.1.3 Degradação de componentes da matriz extracelular do SNC

A degradação de elementos da matriz extracelular é usada em modelos experimentais de neuropatologias, como por exemplo, em modelo experimental de Doença de Alzheimer, onde a degradação precoce de RPNs interfere na comunicação entre neurônios gabaérgicos Parvalbumina positivos (PV⁺) e este mecanismo altera a função hipocampal, interferindo no processo de aprendizagem e resgate de memória (KOROTKOVA et al., 2010; VERRET et al., 2012).

Em modelos experimentais de indução de vício à cocaína, a matriz extracelular tem se revelado como componente importante para mudança no comportamento de dependência em humanos e roedores (MASH, 2007; VAN DEN OEVER, 2011). Neste contexto, as RPNs parecem estar envolvidas na etiologia da adição, de modo que a sua degradação seria capaz de inibir a memória do vício e prevenir o comportamento de recaída (BLACKTOP, 2017; SLAKER, 2015)

Usualmente, a degradação dos PSCG no SNC é feita por meio de microinjeção aplicada diretamente no parênquima do tecido nervoso, na qual usa-se uma microagulha para entregar a enzima ChABC diretamente na área de interesse (XUE, 2014). No entanto, esta é uma metodologia que pode causar lesão no tecido nervoso, levando ao desencadeamento de mecanismos de astrogliose reativa e formação de cicatrizes gliais.

Contudo, neste trabalho, os PSGC foram degradados por meio do implante de uma biomembrana feita de *etileno-vinil-acetato* (Figura 3), com mecanismo de *drug delivery*, que quando saturada com a enzima de interesse age como um veículo condutor da ChABC com entrega direta e focal no local alvo (córtex somestésico primário = S1), permitindo que a enzima seja entregue temporalmente de forma linear, melhorando a eficiência na entrega do fármaco (RECINOS et al., 2006; ZATTERA et al., 2005; SMITH et al., 2004) e,

principalmente, sem lesionar o tecido nervoso, conseqüentemente sem ativar células microgliais.

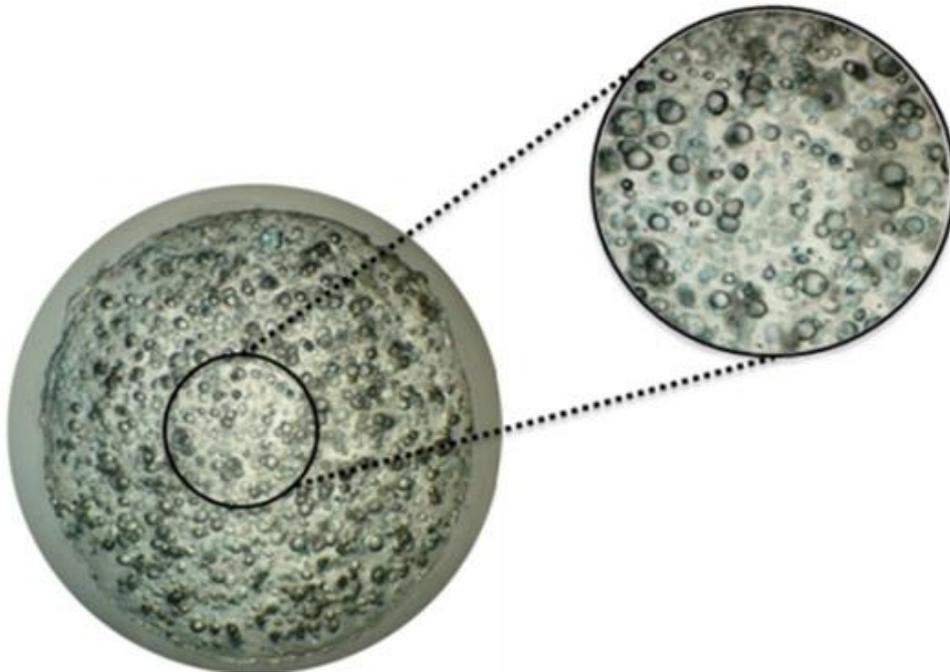


Figura 3. **Fotomicrografia da biomembrana feita com etileno-vinil-acetato.** Imagem da biomembrana, demonstrando as vesículas que permitem a liberação da enzima ChABC no S1.

1.1.4 As Células da Glia e Neuroplasticidade

Estruturas moleculares que formam as redes perineuronais foram observadas com marcadores astrocíticos (SMITH; STRUNZ., 2005; SCHWARZACHER et al., 2006). Desta forma, demonstrou-se que as RPNs são compostas por um tipo especializado de MEC associada às células gliais, rica em grupos polianiónicos e *N*-acetilgalactosamina (BRÜCKNER et al., 2000). A aparência das RPNs é devido à disposição perisináptica dos processos astrocitários e destes componentes extracelulares (BRÜCKNER et al., 1998).

A expressão de Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP do acrônimo inglês *Glial Fibrillary Acidic Protein*) é considerada essencial no processo de astrogliose reativa e formação de cicatrizes gliais que acontece após lesão do tecido nervoso e são estruturas ricas em PGSC (PEKONY, 2004). Finalmente, a análise de astrócitos confirmou que a maioria dos componentes das RPNs são provavelmente produzidos por células da glia, enquanto que exclusivamente a

agrecana e HAS são produzidos por neurônios (GIAMANCO; MATTHEWS, 2012).

Com relação às células microgliais, são importantes componentes da resposta imune no SNC e são ontogeneticamente pertencentes à mesma linhagem de monócitos e macrófagos. Em seu estado de repouso no SNC maduro, as micróglia são altamente ramificadas, com processos longos e pequenos corpos celulares, tornam-se "ativadas" em resposta a lesões do tecido nervoso (KETTENMANN, 2013) e eventos patogênicos no SNC (ZHAN, 2014), portanto desempenham papel importante na homeostase do SNC, durante seu desenvolvimento e no sistema nervoso maduro.

No SNC em desenvolvimento, estas células participam do modelamento de circuitos neurais, isso inclui a promoção de apoptose neuronal, regulando a neurogênese (CANTY; MURPHY, 2008). Além disso, micróglia expressam a maioria das principais classes e subtipos de receptores à neurotransmissores excitatórios e inibitórios, assim como os canais iônicos encontrados classicamente em sinapses neuronais (KETTENMANN et al., 2011; POCOCK et al., 2007). Para se estudar o desenvolvimento e plasticidade do SNC assim como a sua circuitaria neural, um dos modelos experimentais mais usados é o córtex de barris de pequenos roedores (ratos e neurônios) na área somestésica primária (S1).

1.2 Córtex somestésico primário como modelo experimental

O Córtex Somatossensorial - ou Somestésico – Primário (S1) é o local onde ocorre o processamento das informações sensoriais captadas por receptores táteis distribuídos ao longo do corpo do indivíduo e está organizado de forma colunar e em camadas, em que cada camada difere anatômica e funcionalmente da outra, são elas: camada molecular (**I**) constituída por poucos neurônios não-piramidais, células gliais, fibras e terminações nervosas axonais e dendríticas; camadas supragranulares (**II/III**) que apresenta neurônios piramidais em abundância; camada granular (**IV**) composta por neurônios

estrelados; camadas infragranulares (**V/VI**) composta por neurônios piramidais (BROADMANN, 1909).

Em S1, estão presentes neurônios específicos que respondem a estímulos na superfície do corpo, formando mapas somatosensoriais em que há representações organizadas sequencialmente da superfície do corpo, indicando que quanto maior a importância sensorial da estrutura para o indivíduo, maior será a sua representação em S1 em termos de área cortical ocupada e isto está justamente relacionado à densidade de receptores distribuídos na superfície do corpo (CATANIA, 2002). Nos pequenos roedores, por exemplo, as vibrissas têm uma representação grande em área de S1 por serem responsáveis por uma grande parcela da informação sensorial conduzida à S1, formando o que se chama de córtex de barris.

O córtex de barris é formado ainda durante o desenvolvimento cortical cerebral pela atividade de receptores periféricos cutâneos e proprioceptivos, transmitida por vias ascendentes da periferia sensorial, passando pela medula espinhal até os aferentes talâmicos que os retransmitem até a área S1 (para a camada IV) mimetiza especificamente a disposição espacial de receptores (as vibrissas mistaciais) na superfície do corpo do animal (KILLACKEY, 1995). Devido à sua organização clara e de fácil definição histológica, é um modelo experimental largamente usado em estudos de circuitos neurais, desenvolvimento e plasticidade do SNC (FOX, 2002).

1.3 Período crítico de plasticidade

A circuitaria neural é moldada pela experiência sensorial durante janelas temporais específicas da vida pós-natal do indivíduo (HENSH, 2012). Estes são os ditos períodos críticos de plasticidade, essenciais para consolidação das vias neurais e formação sináptica relacionadas às habilidades sensoriais, motoras, cognitivas e sociais (HENSH, 2005; KNUDSEN, 2004). Quando o período crítico de plasticidade se encerra em uma determinada área, o SNC cessa as adaptações na circuitaria neural, interrompendo o ajuste do fluxo de informação sensorial, motora e cognitiva no córtex cerebral em resposta a

estímulos ambientais, diminuindo a capacidade plástica no SNC, no caso do S1 este processo ocorre em P30, aproximadamente (ver Bahia *et al.*, 2008).

Em geral, este mecanismo é benéfico para limitar alguns comportamentos que não precisam de renovação como, por exemplo, a eliminação sináptica quando sinapses não essenciais são podadas para refinamento do sistema nervoso central (CHANGEUX; DANCHIN, 1976; PETANJEK, 2011). Entretanto, quando indivíduos em estágios iniciais de desenvolvimento são expostos a estímulos ambientais inadequados, esse mesmo mecanismo pode gerar “alterações negativas” na organização morfofuncional do SNC, ocasionando em comportamentos disfuncionais mal adaptativos (NABEL, 2013).

Trabalhos voltados à essa área estão centrados em estudar os principais mecanismos moleculares que agem como limitantes ao potencial plástico do sistema nervoso adulto. Estudos usando o córtex visual (V1) identificaram fatores inibitórios à neuroplasticidade que incluem a maturação de interneurônios GABAérgicos de conexões intracorticais, proteínas *No-go* relacionadas à bainha de mielina, proteínas pertencentes à classe da família Lynx e, por último, o desenvolvimento de PGSCs envolvendo os corpos neuronais em Redes Perineuronais (BAVELIER *et al.*, 2010; NABEL E MORISHITA, 2013). O presente trabalho propões, descrever temporalmente a dinâmica de degradação e o ressurgimento das RPNs, usando uma biomembrana como veículo de entrega focal da enzima ChABC ao tecido nervoso.

2. JUSTIFICATIVA

Com o fechamento período crítico de plasticidade no início da fase adulta, a capacidade plástica dos circuitos neurais no córtex cerebral dos vários sistemas diminui drasticamente. Esse fato é decisivo para explicar a irreversibilidade às alterações do SNC, em casos como o acidente vascular encefálico (AVE) ou provocado por doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. A remoção de proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSC) das redes perineuronais (RPNs) que compões a matriz extracelular (MEC)

do tecido nervoso pode ser um facilitador à indução de plasticidade e regeneração dos circuitos neurais na fase adulta do SNC. Porém, a dinâmica de degradação e ressurgimento dos componentes moleculares das RPNs no tecido nervoso adulto ainda não foi descrita em sua dinâmica temporal. No presente trabalho, propomos avaliar a dinâmica temporal de ressurgimento das RPNs após sua degradação no córtex somestésico primário (S1) de ratos, usando um veículo para entrega focal sem lesionar o tecido nervoso e determinar a janela temporal mais eficiente para recuperação do SNC lesionado após à remoção das RPNs.

3. HIPÓTESE

O uso de biomembrana de polímero de etileno vinil acetato é eficiente para entrega focal da enzima ChABC e promover degradação das RPNs no tecido nervoso do córtex cerebral sem provocar lesão mecânica e nem provocar reatividade glial.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar a dinâmica temporal de degradação e restauração das redes perineuronais no córtex somestésico primário (S1) após a ação da enzima ChABC em modelo experimental *in vivo* usando um veículo para entrega focal e sem lesionar o tecido nervoso.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar a área de degradação em S1, promovida pela ação da enzima ChABC, via implante de biomembrana feita com *etileno-vinil-acetato*;

4.2.2 Contabilizar o número de células *Vicia villosa* positivas pelo sistema Stereologer2000® e mensurar o tamanho do halo de degradação após a ação

da enzima ChABC pelo software ImageJ;

4.2.3 Identificar a diferença no padrão de marcação das células *Vicia villosa* positivas no córtex somestésico primário (S1) em ambos os hemisférios;

4.2.4 Avaliar os efeitos da degradação dos PGSC sobre as células gliais (astrócitos e micróglia) no córtex somestésico primário (S1).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 O modelo experimental

Utilizamos ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, de ambos os sexos, com idade entre 2-3 meses de vida pós-natal e pesando entre 250 a 300 gramas, provenientes do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais tiveram acesso à água e à ração *ad libitum*. O uso e os cuidados na manipulação dos animais foram de acordo com as normas preconizadas pela *Society for Neuroscience* (Handbook for Use of Animals in Neuroscience Research, 1991) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais em Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA:141-13)

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais, 1 (n=3), 3 (n=3), 7 (n=3) dias, respectivamente, após o implante epidural da biomembrana feita com o polímero *etileno-vinil-acetato* (Elvax® - Brasil), saturado previamente com condroitinase ABC (ChABC – Sigma-Aldrich – Brasil), tendo o hemisfério cerebral esquerdo implantado (HE) e hemisfério cerebral direito não-implantado (HD), conforme observado na Figura 4.

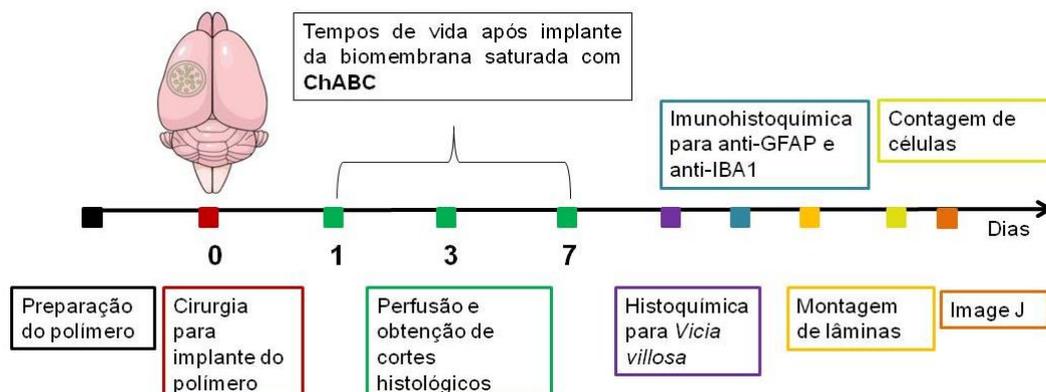


Figura 4. **Desenho experimental.** Linha do tempo do desenho experimental do projeto, dia 0 corresponde ao dia da cirurgia para o implante da biomembrana saturada com ChABC, com 1D, 3D, 7D tempos de vida pós implante, seguido pelos procedimentos de histoquímica para lectina *Vicia villosa*, imunohistoquímica para anti-GFAP e anti-IBA1, montagem de lâminas, contagem de células pelo sistema Stereologer2000® e mensuração do tamanho do halo de degradação pelo software ImageJ.

5.2 Preparação da membrana feita com o polímero etileno-vinil-acetato

Para preparação da biomembrana com o polímero, uma pequena quantidade de *etileno-vinil-acetato* (Elvax® - Dupont – Brasil) foi previamente lavada em álcool comercial (90-95%), sob agitação suave e constante, durante 24 horas. Em seguida, 200mg do polímero foram dissolvidos em 2mL de diclorometano (Vetec®), separados em tubos de vidro (70 X 9 mm), onde foram adicionados 30µL de ChABC (50U/ml, Sigma Aldrich®). O volume resultante foi homogeneizado durante 1 minuto e ultracongelado (-80°C).

As alíquotas foram transferidas para um tubo de liofilização e estocadas à vácuo durante 24 horas para a evaporação do diclorometano, posteriormente cortadas em microfatias de 150 µm com o auxílio de um criostato. Os cortes foram mantidos à -20°C até o momento do implante epidural (SÁ et al., 2014). A concentração de ChABC utilizada foi de 1,5 U/mL por fatia, baseada em uma estimativa de cálculos de farmacocinética de que 0,6 U/mL deve atingir o tecido nervoso após as primeiras 12 horas, uma concentração semelhante às

utilizadas em trabalhos que fazem uso de micro injeções (PIZZORUSSO et al., 2002; 2006), patente: Privilégio de Inovação. Número do Registro: BR1020150264879.

5.3 Procedimento cirúrgico para implante da membrana feita com o polímero *etileno-vinil-acetato*

No dia da cirurgia de implante da biomembrana saturada com ChABC, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg). Após a verificação dos reflexos corneanos e de retirada da pata, os animais foram colocados no aparelho estereotáxico (Insight®, EFF-336). Com assepsia local realizada, realizamos uma incisão longitudinal na superfície dorsal da cabeça do animal, de forma a expor o crânio.

Após a exposição do crânio, realizamos craniotomia com auxílio de uma broca cirúrgica, nas coordenadas estereotáxicas, relativas ao bregma: 5,0mm ML, -2,0mm AP definidas pelo atlas de Paxinos e Watson (1998), correspondentes ao córtex somestésico primário (S1) de ratos da linhagem *Wistar*. Uma fatia de 150 µm de polímero saturado com ChABC, foi posicionada no espaço epidural sobre o hemisfério cerebral esquerdo do animal, no local que corresponde à área S1. Em seguida, realizamos o procedimento de sutura e os animais foram colocados em suas gaiolas de origem e devolvidos ao biotério para que cumpram os tempos de vida segundo o item 4.2.

5.4 Perfusão e preparação histológica

Para perfusão e fixação do tecido nervoso, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg), administrado por via intraperitoneal. Depois de verificar a ausência de respostas à estimulação dolorosa, realizamos uma ampla abertura torácica, com obliteração da aorta descendente. As perfusões foram feitas com uma injeção intraventricular de 0,20ml de anticoagulante (Heparina Sódica, Ariston) seguida de perfusão

transcardíaca com 300ml de tampão fosfato (0,1M) e salina 0,9% (PBS) pH 7,2, e 300ml de paraformaldeído 4% (PFA, Sigma Aldrich).

Em seguida, os encéfalos (n= 3 por grupo) foram removidos das caixas cranianas, pós-fixados em solução de PFA a 2% por 24 horas e então foram microseccionados em cortes coronais a 50µm de espessura com o auxílio de um vibrátomo (Leica, modelo HM-505 – Alemanha). Todos os cortes foram mantidos em solução de tampão fosfato a 0,1M e pH 7,2 – 7,4.

5.5 Procedimentos histoquímicos

5.5.1 Histoquímica para a lecitina *Vicia Villosa*

Primeiramente, as microsecções foram lavadas por duas vezes em solução de tampão fosfato (PB) 0,1 com 6% de Triton X-100 (Sigma Aldrich) durante 20 minutos. Em seguida, as secções foram incubadas em solução contendo 0,5% de *Vicia villosa* biotinizada (Vector), 4% de Triton X-100 diluídos em PBS (*overnight*), sob agitação constante e a temperatura ambiente. Posteriormente, as secções foram lavadas duas vezes em solução de PBS, por 20 minutos cada. Em seguida, incubadas por 8 horas em solução contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (complexo ABC, Vector) e Triton X-100 (Sigma Aldrich) à 4% diluídos em tampão fosfato. Após nova lavagem em PBS, a peroxidase foi reagida utilizando-se o método da glicose oxidase-diaminobenzidina-níquel (GND) adaptado para a histoquímica da *Vicia villosa* (Shu et al., 1988).

5.5.2 Imunohistoquímica para anti-GFAP e anti-IBA-1

Realizamos imunohistoquímica anti-GFAP e anti-IBA-1 para marcação de astrócitos e células microgliais, respectivamente. As secções de 50µm foram lavadas duas vezes de 5 minutos em PBS, posteriormente imersas em solução de Peróxido de Hidrogênio (Merck) a 3% em tampão fosfato 0,1M, de forma a inibir a peroxidase endógena das células do tecido utilizado. A partir daí, as secções foram novamente lavadas em PB 0,1 M e incubadas em solução

diluyente (soro normal correspondente a cada anticorpo a 10%, BSA a 10% e Triton x-100 a 3%) para os anticorpos primários *overnight*, de acordo com a diluição mencionada (ver tabela 1). No dia seguinte, as secções foram lavadas novamente em PB 0,1M e incubadas em anticorpo secundário biotilado por 2 horas. Após nova lavagem foram incubadas em ABC (complexo avidina-biotina- Vector) por cerca de 1 hora, lavadas mais uma vez, para então reagir a peroxidase do complexo ABC, o cromógeno utilizado foi o DAB (diaminobenzidina-Sigma Aldrich), em seguida, lavadas em PB 0,1M.

Tabela 1. Lista dos anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica.

| Anticorpo | Marcação | Diluição |
|------------|--|----------|
| Anti-GFAP | Imunomarcação para astrócitos | 1: 1000 |
| Anti-Iba-1 | Imunomarcação para células microgliais | 1: 200 |

5.6 Lavagem, desidratação e montagem das lâminas

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

5.7 Procedimentos estereológicos

O número de células *Vicia villosa* positivas (VV+) totais, imaturas e maduras na área cortical correspondente a S1 foram contabilizadas no sistema Stereologer2000®, o qual consiste na determinação total de uma população de

células a partir de uma estimativa imparcial de uma dada população aleatória da população total de células de uma dada região do SNC. Para estimativa de células Vv+, foi realizado o contorno da área de interesse com lente objetiva de 2X e contagem de células com lente objetiva de 40X, foram usadas caixas de contagem de $2500 \mu\text{m}^2$, com $125 \mu\text{m}$ de espaçamento entre cada caixa para cada hemisfério cerebral (esquerdo: implantado; direito: não implantado). A espessura do tecido para análise estereológica foi de $50 \mu\text{m}$. O coeficiente de erro foi similar entre as contagens

5.8 Determinação da área de degradação no S1

Foram utilizadas 4 fotomicrografias (300 dpi) das microsecções, por grupo de animais, para determinação da área/halo de degradação após a ação da enzima ChABC, esta foi feita com auxílio do programa de computação ImageJ(NIH, USA). Primeiramente foi necessário definir a escala métrica, utilizamos uma figura de tamanho conhecido, para que o programa de computação gerasse as medidas diretamente em μm^2 em seguida, utilizou-se a ferramenta de seleção de área para, finalmente, análise e mensuração da área, então os valores de área correspondentes a cada secção foram gerados.

5.9 Análise estatística

Os resultados numéricos dos experimentos se apresentaram paramétricos, avaliados pela análise de médias e a análise estatística foi realizada com uso de Teste t , ANOVA de uma e duas vias com correção pós-teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$. A construção gráfica e análise estatística foram realizadas com auxílio do programa de computação GraphPad (Prism 8.0).

6.0 RESULTADOS

No presente trabalho, analisamos a dinâmica temporal de degradação e ressurgimento das RPNs no tecido nervoso adulto do córtex cerebral após degradação pela enzima ChABC em modelo experimental *in vivo* usando um veículo para entrega focal no SNC adulto após o fechamento do período crítico de plasticidade. Com isso, descrevemos os resultados obtidos de modo a estabelecer uma nova janela de plasticidade após remoção das RPNs. Os dados passaram por testes estatísticos de normalidade, o que permitiu a posterior análise utilizando testes paramétricos.

6.1 Área de degradação dos PGSC pela enzima aplicada através da membrana de etileno-vinil-acetato

Para análise da área de degradação gerada pela enzima ChABC entregue via biomembrana feita com o polímero de *etileno-vinil-acetato* (Elvax®, Dupont), realizamos histoquímica para a lectina *Vicia villosa*, uma proteína que se liga à carboidrato e que marca as RPNs. A *Vicia villosa* foi utilizada para avaliarmos a área (halo) de degradação da enzima ChABC em todas as sobrevidas (1,3 e 7 dias). O tamanho do halo de degradação das RPNs em S1 são 1D: $1,374,956 \pm 106,21$; 3D: $672,959 \pm 138,33$; 7D: $354,616 \pm 59,62$, respectivamente, e apresentaram diferença estatística significativa somente nos pós-teste de *Tukey*, $p = 0,0022$; $F_{(2,9)} = 13,09$), ver Figura 5.

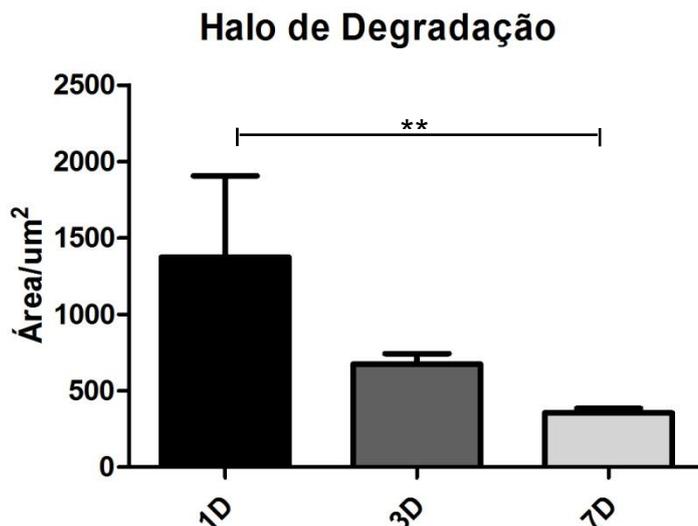


Figura 5. **Halo de degradação após a ação da enzima ChABC.** Os resultados demonstraram diferença significativa entre os tamanhos de halo de degradação entre os tempos de sobrevivência (1D: 1,374,95 ± 106,21; 3D: 672,95 ± 138,33; 7D: 354,61 ± 59,62; ANOVA $p = 0,1105$. Pós teste de *Tukey*; $p = 0,0022$; $F_{(2,9)} = 13,09$).

6.2 O total de células *Vicia villosa* positivas

A análise do curso temporal de degradação dos PGSC das RPNs foi realizada através da quantificação do número total de células com RPNs marcadas pela lectina *Vicia villosa*. Os resultados demonstraram que houve diferença estatística significativa entre o número total de células Vv+ marcadas entre o hemisfério cerebral implantado com membrana saturada com ChABC (HE) e o hemisfério cerebral que não recebeu implante (HD): em 1D; HE: 14,22 ± 1,92; HD: 18,44 ± 3,57; $p = 0,0035$ (Figura 6A). No entanto, nos demais tempos de sobrevivência não houve diferença estatística significativa (Figura 6B e 6C), indicando que houve degradação de células a partir do primeiro dia de implante da biomembrana.

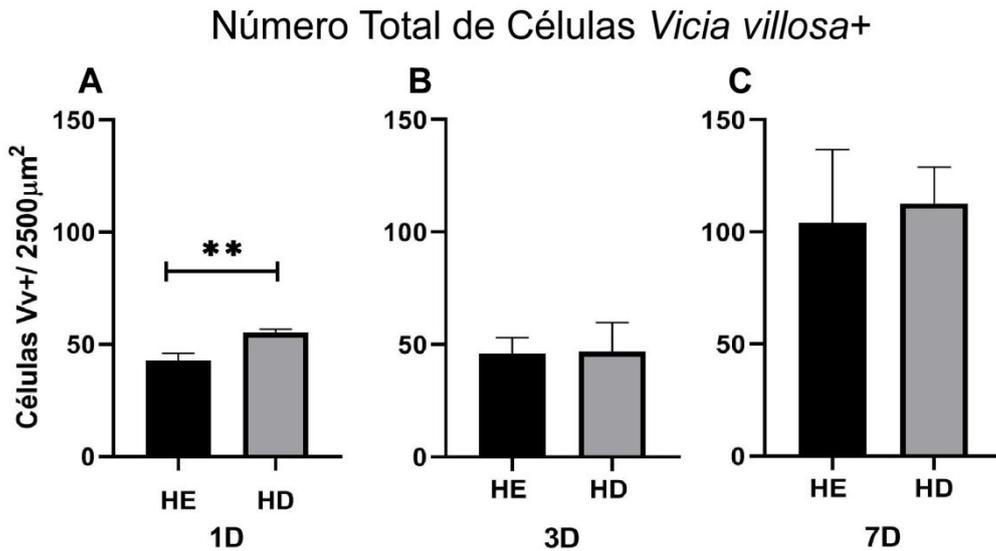


Figura 6. **Número Total de Células *Vicia villosa* positivas:** Análise estatística demonstrou que houve diminuição significativa no nº total de células Vv+ em HE, quando comparado à HD, 1 dia após o implante. O mesmo não foi encontrado nos demais tempos de sobrevivência. (1D HE: 14,22 ± 1,92; HD: 18,44 ± 3,57; p = 0,0035. 3D HE: 15,33 ± 3; HD: 16 ± 4,66; p = 0,9415. 7D HE: 34,66 ± 12,45; HD: 37,55 ± 8,60; p = 0,7022) Dados expressos em média e desvio padrão. Test t (** p ≤ 0,05). Em preto, hemisfério cerebral implantado com biomembrana saturada com ChABC, em cinza, hemisfério cerebral não implantado.

Na comparação do número de células Vv+ marcadas entre os tempos de sobrevivência, observamos diferença estatística significativa em HE entre os grupos de 3D: 15,33 ± 3; 7D: 34,66 ± 12,45; p = 0,0087 e 1D: 14,22 ± 1,92; 7D: 34,66 ± 12,45; p = 0,002. Em HD, encontramos diferença estatística significativa nos grupos de 3D: 16 ± 4,66; 7D: 37,55 ± 8,60; p = 0,0038 e 1D: 18,44 ± 3,57; 7D: 37,55 ± 8,60; p = 0,0095; $F_{(2,12)} = 27,88$ (Figura 7).

Quando comparamos o número de células Vv+ entre hemisférios cerebrais implantado com membrana saturada com ChABC (HE) e o hemisfério cerebral que não recebeu implante (HD) e entre os tempos de sobrevivência, encontramos diferença estatística significativa entre HE 7D: 34,66 ± 12,45; HD 1D: 18,44 ± 3,57; p = 0,0288, HE 7D: 34,66 ± 12,45; HD 3D: 16 ± 4,66; p = 0,0113, HE 3D: 15,33 ± 3; HD 7D: 37,55 ± 8,60; p = 0,003, HE 1D: 14,22 ± 1,92; HD 7D: 37,55 ± 8,60; p = 0,0058; $F_{(2,12)} = 27,88$ (Figura 7).

Portanto, sugerindo a eficiência da biomembrana no *delivery* da enzima ChABC, que por sua vez, causou diferença no número total de células Vv+ entre os hemisférios e entre os tempos de vida pós implante.

Número Total de Células *Vicia villosa* positivas entre hemisférios cerebrais

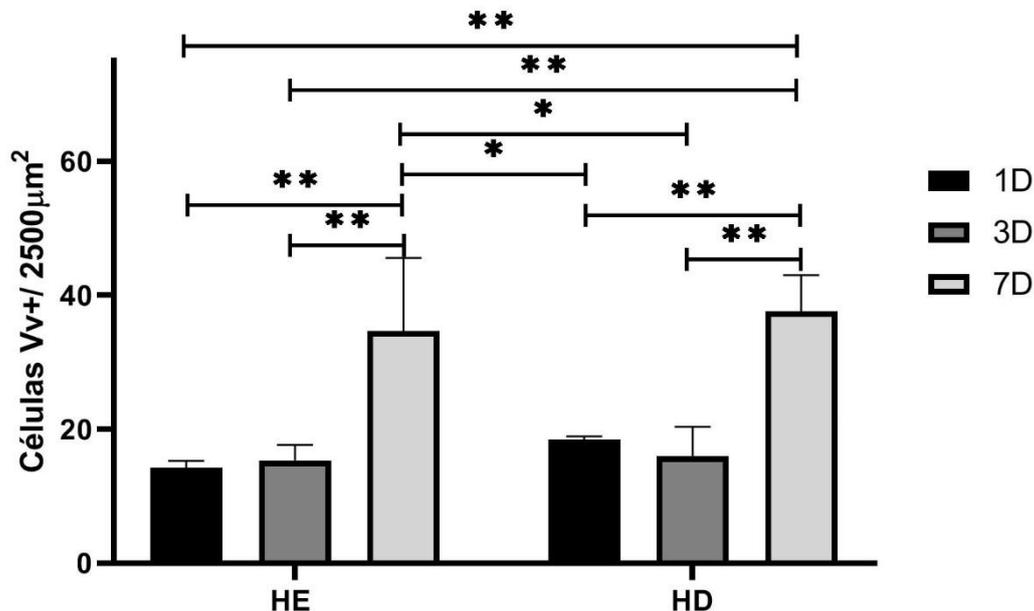


Figura 7. Número total de células *Vicia villosa* positivas entre hemisférios cerebrais e tempos de sobrevivência. Análise estatística demonstrou que houve diferença estatística significativa em HE 1D: $14,22 \pm 1,92$; 7D: $34,66 \pm 12,45$; $p = 0,002$; 3D: $15,33 \pm 3$; 7D: $34,66 \pm 12,45$; $p = 0,0087$, em HD 1D: $18,44 \pm 3,57$; 7D: $37,55 \pm 8,60$; $p = 0,0095$; 3D: $16 \pm 4,66$; 7D: $37,55 \pm 8,60$; $p = 0,0038$; $F_{(2,12)} = 27,88$. E entre HE 7D: $34,66 \pm 12,45$; HD 1D: $18,44 \pm 3,57$; $p = 0,0288$, HE 7D: $34,66 \pm 12,45$; HD 3D: $16 \pm 4,66$; $p = 0,0113$, HE 3D: $15,33 \pm 3$; HD 7D: $37,55 \pm 8,60$; $p = 0,003$, HE 1D: $14,22 \pm 1,92$; HD 7D: $37,55 \pm 8,60$; $p = 0,0058$; $F_{(2,12)} = 27,88$. ANOVA com dois fatores e pós teste de Tukey ($p \leq 0,01$).

6.3 Caracterização e quantificação das células *Vicia villosa* positivas: imaturas e maduras

Os resultados referentes à caracterização de RPNs imaturas (células com padrão de marcação Vv⁺ fraco) e maduras (células com padrão de marcação Vv⁺ forte) nos hemisférios cerebrais demonstraram aumento significativo no número de RPNs imaturas em HE 1D: $5,77 \pm 2,33$; 3D: $5,55 \pm$

1,87; 7D: $21,66 \pm 10,74$; $p = 0,0001$ (Figura 8D), em que 7D, aparece com número superior de células, indicando o possível fim da janela temporal de plasticidade aberta pela degradação das RPNs. No hemisfério cerebral não implantado (HD) houve aumento significativo no número de células Vv+ imaturas 1D: $5,33 \pm 2,23$; 3D: $5 \pm 2,39$; 7D: $21,11 \pm 8,92$; $p = 0,0001$ (Figura 8F), onde nos animais com 7 dias pós-implante (7D) há número superior de células imaturas, este é um resultado não esperado, mas que no entanto, dá indícios de transferência de plasticidade do hemisfério implantado para o hemisfério não implantado (ver Figura 8). Também houve diferença estatística significativa no número de células Vv+ maduras em HD 3D: $11 \pm 3,16$ e 7D: $16,44 \pm 5,59$; $p = 0,0283$ (Figura 8G).

Caracterização de *Vicia villosa* +

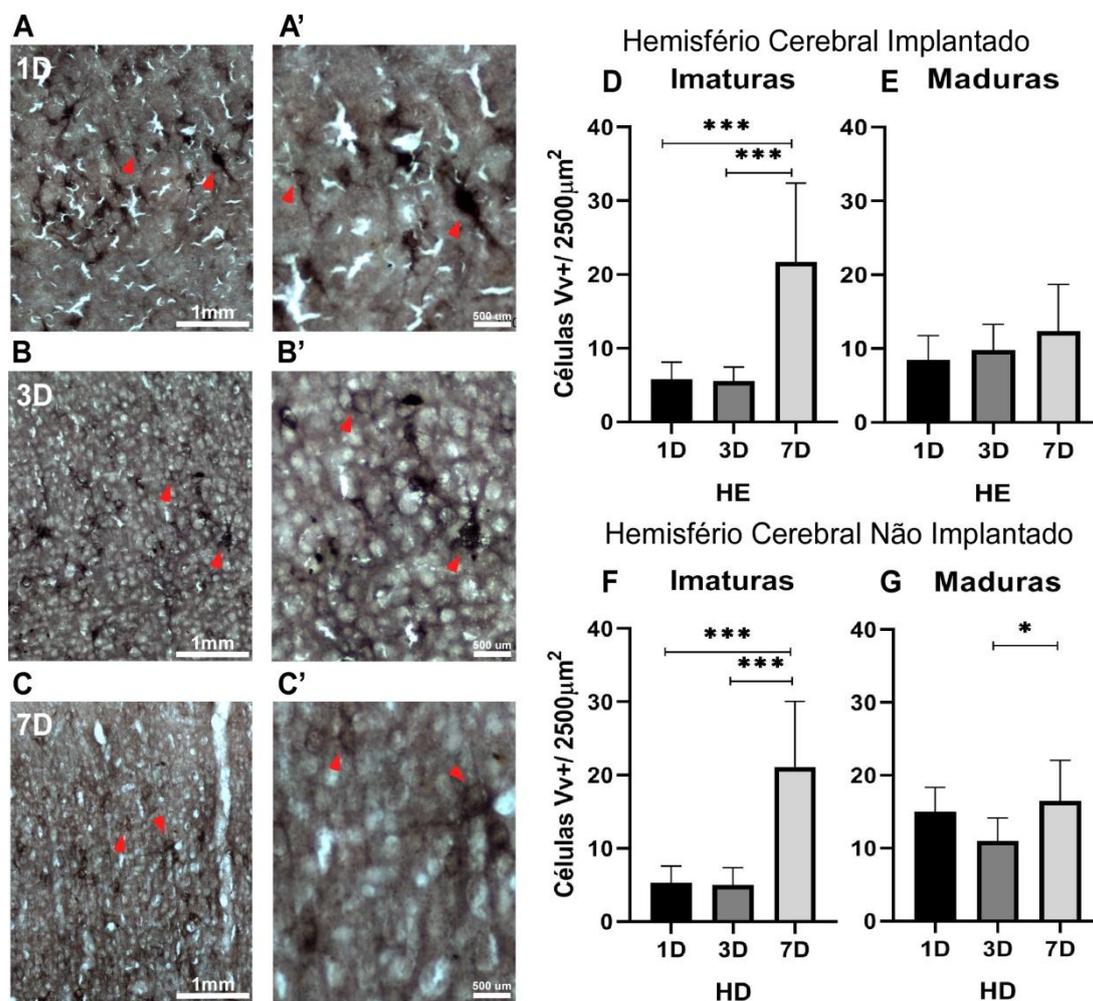


Figura 8. Caracterização de células *Vicia villosa* positivas (Vv⁺) nos hemisférios cerebrais: No hemisfério cerebral não implantado, os dados revelaram aumento significativo

no nº de RPNs imaturas no grupo de 7D ($F_{2,24} = 25,33$, $p \leq 0,0001$) em relação aos demais e diminuição significativa nas RPNs maduras, no grupo de 3D ($F_{2,24} = 4,089$, $p = 0,0296$), quando comparado ao de 7D. No hemisfério cerebral implantado, o grupo de 7D ($F_{2,24} = 18,51$, $p \leq 0,0001$) apresentou aumento significativo no nº de RPNs imaturas em relação aos tempos de sobrevivida restantes. (** $p \leq 0,05$). ANOVA com um fator e pós teste de Tukey ($p \leq 0,01$).

Posteriormente, analisamos o número de células Vv^+ imaturas e maduras em cada hemisfério e em cada tempo de vida pós implante. Neste caso, houve aumento significativo no número de células Vv^+ maduras em HD em 1D (imaturas: $5,33 \pm 2,23$; maduras: $15 \pm 3,35$; $p \leq 0,0001$. Figura 9 C).

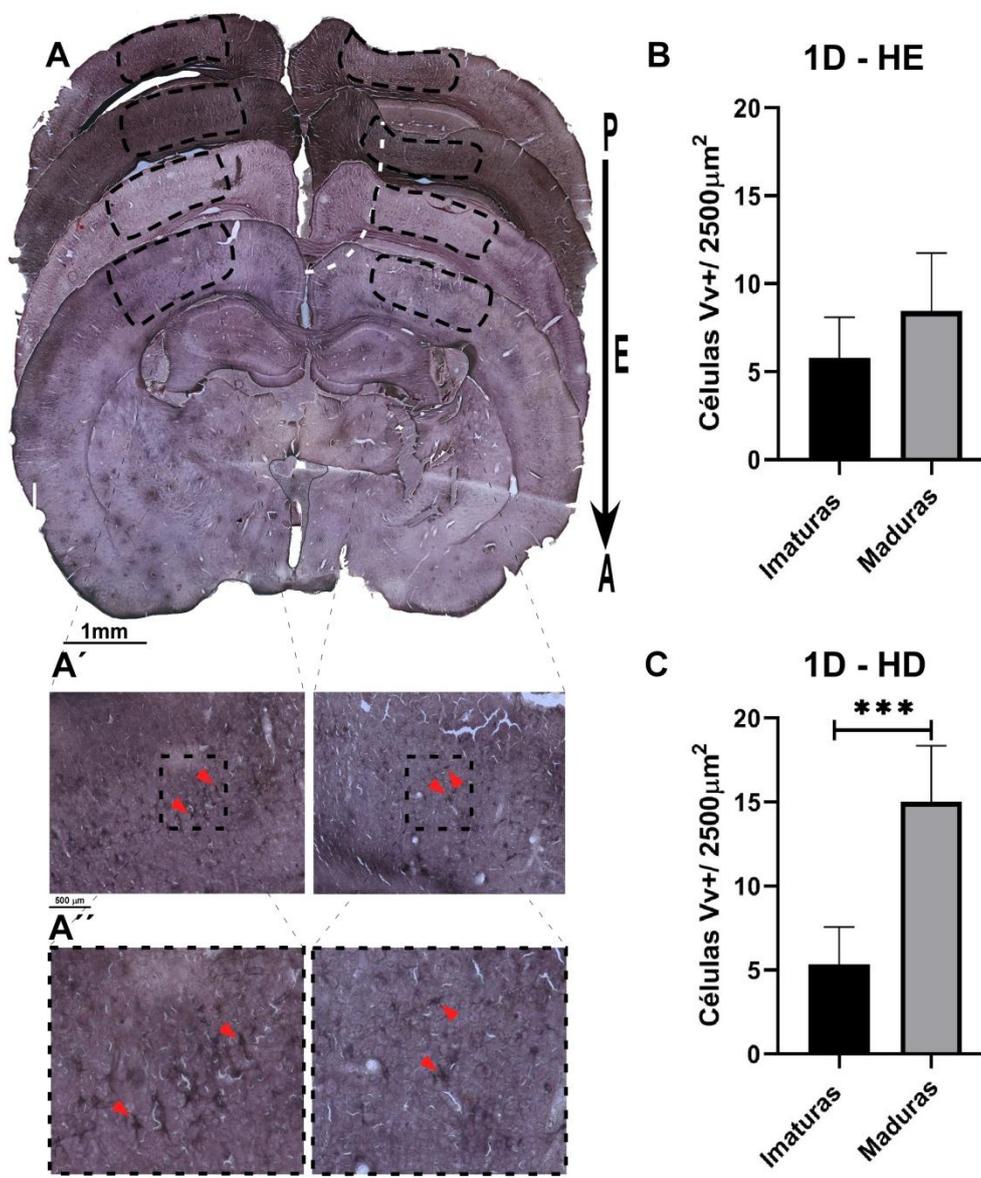


Figura 9. Caracterização do número total de RPNs imaturas e maduras intra-hemisférios cerebrais após 1 dia de degradação por ChABC. A. Fotomicrografias da reação de

histoquímica da lectina *Vicia villosa* em S1 após a degradação pela enzima ChABC, **A' e A''** Ampliação de 10x e 20x, respectivamente. Setas vermelhas indicando células Vv+ com diferença no padrão de marcação. **B.** Gráficos apresentando os números de células VV+ no hemisfério cerebra implantado com biomembrana saturada de I ChABC sem diferença significativa entre RPNS imaturas e maduras **C.** Diminuição significativa de RPNs imaturas no hemisfério que não recebeu implante. (** $p \leq 0,0001$), Teste t.

No grupo com 3 dias de vida pós-implante, houve diferença estatisticamente significativa na comparação no hemisfério cerebral esquerdo implantado (imaturas: $5,55 \pm 1,87$; maduras: $9,77 \pm 3,49$; $p = 0,0056$. Figura 10 B) e no hemisfério cerebral direito não implantado (imaturas: $5 \pm 2,39$; maduras: $11 \pm 3,16$; $p = 0,0003$. Figura 10 C).

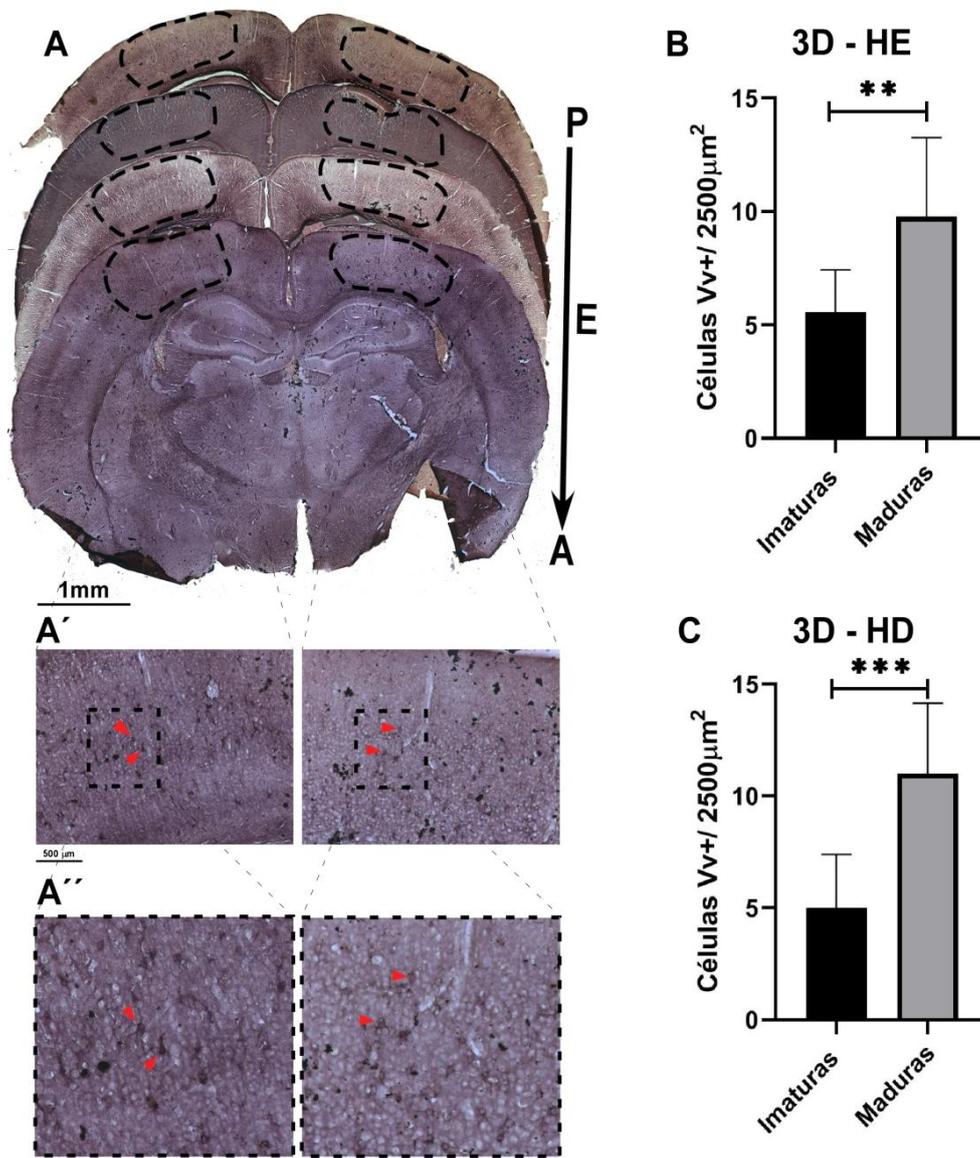


Figura 10. **Caracterização do número de RPNs imaturas e maduras intra-hemisférios cerebrais após 3 dias de degradação por ChABC.** **A)** Fotomicrografias da reação de histoquímica da lectina *Vicia villosa* em S1 após a degradação pela enzima ChABC, **A' e A''**) Ampliação de 10x e 20x, respectivamente. Setas vermelhas indicando células Vv+ com diferença no padrão de marcação.; **B)** Gráfico mostrando aumento significativo no nº de RPNs maduras em hemisfério cerebral implantado (HE); **C)** aumento significativo no nº de RPNs maduras em hemisfério cerebral não implantado (HD) . (** $p = 0,0003$), Teste t.

No grupo de 7 dias pós-implante da biomembrana, houve aumento estatisticamente significativo no número de células VV+ imaturas (imaturas: $21,66 \pm 10,74$; maduras: $12,33 \pm 6,34$; $p = 0,0394$. Figura 11 B) somente no hemisfério que recebeu implante do polímero (HE).

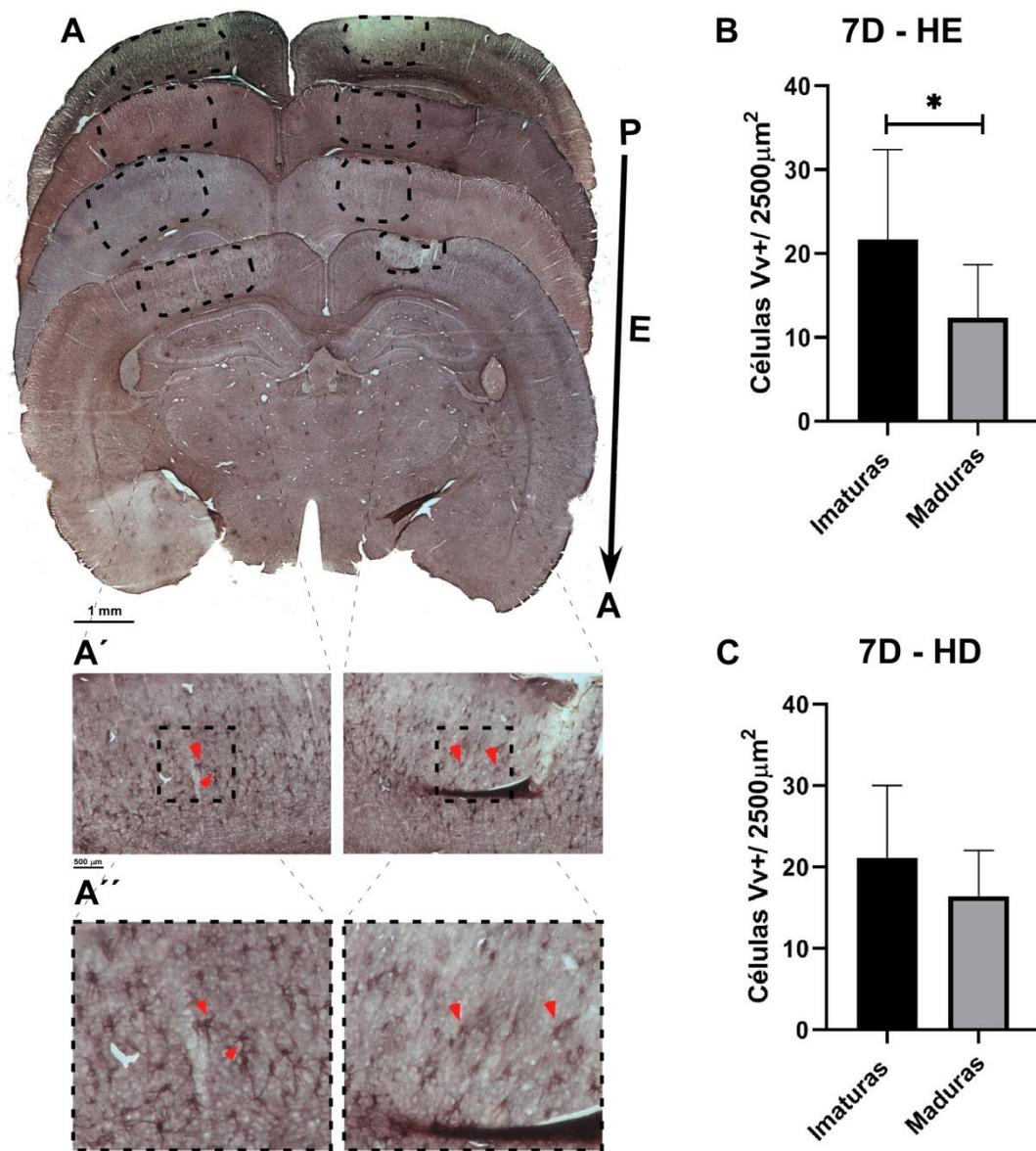


Figura 11. Número de células VV+ imaturas e maduras nos hemisférios cerebrais implantados com a biomembrana saturada com ChABC após 7 dias de degradação por ChABC. **A)** Fotomicrografias da reação de histoquímica da lectina *Vicia villosa* em S1 após a degradação pela enzima ChABC, **A' e A''**) Ampliação de 10x e 20x, respectivamente. Setas vermelhas indicando células Vv+ com diferença no padrão de marcação.; **B)** Aumento significativo no nº de RPNs imaturas no hemisfério cerebral implantado (HE); **C)** Não observamos diferença significativa entre o nº de RPNs imaturas e maduras no hemisfério cerebral não implantado (HD). (* $p = 0,0394$), Teste t.

6.4 Imunomarcção para astrócitos e micróglias após implante de biomembrana saturada com ChABC e degradação das RPNs

Com objetivo de avaliar se o implante da biomembrana de etileno-vinil-acetato saturada com a enzima ChABC e a consequente degradação das RPNs causava alguma resposta celular por astrocitário e/ou microglial, realizamos imunohistoquímica anti-GFAP e anti-IBA1 (ver Tabela 1), em todos os grupos experimentais. Na marcação para astrócitos, não houve presença de células atrocitárias dentro do alo de difusão da enzima ChABC a partir da biomembrana de etileno-vinil-acetato nos grupos de 1 e 3 dias pós-implante no hemisfério cerebral implantado – HE (ver Figura 12 e 13).

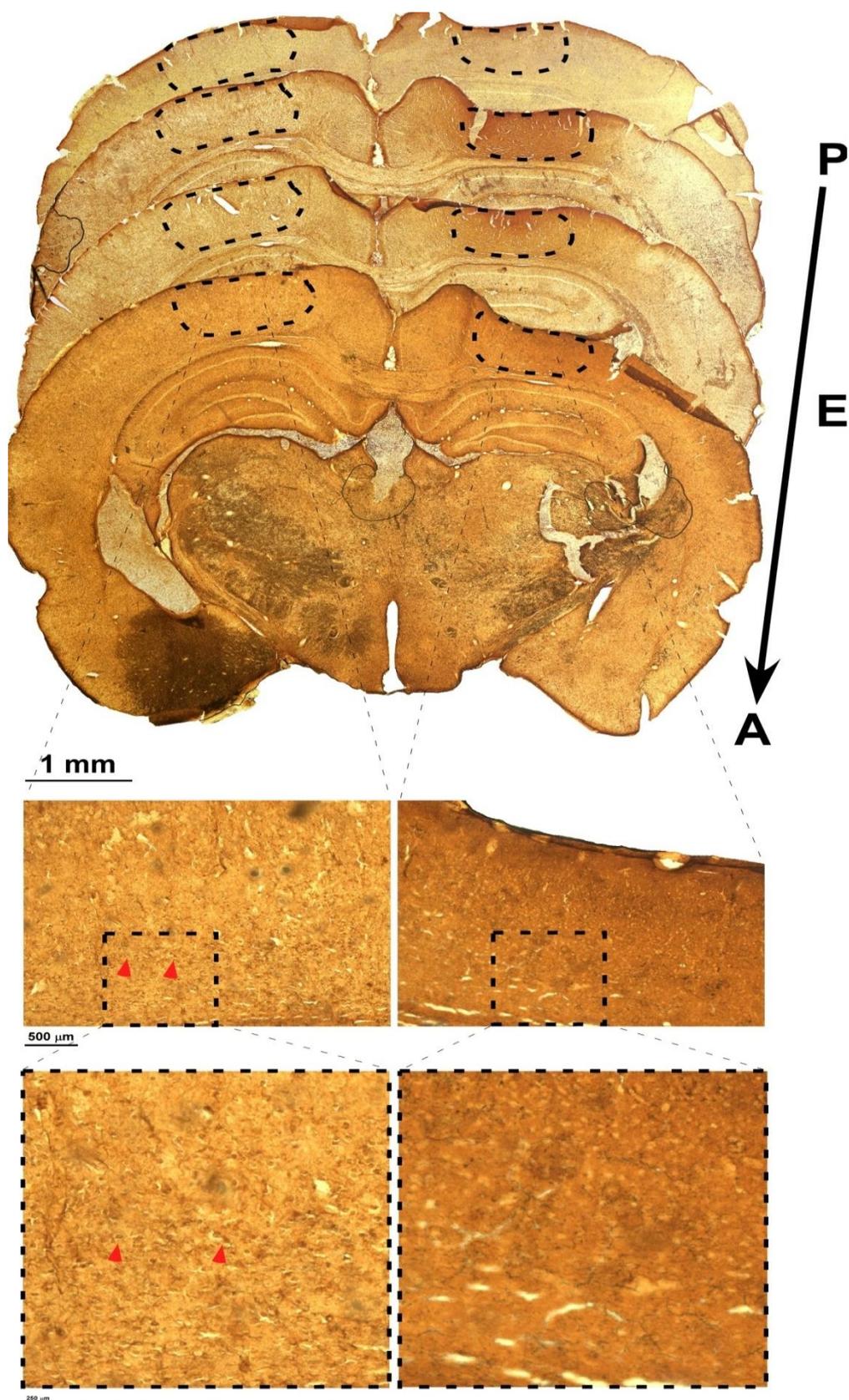


Figura 12. Efeito da degradação das RPNs sobre células astrocíticas em 1 dia de degradação por ChABC. Fotomicrografias da imunomarcagem anti- GFAP após a degradação em S1, com ampliações em 10x e 20x, setas vermelhas indicando astrócitos imunomarcados.

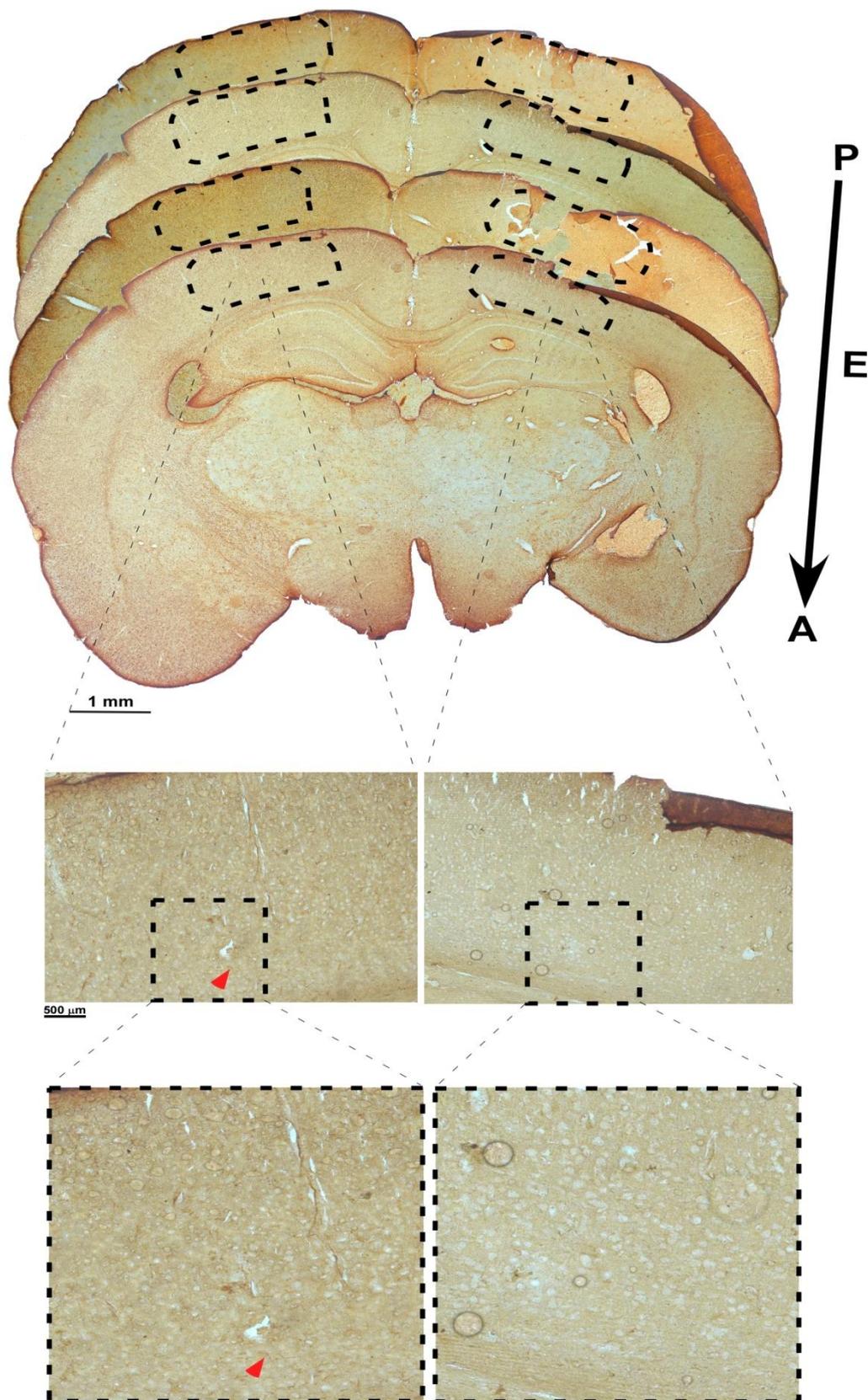


Figura 13. Efeito da degradação das RPNs sobre células astrocíticas após 3 dias de degradação por ChABC. Fotomicrografias da imunomarcção anti- GFAP após a degradação em S1. Com ampliações em 10x e 20x, setas vermelhas indicando astrócitos imunomarcados.

Já no grupo de 7 dias pós-implante da biomembrana de *etileno-vinil-acetato* e degradação das RPNs pela enzima ChABC, há presença de um pequeno número de células astrocitárias imunomarcadas dentro do alo de degradação no hemisfério cerebral implantado - HE (ver Figura 14). Contudo, encontramos a presença de uma estrutura com morfologia semelhante à de neurônios imunomarcados com o anticorpo anti-GFAP no hemisfério cerebral não implantado – HD (ver Figura 14).

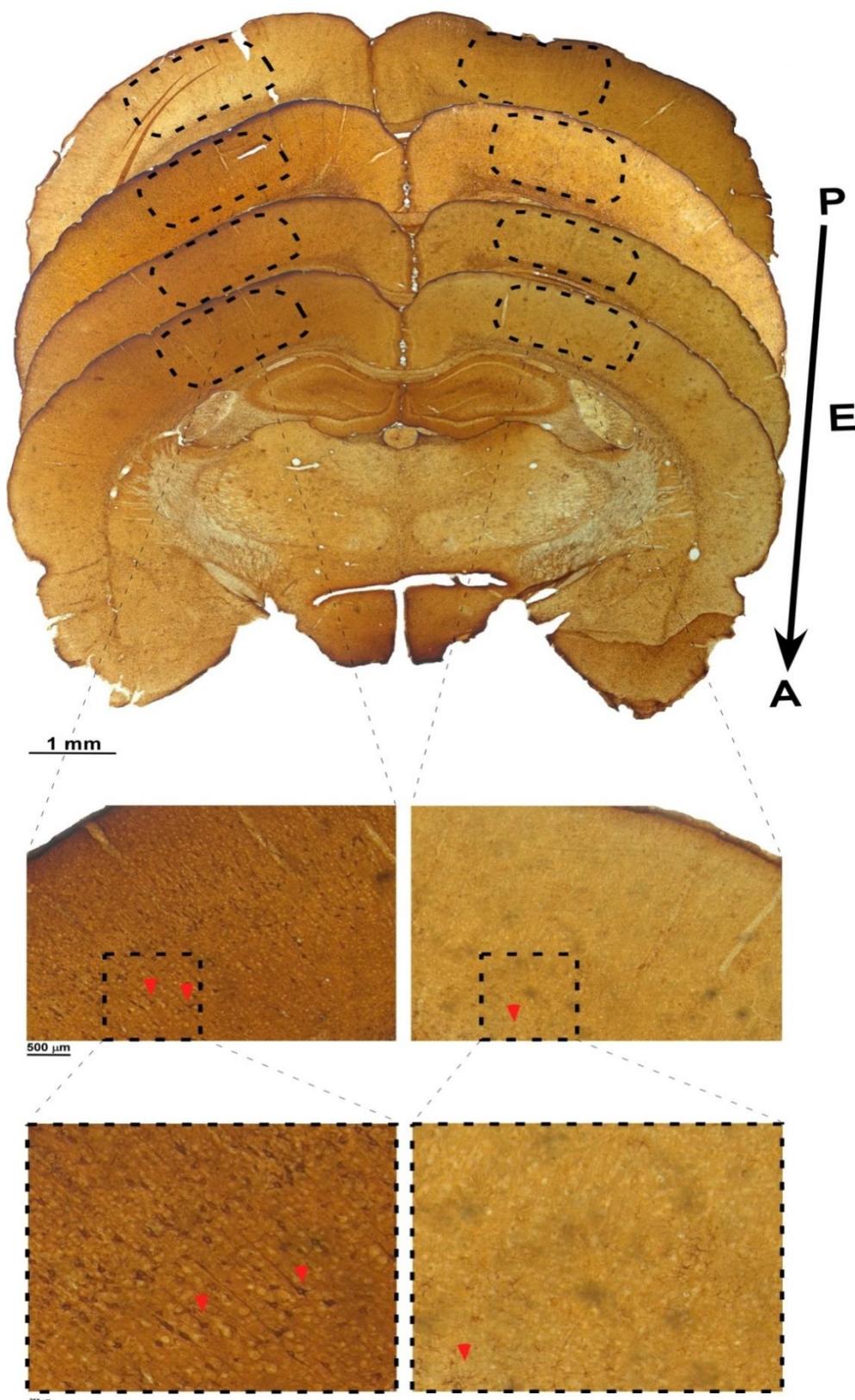


Figura 14. Efeito da degradação de RPNs sobre células astrocitárias após 3 dias de degradação por ChABC . Fotomicrografias da imunomarcção anti- GFAP após a degradação em S1, com ampliações em 10x e 20x, setas vermelhas indicando células imunomarcadas com a morfologia semelhante a neurônios piramidais no hemisfério cerebral não implantado (HD) e no hemisfério cerebral implantado (HE).

Para imunohistoquímica com o anticorpo anti-IBA1, não observamos presença de células imunomarcadas nos tempos de sobrevivência 1 e 3 dias pós-implante (ver Figuras 15 e 16). Contudo em 7 dias há células com morfologia parecida a neurônios piramidais encontradas também na imunomarcção anti-GFAP (Figura 17).

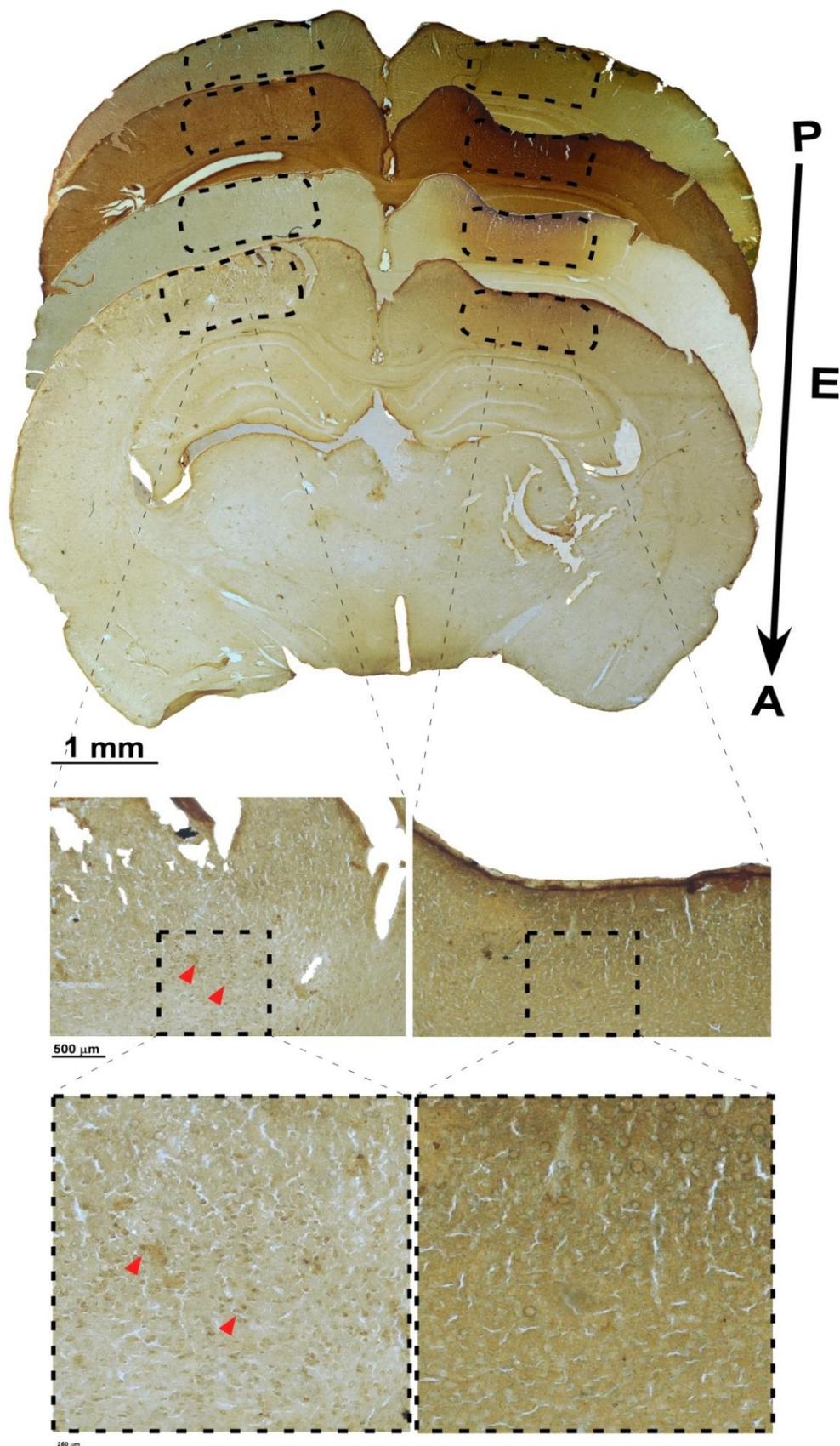


Figura 15. Avaliação dos efeitos da degradação das RPNs nas células microgliais após 1^o dia de degradação por ChABC. Fotomicrografias da imunomarcagem anti- IBA1 após a degradação em S1, com ampliações em 10x e 20x, setas vermelhas indicando células

microgliais imunomarcadas.

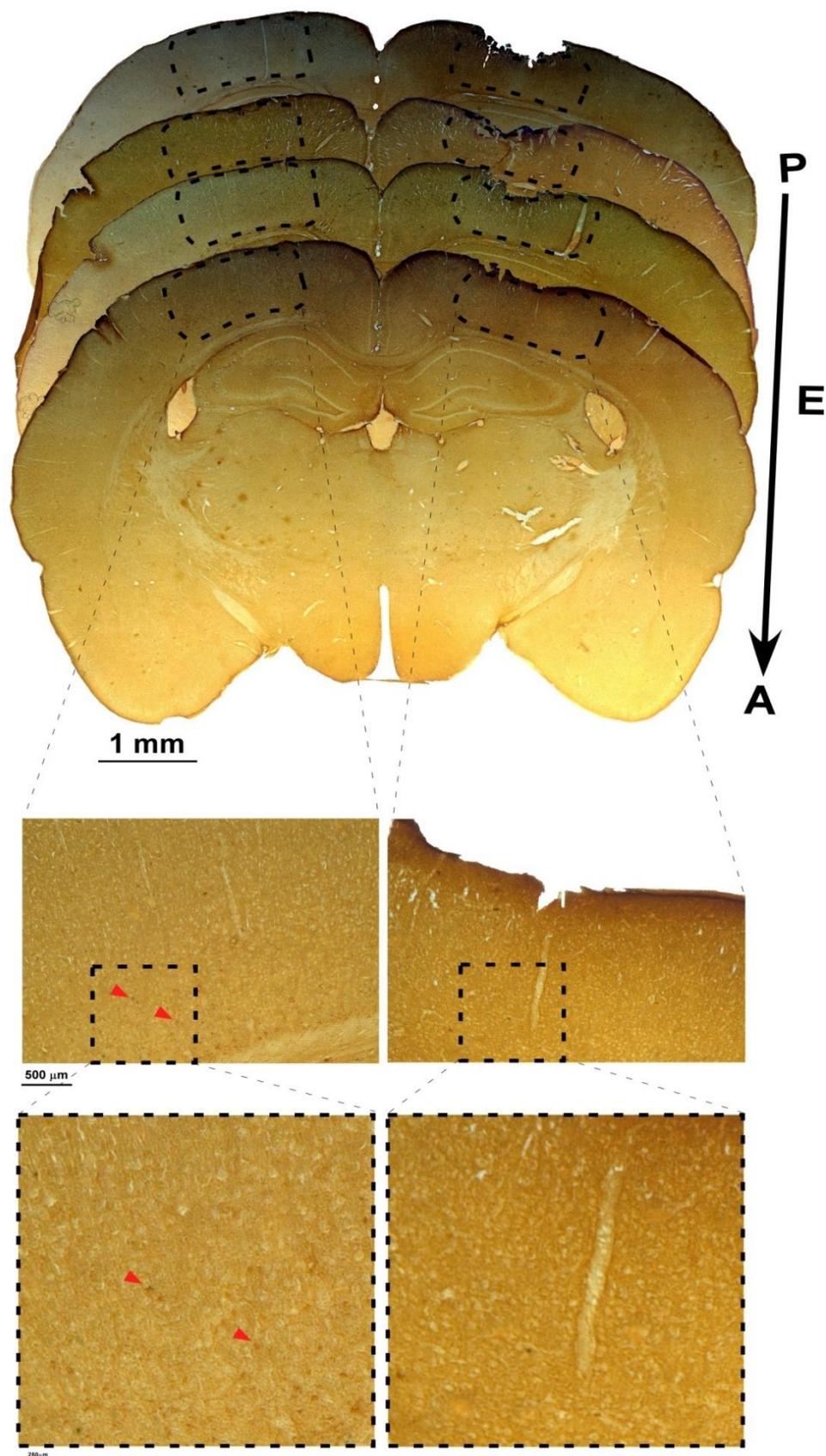


Figura 16. Avaliação dos efeitos da degradação das RPNs nas células microgliais após 3 dias de degradação por ChABC. Fotomicrografias da imunomarcagem anti- IBA1 após a

degradação em S1, com ampliações em 10x e 20x, setas vermelhas indicando células microgliais imunomarcadas.

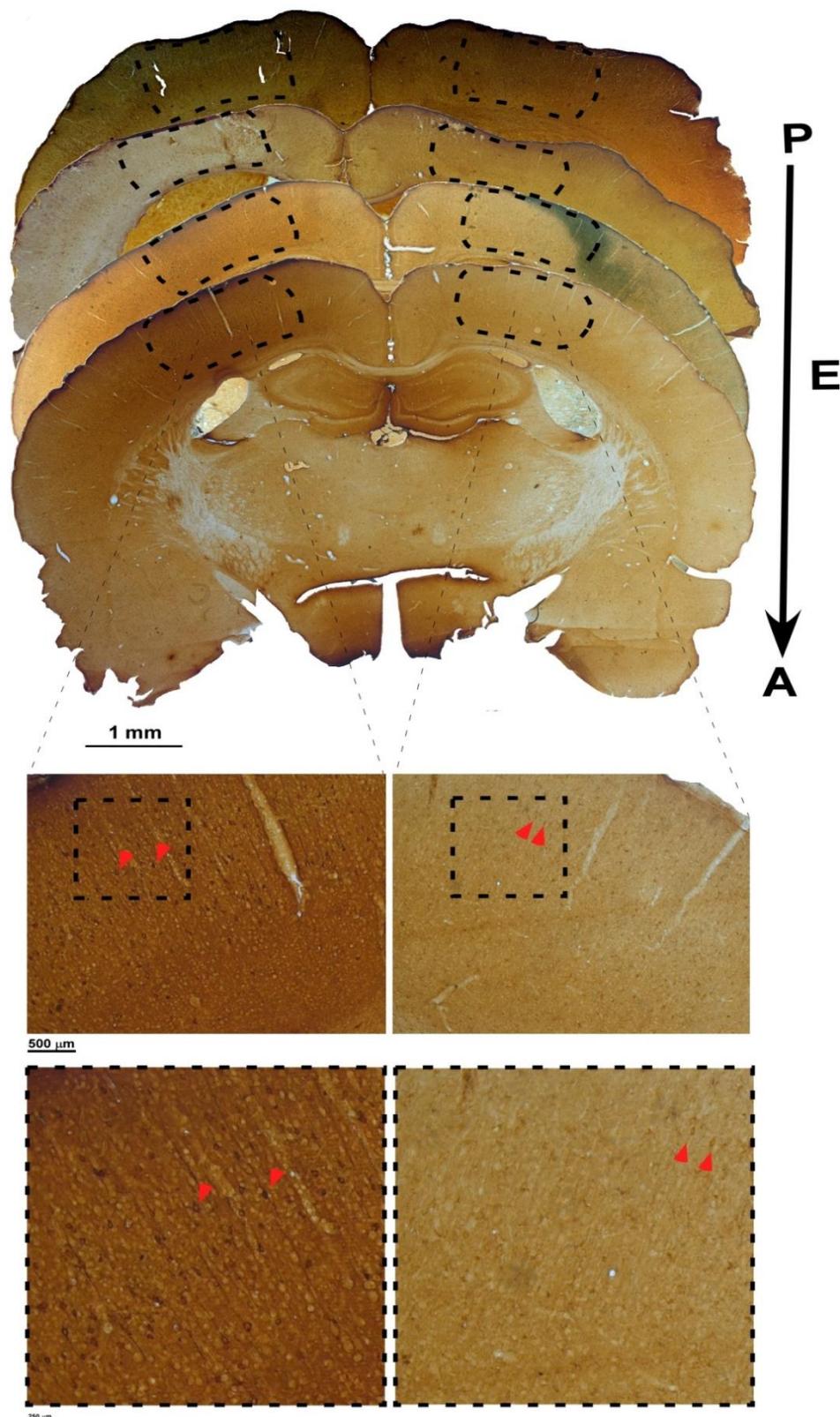


Figura 17. Avaliação dos efeitos da degradação das RPNs nas células microgliais após 7 dias de degradação por ChABC. Fotomicrografias da imunomarcagem anti- IBA1 após a degradação em S1, com ampliações em 10x e 20x, setas vermelhas indicando células

imunomarcadas com morfologia semelhante à neurônios piramidais no hemisfério cerebral não implantado (HD) e células microgliais imunomarcadas no hemisfério cerebral implantado (HE).

7.0 DISCUSSÃO

Inúmeros trabalhos usam a estratégia de degradação de elementos da matriz extracelular como modelo experimental de indução de plasticidade neural, com intuito de testar algum tipo de tratamento ou mesmo a possibilidade de que a degradação seja um tratamento (FAWCETT et al., 2012; CREGG et al., 2014; KWOK et al., 2014). Por exemplo, em ratos com vícios de adição, a degradação das RPNs melhora o comportamento de recaída ao uso de cocaína (SLAKER et al., 2015). No entanto, os estudos raramente apresentam a investigação da dinâmica da janela temporal de degradação/ressurgimento das RPNs para que se possa determinar a janela de oportunidade plástica enquanto está “re-aberta”.

Neste trabalho, investigamos o curso temporal da degradação e ressurgimento das Redes Perineuronais (RPNs), no córtex somatosensorial de ratos adultos, após a ação da enzima ChABC entregue via biomembrana que possui mecanismo de *drug delivery*. Desse modo, dividimos os animais em três tempos de vida pós-implante (1,3 e 7 dias) e implantamos a biomembrana na área correspondente ao córtex somestésico primário (S1) para avaliar a eficiência da entrega da enzima liberada a partir da biomembrana utilizando a técnica de histoquímica para a lectina *Vicia villosa*.

Analisamos também se o implante da biomembrana feita com o polímero *etileno-vinil-acetato* desencadearia resposta celular inflamatória de células gliais utilizando a técnica de imunohistoquímica para anti-GFAP e anti-IBA1, respectivamente.

7.1 Degradação das redes perineuronais no S1 via implante da biomembrana saturada com ChABC

Diversos trabalhos demonstraram que a microinjeção de ChABC é um método eficiente para induzir a degradação das RPNs (BRUCKNER, 1998;

BERARDI et al., 2004) com alterações neuronais dentro do halo de degradação resultante da ação da ChABC (LIN et al., 2008; ROMBERG et al., 2013), de modo que quando comparamos com os nossos resultados, demonstramos que há degradação pela enzima a partir do primeiro dia pós-implante da biomembrana saturada com ChABC (figura 6A), em que demonstramos que há queda significativa no número de RPNs totais, portanto, propomos que o mecanismo de entrega feito via biomembrana foi eficiente. Resultados parecidos foram demonstrados em trabalhos em que ChABC foi administrada, via injeção intraparenquimatosa do tecido nervoso, 24hr antes de realização de testes de memória (O'NEILL, 2015).

Os halos de degradação formados pela ação da ChABC nos indivíduos do grupo de 1D, após o implante da biomembrana saturada com a enzima, são notadamente maiores e vão diminuindo com o passar do tempo (figura 5 e 9,10 e 11A), demonstrando o bom desempenho da biomembrana como uma *drug delivery* como demonstrado na Figura 6.

7.2 Padrão de marcação de RPNs após ação da ChABC entregue à área S1 por biomembrana

A diferença no padrão de marcação das redes perineuronais (RPNs) é utilizada como uma medida indireta para indicar o estágio de maturação do SNC após a degradação dos PGSC. Portanto, podendo-se inferir a dinâmica de ressurgimento das RPNs no tecido nervoso assumindo que o padrão de marcação fraco corresponde à RPNs estão **imaturas**, devido às alterações causadas em sua composição após digestão realizada pela enzima ChABC. Com o passar do tempo, mais PGSC, HA e CAGs são produzidos e expressados, ligando-se entre si, formando novas RPNs com padrão de marcação mais intenso, sugerindo que as mesmas estão **maduras**. Bahia *et al* (2008) demonstraram que a redução da densidade das RPNs pode prolongar o período crítico de plasticidade em animais sob condição de privação sensorial.

A relação entre o número de RPNs imaturas e maduras, após a degradação indicaria o processo de restauração delas no SNC, significa que número maior de células imaturas indica o começo do

ressurgimento/amadurecimento das RPNs e número maior de RPNs maduras indica o amadurecimento fisiológico do SNC e o fechamento do período crítico de plasticidade. Neste trabalho, comparamos o número de RPNs imaturas e maduras entre todos os tempos de sobrevivida propostos no presente trabalho, avaliando o hemisfério cerebral não implantado (HD) e no hemisfério cerebral implantado com a biomembrana saturada com ChABC (HE), ambas as condições ocorrem em animais adultos cujo período crítico de plasticidade já havia fechado. No hemisfério cerebral implantado (HE), no grupo de 7 dias pós-implante, houve aumento significativo no número de RPNs imaturas (ver Figura 11B). Em HD, o número de RPNs imaturas é maior no grupo de 7D, quando comparado aos outros tempos de sobrevividas, sugerindo assim que o ressurgimento das RPNs após o início da ação da enzima ChABC liberada a partir da biomembrana ocorre em 7D e, portanto, começa o início do fechamento do “novo” período crítico de plasticidade induzido pela degradação das RPNs no tecido nervoso adulto. Este fenômeno biológico é transferido para o hemisfério cerebral oposto (que não recebeu implante da biomembrana saturada com ChABC).

Desta forma, propomos que o amadurecimento/ressurgimento das RPNs ocorre de forma gradual e iniciaria a partir de 7 dias pós-implante e a neuroplasticidade promovida pela degradação das RPNs pode ser transferida de um hemisfério cerebral para o outro, sugerindo uma nova janela de oportunidade de reorganização do SNC. Em trabalhos que envolveram privação sensorial durante o período crítico de plasticidade, ocorreram não só mudanças focais, como também alterações envolvendo circuitos de longo alcance, como é o caso da via tálamo-cortical (FOX, 2002; BOWLUS et al., 2003; STAUDT et al., 2004). No presente trabalho, as mudanças de longo alcance podem ter ocorrido através das conexões via corpo caloso, existentes entre os hemisférios cerebrais.

A neuroplasticidade de longa distância após a privação sensorial pode envolver a reorganização de áreas homólogas no hemisfério não privado quando a privação da periferia sensorial é unilateral (FOELLER; FELDMAN, 2004; PERTESSEN, 2007). Neste trabalho, apesar de não ter havido privação sensorial, propomos que há plasticidade inter-hemisférica, não pela ação da enzima em si, mas pela geração de microatividade elétrica (BRAUN et al, 2001;

FELDMAN, 2005), gerada no HE (hemisfério cerebral implantado) promovida pela remoção das RPNs e que seriam capazes de produzir alteração no número de RPNs imaturas no HD (hemisfério cerebral que não recebeu o implante a biomembrana saturada com a ChABC) provocando alteração no padrão de RPNs restrita à área sensorial (S1) homóloga à do implante no HE.

Quando realizamos a comparação entre o número total de células com RPNs imaturas e o número total de células com maduras no mesmo hemisfério cerebral (hemisfério cerebral implantado – HE), nos grupos de 1 e 3 dias pós-implante da biomembrana com ChABC, observamos maior número de redes perineuronais maduras (Ver figuras 9 e 10B) que, no entanto, no grupo de 7 dias pós-implante, ocorre a inversão nos perfis de RPN nas células marcadas, havendo portanto aumento no número total de células com RPNs imaturas em HE (ver Figura 11B) e em HD (hemisfério cerebral não implantado) há um fenômeno semelhante entre o número total de RPNs imaturas e maduras. Trabalhos em que a degradação da MEC pela ChABC promoveu recuperação morfofuncional da área cerebral privada da periferia sensorial demonstram que a degradação ou redução da densidade das RPNs promove um ambiente permissivo à plasticidade e também aumentam a atividade elétrica das células nervosas (BRADBURY et al., 2002; BUKHARI, 2011; SOLEMAN, 2012)

7.3 Efeito da degradação das RPNs nas as células gliais

As células da glia são componentes essenciais para manutenção da homeostase do SNC, envolvidas com processos como regulação do fluxo sanguíneo, fornecimento de metabólitos energéticos aos neurônios e regulação sináptica (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Os astrócitos, por exemplo, não atuam somente como suporte metabólico, mas também são capazes de modular a atividade neuronal e neuroplasticidade (VOLTERRA, 2005; FAISSNER et al., 2010). Ademais, a díade formada por astrócitos-neurônios está relacionada à atividade elétrica e tamponamento sináptico e também com a neuroproteção na progressão de doenças neurológicas (BARRETO et al., 2011; GOURINE, 2011).

Estudos recentes descrevem que componentes que formam as RPNs, como algumas lecticanas, são provavelmente produzidos por astrócitos

(SMITH; STRUNZ, 2005; GIAMANCO; MATTHEWS, 2012). Desta maneira, avaliamos se a degradação das RPNs seria capaz de causar algum efeito sobre a imunomarcação de células da glia. Nos grupos de 1 e 3 dias pós-implante, observamos que não há marcação de células tanto astrocíticas quanto microgliais (ver Figuras 15 e 16). No entanto, há marcação no grupo de 7 dias pós-implante para os dois tipos celulares (ver Figura 17).

Neste caso, é razoável assumirmos que a degradação das RPNs não desencadeou sinais de processo neuroinflamatório ou ativação glial, mas que a retirada de componentes da MEC interferiu na imunomarcação das células nervosas 7 dias pós-implante da biomembrana saturada com a ChABC, onde encontramos células com perfil morfológico de neurônios piramidais do córtex cerebral marcadas tanto pelo anticorpo GFAP quanto pelo anticorpo IBA-1 que são marcadores específicos para astrócitos e células microgliais, respectivamente (Ver Figuras 14 e 17). Esta marcação “inusitada” coincide com o período de restauração/ressurgimento das RPNs 7 dias pós-implante da biomembrana saturada com ChABC.

Esta mesma marcação “inusitada” após 7 dias pós-implante com a biomembrana saturada com ChABC está presente no hemisfério cerebral que não recebeu o implante (HD). Células com perfil morfológico parecido com o de neurônios piramidais foram imunomarcadas por GFAP e IBA-1 no grupo de 7 dias, coincidindo com o provável início do período de restauração das RPNs. O porquê dessa imunomarcação ainda é incerto e necessitará de investigações posteriores como o uso de dupla marcação para anticorpos GFAP/ Neu-N e IBA-1/ Neu-N para se determinar se essas células com morfotipo de células piramidais no córtex cerebral são realmente neurônios ou células gliais ou mesmo se a degradação da RPNs pela ChABC expõe epítomos antes silentes em neurônios e ativos em células gliais.

8. CONCLUSÃO

1. O uso da biomembrana feita com polímero de *etileno-vinil-acetato* foi eficiente para entrega focal da enzima ChABC que promoveu degradação das RPNs na área S1 de ratos adultos, não provocou lesão mecânica no tecido nervoso nem provocou reatividade glial e a área de degradação enzimática diminuiu com o passar do tempo (de 1 para 7 dias pós-implante);
2. Degradação das RPNs causa alteração no perfil de marcação de IBA-1 e GFAP no hemisfério não implantado, sugerindo que a perda da MEC desencadeia atividade elétrica inter-hemisférica.
3. O início de restauração das RPNs ocorre 7 dias após o implante da biomembrana saturada com ChABC, apresentando número maior de células Vv⁺ imaturas marcadas, portanto, mostrando o fim de uma janela temporal permissiva a plasticidade no S1;
4. A degradação das RPNs no hemisfério cerebral implantado com a biomembrana saturada com ChABC sugere transferência inter hemisférica no hemisfério não implantado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAHIA, C.P. et al. Spatiotemporal Distribution of proteoglycans in the developing Rat's Barrel Field and the effects of early deafferentation. **The Journal of Comparative Neurology**. V. 510; p.145-147; 2008.

BAVELIER, D.; LEVI, D.; LI, RW.; HENSCH, T. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. **J Neurosci**. V.30; p.14964– 14971; 2010.

BEAR, M. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3ªed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

BERTOLOTTO, A.; MANZARDO, E.; GUGLIELMONE, R. Immunohistochemical mapping of perineuronal nets containing chondroitin unsulfated proteoglycan in the rat central nervous system. **Cell Tissue Res**. v.283; p. 283-295; 1996.

BIGNAMI, A.; ASHER, R.; PERIDES, G. Co-localization of hyaluronic acid and chondroitin sulfate proteoglycan in rat cerebral cortex. **Brain Res**. v. 579; p.173–177; 1992.

BLACKTOP, J.M; TODD, R.P; SORG, B.A. Role of perineuronal nets in the anterior dorsal lateral hypothalamic area in the acquisition of cocaine-induced conditioned place preference and self-administration. **Neuropharmacology**. v. 36, p.118-124; 2017.

BRAUN, C.; HEINZ, U.; SCHWEIZER, R.; WIECH, K., BIRBAUMER, N.; TOPKA, H. Dynamic organization of the somatosensory cortex induced by motor activity. **Brain**, v. 124, n. 11, p. 2259-2267, 2001.

BRÜCKNER, G. et al. Acute and long-lasting changes in extracellular-matrix chondroitin-sulphate proteoglycans induced by injection of chondroitinase ABC in the adult rat brain. **Exp Brain Res**. v.121; p.300–310; 1998.

BRÜCKNER, G. et al. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. **J Comp Neurol**. v.428; p.616–

629; 2000.

BRUCKNER, G.; MORAWSKI, M.; ARENDT, T. Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. **Neuroscience**. v. 151; p.489– 504; 2008.

CANTY, A.; MURPHY, M. Molecular mechanisms of axon guidance in the developing corticospinal tract. **Prog. Neurobiol.** V.85; p.214–235; 2008.

CATANIA, K, C. Barrels, stripes, and fingerprints in the brain—implications for theories of cortical organization. **Journal of neurocytology**, v. 31, n. 3-5, p. 347-358; 2002.

CARULLI, D.; RHODES, K.; BROWN, D.; BONNERT, T. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. **J Comp Neurol**. v. 494; p.559–577; 2006.

CARULLI, D.; RHODES, K.; FAWCETT, J. Upregulation of aggrecan, link protein 1 and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. **Journal Comp Neurol**. v. 501; p. 83–94; 2007.

CARULLI, D.; FARALLI, A; PAJAJ, E.; ROSSI,F. Modulation of semaphorin3A in perineuronal nets during structural plasticity in the adult cerebellum. **Mol Cell Neurosci**. v. 57; p. 10-22; 2013.

CELIO, M.R. Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containing neurons of the hippocampus. **Hippocampus**. V. 3; p. 55–60; 1993.

CELIO, M. R; SPREAFICO, R; DE BIASI, S; VITELLARO-ZUCCARELLO, L. Perineuronal nets: past and present. **Trends in neurosciences**, v. 21, n. 12, p. 510-515, 1998.

CRESPO, D.; ASHER, R.; LIN, K.; RHODES, E.; FAWCETT, J. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS?. **Experimental Neurology**. v. 206; p. 159–171; 2007.

CHANGEUX, J.P; DANCHIN, A. Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. **Nature**. v. 264; p.

705–712; 1976

DAVID, L.S; SCHACHNER, M; SAGHATELYAN, A. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-R affects adult but not developmental neurogenesis in the olfactory bulb. **J Neurosci.** v. 33; p.10324–10339; 2013.

DEEPA, S. et al. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. **J Biol Chem.** V. 281; p.17789–17800; 2006.

DITYATEV, A.; BRÜCKNER, G.; DITYATEVA, G.; GROSCHE, J.; KLEENE R.; SCHACHNER, M. Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate- rich extracellular matrix of perineuronal nets. **Dev Neurobiol.** v. 67; p.570–588; 2007.

DZYUBENKO, E.; GOTTSCHLING, A.; FAISSNER, A. Neuron-Glia Interactions in Neural Plasticity: Contributions of Neural Extracellular Matrix and Perineuronal Nets. **Neural Plasticity.** p.10-14; 2016.

FELDMAN, D.E.; BRECHT, M. Map plasticity in somatosensory cortex. **Science**, v. 310, n. 5749, p. 810-815, 2005.

FOX, K; CATERSON, B. Freeing the brain from the perineuronal net. **Science**, v. 298, n. 5596, p. 1187-1189; 2002.

FRANCO, S.; MÜLLER, U. Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system. **Developmental Neurobiology.** v.71; p. 889–900; 2011.

FRISCHKNECHT, R.; GUNDELFINGER, E. The brain's extracellular matrix and its role in synaptic plasticity. **Advances in Experimental Medicine and Biology.** v.970; p. 153–171; 2012.

GALTREY, C.; KWOK, J.; CARULLI, D.; RHODES, K.; FAWCETT, JW. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. **Eur J Neurosci.** v.27; p.1373–1390; 2008.

GU, W.; FU, S.; WANG, Y.; LI, Y.; LU, H.; XU, X.; LU, P. Chondroitin sulfate proteoglycans regulate the growth, differentiation and migration of multipotent neural precursor cells through the integrin signaling pathway. **BMC Neurosci.** V.10; p.128; 2009.

HELD, H. Über den Bau der grauen und weissen Substanz. I. Zur Kritik der pericellularen Netze der Ganglienzellen. **Arch. Anat. Entw.-Gesch.**p. 189-224; 1902.

HENSCH,TK. Critical period mechanisms in developing visual cortex. **Curr Top Dev Biol.** v.69; p.215–237; 2005.

HENSCH, T.; PARIZAD, M. Re-opening Windows: Manipulating Critical Periods for Brain Development. **Cerebrum.** v.11; p. 33-40; 2012.

HOCKFIELD, S. Induction of a neuronal proteoglycan by the NMDA receptor in the developing spinal cord. **Science.** v. 250; p.294–296; 1990a.

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

ITO, D. ET AL. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. **Stroke.** v. 32; p.1208– 1215; 2001.

KARETKO, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J. Diverse functions of perineuronal nets. **Acta Neurobiologia e Experimentalis.** v.69; p.564–577; 2009.

KETTENMANN, H.; KIRCHHOFF, F.; VERKHRATSKY, A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. **Neuron.** v. 77, p.10-14, 2013.

KOROTKOVA, T; FUCHS, E.C; PONOMARENKO, A; von ENGELHARDT, J; MONYER, H; NMDA receptor ablation on parvalbumin-positive interneurons impairs hippocampal synchrony, spatial representations, and working memory. **Neuron.**v.68, p. 557-69; 2010.

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

KNUDSEN, E. Sensitive periods in the development of the brain and behavior. **J Cogn Neurosci**. v.16; p. 1412–1425; 2004.

KWOK, J. C.; DICK, G.; WANG, D.; FAWCETT, J. W. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. **Developmental Neurobiology**. v. 71; p.1073-108; 2011.

LUNDELL, A.; OLIN, A.; MORGELIN, M.; AL-KARADAGHI, S.; ASPBERG, A.; LOGAN, DT. Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: evidence for across linking role for tenascins. **Structure**. v.12; p. 1495– 506; 2004.

MABUCHI, M.; MURAKAMI, S.; TAGUCHI, T.; OHTSUKA, A. Purkinje cells in the adult cat cerebellar cortex possess a perineuronal net of proteoglycans. **Arch Histol Cytol**. v. 64; p.203–209; 2001.

MCRAE, P.; ROCCO, M.; KELLY, G.; BRUMBERG, J.; MATTHEWS, R. Sensory deprivation alters aggrecan and perineuronal net expression in the mouse barrel cortex. **J Neurosci**. v. 27; p. 5405–5413; 2007.

MILEV, P. et al. Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 247; p.207–212; 1998.

MORAWSKI, M.; BRÜCKNER, M.; RIEDERER, P.; BRÜCKNER, G. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. **Exp Neurol**. v.188; p.309–315; 2004.

MORRIS, N.; HENDERSON, Z. Perineuronal nets ensheath fast spiking, parvalbumin immunoreactive neurons in the medial septum/diagonal band complex. **Eur J Neurosci**.v.12; p.828–838; 2000.

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

OOHASHI, Toshitaka et al. The hyaluronan and proteoglycan link proteins:

organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. **Experimental neurology**, v. 274, p. 134-144, 2015.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **J Pathol**. v.204; p.428–437; 2004.

PETANJEK, Z.; JUDAS, M.; SIMIC, G.; RAIN, M.; UYLINGS, H.B.; RAKIC, P.; KOSTOVIC, I. Extraordinary neonty of synaptic spines in the human prefrontal cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.108; p. 13281–13286; 2011.

PIZZORUSSO, T.; MEDINI, P.; BERARDI, N.; CHIERZI, S.; FAWCETT, J.; MAFFEI, L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. **Science**. v.298; p.1248–1251; 2002.

PIZZORUSSO, T.; MEDINI, P.; LANDI, S.; BALDINI, S.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. **Proc Natl Acad Sci**. v.103; p. 8517–8522; 2006.

POCOCK, J.; KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends in Neurosciences**. v.30; p.527–535; 2007.

RAUCH, U. Extracellular matrix components associated with remodeling processes in brain. **Cell Mol Life Sci**. v.61; p. 2031–2045; 2004.

SÁ, A. Plasticidade dependente da experiência induzida por manipulação da matriz extracelular. Tese de Doutorado -Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

SCHWARZACHER, S.W. et al. Neuronal hyperactivity induces astrocytic expression of neurocan in the adult rat hippocampus. **Glia**, v. 53, n. 7, p. 704-714; 2006.

SHU, SIYUN; JU, Gong; FAN, Lingzhi. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neuroscience letters**, v. 85, n. 2, p. 169-171;1988.

SLAKER, M; CHURCHILL, L; TODD, R.P; BLACKTOP, J.M; ZULOAGA, D.G; RABER, J. et al. Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the consolidation and reconsolidation of cocaine-induced conditioned place preference. **J Neurosci**. v. 35,p. 4190–4202; 2015

SMITH, George M.; STRUNZ, Celia. Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes. **Glia**, v. 52, n. 3, p. 209-218, 2005.

SONNTAG, M. Blosa, S. Schmidt, R. R"ubsamen, and M. Morawski, "Perineuronal nets in the auditory system," **Hearing Research**, v. 329, p. 21-32, 2015.

TANG, X.; DAVIES, J.; DAVIES, S. Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. **J Neurosci Res**. v.71; p.427–444; 2003.

UENO, Hiroshi et al. Postnatal development of GABAergic interneurons and perineuronal nets in mouse temporal cortex subregions. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 63, p. 27-37, 2017.

VERRET, L; MANN, E.O; HANG, G.B; BARTH, A.M; COBOS, I; HO K; DEVIDZE, N; MASLIAH, E; KREITZER, A.C; MODY, I; MUCKE, L; PALOP, J.J. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. **Cell**. v. 149, p. 708-721; 2012.

VO, T.; CARULLI, D.; EHLERT, E. The chemorepulsive axon guidance protein semaphorinA is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain. **Molecular and Cellular Neuroscience**. V. 56; p.186–200; 2013.

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

WEGNER, F. et al. Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells

immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. **Exp Neurol.** v.184; p.705–714; 2003.

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

XUE, Y.X; XUE, L.F; LIU, J.F; HE, J; DENG, J.H; SUN, S.C, et al. Depletion of perineuronal nets in the amygdala to enhance the erasure of drug memories. **J Neurosci.**v. 34, p. 6647–6658; 2014.

ZHAN, Y. et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. **Nat. Neurosci.** V.17; p. 400–406; 2014.