



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROIMUNOLOGIA

FLÁVIO BRANDÃO MAIA

SISTEMA PURINÉRGICO MODULA O DESENVOLVIMENTO DO MAPA
TOPOGRÁFICO RETINOTECTAL DE RATOS: PAPEL DA ADENOSINA E
DO AMPc

NITERÓI
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Maia, F. B.

Sistema Purinérgico Modula o Desenvolvimento do Mapa Topográfico Retinotectal de Ratos: Papel da Adenosina e do AMPc./

Flávio Brandão Maia. _____ Niterói: [s.n.], 2006.

79f.:il.

Dissertação. _____ (Mestrado em Neuroimunologia). _____
Universidade Federal Fluminense, 2006.

1. Plasticidade Neural.
2. Projeção Retinotectal.
3. Calcineurina.
4. Lesão de Retina
5. Refinamento Topográfico I. Título.

FLÁVIO BRANDÃO MAIA

SISTEMA PURINÉRGICO MODULA O DESENVOLVIMENTO DO MAPA
TOPOGRÁFICO RETINOTECTAL DE RATOS: PAPEL DA ADENOSINA E
DO AMPc

Dissertação de Mestrado apresentado à
Coordenação do Programa de Pós-graduação em
Neuroimunologia do Instituto de Biologia da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial para a obtenção do Título de
Mestre.

Orientador: Prof^ª Dr^ª PAULA CAMPELLO COSTA LOPES

Niterói
2006

FLÁVIO BRANDÃO MAIA

SISTEMA PURINÉRGICO MODULA O DESENVOLVIMENTO DO MAPA
TOPOGRÁFICO RETINOTECTAL DE RATOS: PAPEL DA ADENOSINA E
DO AMPc

Dissertação de Mestrado apresentado à
Coordenação do Programa de Pós-graduação em
Neuroimunologia do Instituto de Biologia da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial para a obtenção do Título de
Mestre.

Submetida em 10 de outubro de 2006.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Mônica Santos Rocha
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Faria Melibeu
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Roberto Paes de Carvalho
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Cláudio Alberto Serfaty (REVISOR E SUPLENTE)
Universidade Federal Fluminense

Niterói
2006

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	p. vi
LISTA DE ABREVIATURAS	p. vii
RESUMO	p. ix
ABSTRACT	p. x
1 INTRODUÇÃO	p. 1
1.1 A via visual central	p. 1
1.1.1 A formação do mapa retinotópico	p. 4
1.1.2 Período crítico	
1.1.2.1 O período crítico do desenvolvimento retinotectal	p. 8
1.2 Plasticidade sináptica	p. 11
1.3 Adenosina	p. 12
1.4 AMPc	p. 17
2 OBJETIVOS	p. 21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	p. 22
3.1 Técnica bioquímica	p. 22
3.1.1 Dosagem do AMPc	p. 22
3.1.2 Western Blot	p.24
3.2 Técnica histoquímica	p. 27
3.2.1 Tratamento sistêmico	p. 27
3.2.2 Injeção intra-ocular de traçador	p. 28
3.2.3 Perfusão e processamento histológico	p. 29
3.2.4 Histoquímica para peroxidase	p. 29
3.2.5 Análise histoquímica	p. 30

4 RESULTADOS	p. 32
4.1 Ontogênese do AMPc no colículo	p. 32
4.2 Papel da adenosina na formação das projeções retinotectais	p. 34
4.3 Expressão dos receptores purinérgicos A ₁ e A _{2a} no colículo de animais tratados com dipiridamol	p.44
5 DISCUSSÃO	p. 46
5.1 Ontogênese do AMPc no colículo	p.47
5.2 Efeitos do NECA sobre o acúmulo de AMPc	p.52
5.3 Papel da adenosina na formação das projeções retinotectais	p.54
6 CONCLUSÕES	p. 60
7 BIBLIOGRAFIA	p. 62
7 ANEXO	p. 78

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha mãe que sempre me apoiou e me apóia em tudo o que faço, além da sua torcida, é claro!!!

À minha orientadora pela paciência e bom humor. Saiu!!!!!!rsrs

À minha filhota, Bruna, que está sempre com um bom humor que contagia a todos!!!!
Que figurinha!!!

Aos meus irmão, Lu e Léo. Vocês são 10!!!!

Aos amigos que, de perto ou de longe, estão sempre torcendo...só não vou citar nomes porque certamente esqueceria de vários.

Ao pessoal do laboratório de plasticidade que é “UM ESPETÁCULO”!!! Cláudio, Paulinha, Adriana, Priscila, Pablito, Gigante, Rachel, Leticia, Rafaela, Henrique, Tita, Ana Helena, Fernanda...

Não poderia esquecer, claro, do Wantuílson (Le N...) e do Caco (Vidão!), grandes amigos.
Que venha a Euforia!!!

Aos amigos do departamento. Rodrigo, Liana, Chico, Ana, Erick, Guilherme, Octavia,...

Ao Alecsandro pelo cuidado dispensado ao biotério.

Bem...será que falta alguém(rs)??? Claro!! Patrícia, ou Paty, como prefere. Pela paciência, dedicação, carinho, companheirismo, enfim, tudo que tem feito. “Brigadão”!

Lista de abreviaturas

A1, A2a, A2b e A3 – Diferentes subtipos de receptor de adenosina

AC – Adenilil ciclase

AMP – monofosfato de adenosina

AMPC – monofosfato cíclico de adenosina

CBP – Proteína Ligante de CREB

CREB – Elemento de Ligação Responsivo ao Ampc

CS – Colículo Superior

DPN – dia pós natal

EHNA – erythro – 9 – (2 – HYDROXY – 3 - NONYL) ADENINE

GABA – Ácido -aminobutírico

GAD - Glutamato descarboxilase

HRP – Peroxidase de Raiz Forte (neurotraçador)

KO – “Knock-out”

KW 6002 – antagonista de receptores A_{2a}.

LGN – núcleo geniculado lateral

LTD – Depressão de Longa Duração

LTP – Potenciação de Longa Duração

mGluR – receptor glutamatérgico metabotrópico

MR 1523 – antagonista de receptores A₃.

nM – nano Molar (10⁻⁹)M

NMDA – N-metil-D-Aspartato

PDE – AMPc Fosfodiesterase

PKA – Proteína Cinase A

PKs – Proteínas cinases

RGCs – Células Ganglionares da Retina

SGS – Stratum Griseum Superficiale

SNC – Sistema Nervoso Central

TCA – Ácido tricloro acético

TO – Teto óptico

μM – micro Molar (10^{-6}) M

NECA – agonista não seletivo dos receptores de adenosina

RESUMO

As projeções ipsolaterais de roedores se desenvolvem durante as duas ou três primeiras semanas pós-natal, quando surge um padrão adulto. Durante este período crítico, rápida reorganização nesta via pode ser induzida por lesões ou manipulações experimentais que interfiram com seu padrão de atividade elétrica, liberação de mensageiros retrógrados ou neurotransmissores. A adenosina é um neuromodulador que tem sido relacionado com o desenvolvimento e plasticidade do sistema nervoso. Neste trabalho, nós investigamos a ontogênese do AMPc e a modulação dos níveis de AMPc por agonista purinérgico. Também analisamos os efeitos *in vivo* de um bloqueio agudo do transportador de adenosina ou da enzima adenosina deaminase durante o desenvolvimento e manutenção da topografia retinotectal ipsolateral, além da expressão de receptores A₁ e A_{2a} no colículo superior após tratamento com dipiridamol. Ratos Lister Hooded com idades entre DPN10 e DPN28 foram usados neste estudo. Para estudos com traçadores anterógrados animais foram tratados com injeções diárias de EHNA (10mg/Kg ip) ou dipiridamol (10, 30 ou 50 mg/Kg) durante quatro dias (DPN10-14) ou oito dias (DPN20-27). O grupo controle recebeu injeções de veículo (salina ou óleo de oliva) durante o mesmo período. As projeções retinotectais ipsolaterais foram marcadas a partir de uma injeção intra-ocular de peroxidase de raiz forte (HRP). Após sobrevivência de 24h, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e os cortes processados para histoquímica de HRP. Outro grupo de animais tratado com dipiridamol foi usado para western blotting. Nossos resultados mostraram que o tratamento com EHNA ou dipiridamol (50mg/Kg) geraram uma expansão dos campos terminais retinotectais no eixo rostro-caudal do colículo superior. Este efeito não foi observado durante terceira e quarta semanas pós-natal. Além disso, a expressão de receptores A_{2a} sofreu uma diminuição nos animais tratados com dipiridamol durante o período crítico. Em conjunto esses resultados sugerem um papel do sistema purinérgico no desenvolvimento e plasticidade retinotectal.

ABSTRACT

The ipsilateral retinotectal projection of rodents develops within the first two/three post-natal weeks, when a topographical match of retinotectal axons acquires an adult-like pattern. During this critical period, rapid reorganization in this pathway can be induced by lesions or experimental manipulations that interfere with the pattern of electrical activity, release of retrograde messengers or neurotransmitters. Adenosine is a neuromodulator that has been implicated in nervous system development and plasticity. In the present work, we investigated the ontogenesis of cAMP and the modulation of cAMP by purinergic agonist *in vitro*. We also analyzed the effects of an acute *in vivo* blockade of adenosine transporter or adenosine deaminase during the development and maintenance of the uncrossed retinotectal topography and the expression of A1 and A2a receptors in the superior colliculus after dipyridamole treatment. Lister Hooded rats ranging from PND10 to PND28 were used in this study. For anterograde tracing studies, animals were treated with daily injections of EHNA (10 mg/Kg, ip) or dipyridamole (10, 30 or 50 mg/Kg, ip) during 4 (PND10-14) to 8 days (PND20-28). Control groups received injections of vehicle (saline or olive oil) during the same period. Retinotectal projections were traced with intraocular injection of horseradish peroxidase. After a survival time of 24hs, the animals were perfused transcardially with saline followed by aldehydes and the sections processed for HRP histochemistry. Another group of dipyridamole-treated rats were used for western blotting. Our data showed that the treatment with EHNA or dipyridamole (50 mg/Kg) revealed an expansion of retinotectal terminal fields in the rostro-caudal axis of the tectum. This effect was not found during the third/fourth postnatal week. Moreover the expression of A2a receptors were decreased in dipyridamole-treated rats within the critical period. Taken together, the results suggest a role for purinergic system in the retinotectal development and plasticity.

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central é extremamente complexo (Heiduschka & Thanos, 2000). Esta característica é devida às relações estabelecidas entre suas células constituintes, o meio no qual estão inseridas e, principalmente, às constantes alterações entre estas. Como uma de suas peculiaridades é o fato de ser incapaz de produzir proliferação celular significativa na idade adulta, salvo em regiões como hipocampo (Kempermann & Gage, 1999) e zona subventricular do córtex cerebral, o sistema nervoso desenvolveu a capacidade de se moldar a variações nos padrões de estimulação, que podem ser causadas por diferenças na experiência sensorial, injúria, doença ou processos mais complexos como o de aprendizado/memória. Este fenômeno é chamado de plasticidade neural.

Um bom modelo de estudo do desenvolvimento e da plasticidade no sistema nervoso central (SNC) é a via visual. Esta permite sua manipulação com maior facilidade por ser mais acessível para experimentação, além de apresentar durante o desenvolvimento padrões de conectividade que normalmente ocorrem em todo o SNC, como laminação e segregação de axônios (Shatz, 1992; Isenmann *et al.*, 2003).

1.1 A via visual central

Inicia-se na retina, a qual é um órgão sensorial derivado do ectoderma neural, especializado na detecção, localização e análise da luz, localizada na parede posterior do olho com células dispostas em camadas que têm como função reconhecer, transduzir este sinal luminoso em estímulo elétrico e transportá-lo para vias visuais superiores. Estruturalmente, a retina é organizada em cinco camadas, gerando assim um padrão laminar presente também em

diferentes estruturas do SNC. São três camadas celulares e duas camadas plexiformes dispostas da periferia para o centro do globo ocular. A camada mais externa é a camada dos segmentos externos dos fotorreceptores (OS), que é a região fotossensível da retina. A seguir está a camada nuclear externa (ONL) contendo os corpos celulares dos fotorreceptores. Segue-se a camada plexiforme externa (OPL), na qual se conectam células bipolares, horizontais e fotorreceptores; a camada nuclear interna (INL), composta por células amácrinas, bipolares e horizontais; a camada plexiforme interna (IPL) onde contatos sinápticos entre células ganglionares amácrinas e bipolares ocorrem e, mais internamente, a camada de células ganglionares (GCL), sendo compreendida por seus corpos celulares e por corpos celulares de células amácrinas deslocadas (Mey & Thanos, 2000; Klassen *et al.*, 2004) (Fig.1).

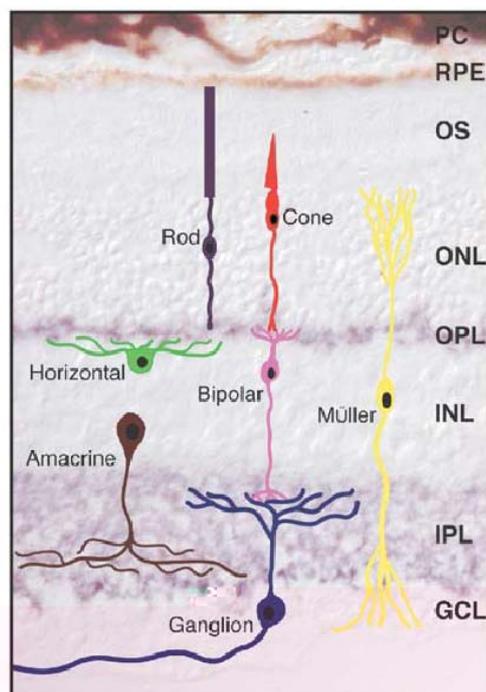


Fig.1: Fotomicrografia ilustrando as camadas e os diferentes tipos celulares presentes na retina : PC - células progenitoras multipotentes, RPE - epitélio pigmentar, OS- segmento externo de fotorreceptores, ONL – camada nuclear externa, OPL – camada plexiforme externa, INL – camada nuclear interna, IPL – camada plexiforme interna, GCL – camada de células ganglionares (Klassen *et al.*, 2004).

Os axônios das células ganglionares (RGCs) se dirigem ao disco óptico, tornam-se mielinizados e formam o nervo óptico que ascende as informações a outras estruturas da via visual tais como pré-tecto, colículo superior e núcleo geniculado lateral (LGN) (Fig.2).

Em ratos, o colículo superior é o principal centro visual sub-cortical e o desenvolvimento da via retinotectal se inicia no útero, sem experiência visual (Binns & Salt, 1998). Esta via se estende pelo nervo óptico até quiasma óptico, local onde ocorre uma decussação parcial dos aferentes provenientes da porção nasal da retina, enquanto as projeções ipsolaterais provêm da retina temporal, em uma região chamada de crescente temporal.

Em primatas, inclusive no homem, a proporção de células que cruzam e que não cruzam para o lado oposto do encéfalo é a mesma (Simon & O'Leary, 1992), enquanto em roedores 95% das células ganglionares são de projeção contralateral (Linden & Perry, 1983). Os 5% restantes se encontram na periferia temporal da retina, a crescente temporal. Após passarem pelo quiasma óptico, os axônios formam os tratos ópticos e seguem para seus alvos de projeção (Fig.2)

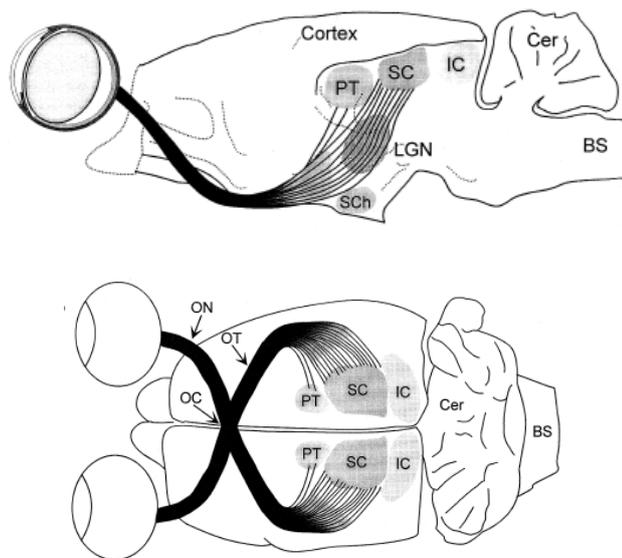


Fig.2: Representação da via retinotectal de ratos. Os axônios do nervo óptico (ON) terminam principalmente no colículo superior (SC) e alguns deles no pré-tectum (PT). Outras abreviaturas: BS, tronco cerebral; Cer, cerebelo; IC, colículo inferior; LGN, núcleo geniculado lateral; OC, quiasma óptico; OT, trato óptico; Sch, núcleo supraquiasmático (Heiduscka & Thanos, 2000).

1.1.1 A formação do mapa retinotópico

O colículo superior é uma estrutura mesencefálica dorsal, laminada, equivalente ao teto óptico (TO) de vertebrados não mamíferos (O'Leary *et al.*, 1994; Debsky *et al.*, 2002) sendo sua região superficial responsável pelo processamento primário de informações visuais e regiões profundas relacionadas à integração sensório-motora (King, 2004). Anatomicamente, se divide as camadas visuais em *stratum zonale* (SZ) a camada mais superficial, *stratum griseum superficiale* (SGS) e *stratum opticum* (SO). As camadas de processamento motor, auditivo e de integração são *stratum griseum intermediale* (SGI), *stratum album intermediale* (SAI), *stratum griseum profundum* (SGP) e *stratum album profundum* (SAP) a mais profunda (Lee & Hall, 1995; Parsons *et al.*, 2001) (Fig.3), já tendo sido demonstradas extensas conexões inter-laminares nesta estrutura, principalmente vias que descendem de camadas superficiais para camadas pré-motoras mais profundas (Lee & Hall, 1995).

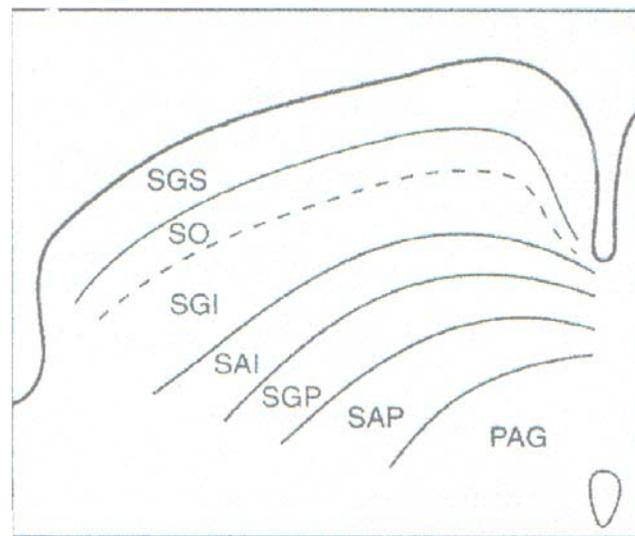


Fig.3: Esquema da laminação no colículo superior em corte coronal. A linha pontilhada delimita as camadas de processamento visual na região dorsal e as camadas profundas de processamento auditivo, motor e integração de informações. *stratum griseum superficiale* (SGS), *stratum opticum* (SO), *stratum griseum intermediale* (SGI), *stratum album intermediale* (SAI), *stratum griseum profundum* (SGP) e *stratum album profundum* (SAP). O *stratum zonale* não está representado. (Parsons *et al.*, 2001).

A geração de respostas comportamentais aos estímulos visuais requer o apropriado ordenamento topográfico das conexões no sistema nervoso central. Esta se dá através da formação de mapas topográficos que consiste na representação ordenada de axônios de células ganglionares adjacentes em regiões correspondentes no alvo (Fig.4). Esta é uma característica organizacional fundamental da representação do espaço sensorial no SNC (Simon *et al.*, 1992), visto que permite a tradução das características do estímulo em um código neural coerente (Lemke & Reber, 2005).

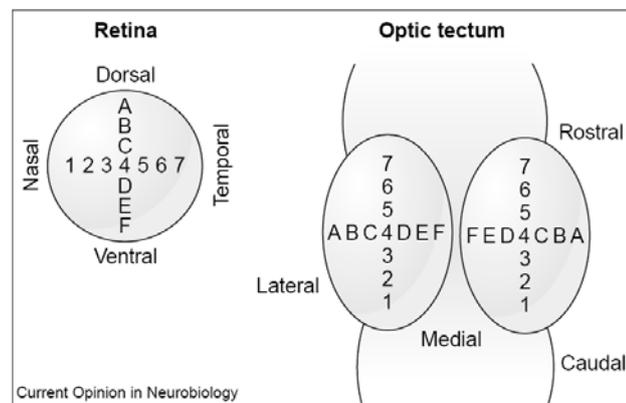


Fig.4: Mapa esquemático das projeções retinotectais. A imagem do mundo visual (representada por números e letras) é invertido na parte posterior da retina. . As projeções da retina ao tectum se organizam topograficamente, de forma que células ganglionares da retina (RGCs) nasal projetam para neurônios na porção caudal do tectum óptico, RGCs temporal projetam para o tectum rostral, RGCs dorsal projetam para o tectum medial e RGCs ventral projetam para o tectum lateral (Debsky & Cline, 2002).

Para que os axônios das células ganglionares da retina possam alcançar corretamente seus alvos no colículo superior, eles sofrem influência de diversas moléculas quimioatrativas e quimiorrepulsivas (Rodger *et al.*, 2000), fatores de crescimento (Yun-Tao *et al.*, 1998), moléculas de adesão celular (CAMs) (Skaper *et al.*, 2001 para revisão). Em estágios iniciais do desenvolvimento estas pistas químicas levam ao estabelecimento de conexões em locais apropriados e à formação de um mapa topográfico rudimentar.

Com base nestes e em outros estudos é possível dizer que ocorre um direcionamento inicial dos axônios para seus alvos de maneira quase precisa. Entretanto, a projeção inicial é quase sempre maior do que aquela observada na fase adulta. Assim, é preciso que haja um

refinamento destas conexões. Dois fenômenos regressivos contribuem de maneira significativa para este refinamento, são eles: a morte celular programada (apoptose) e a eliminação seletiva de sinapses.

A morte celular programada das células ganglionares da retina ocorre predominantemente na primeira semana do desenvolvimento, mas pode se estender até o décimo dia pós-natal (DPN10). Este evento é responsável pela eliminação de aproximadamente 50% destas células retinianas, e é decorrente principalmente da competição por fatores neurotróficos derivados do alvo, que são transportados retrogradamente em neurônios centrais e promovem a sobrevivência destes *in vitro* (Thanos *et al*

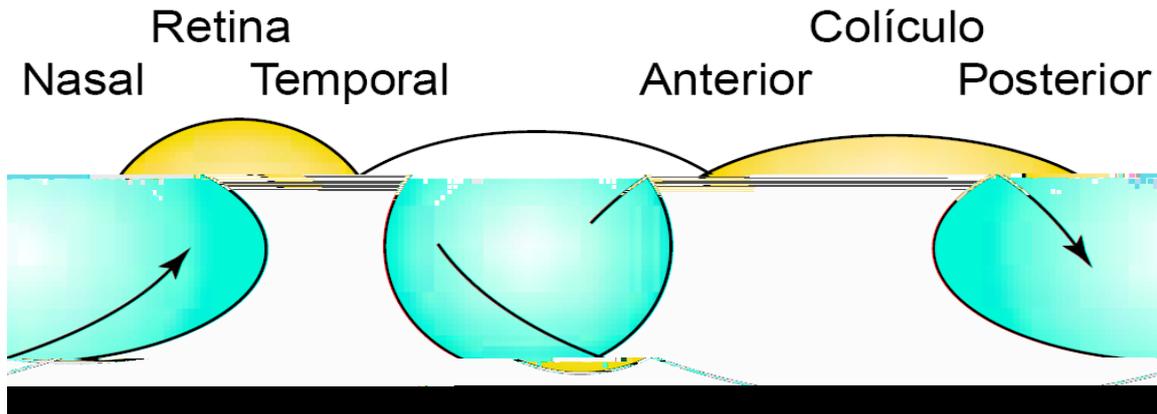


Fig.5: Orientação topográfica das projeções retinotectais mediada por gradiente de efrinas. Axônios da retina temporal crescem e estabelecem conexões na região anterior do colículo enquanto axônios nasais se projetam para regiões mais caudais. Adaptado de Knöll & Drescher, 2002.

A eliminação de contatos sinápticos não apropriados também contribuirá para que haja o refinamento das conexões visuais iniciais, promovendo então um ordenamento retinotópico preciso (Land & Lund, 1979; Perry *et al.* 1983). Este refinamento topográfico dependerá da atividade elétrica, que se divide em espontânea e evocada. A atividade elétrica espontânea ocorre tanto nas células ganglionares quanto nas células pós-sinápticas do colículo superior. No CS esta atividade elétrica começa a ser detectável entre DPN5 e DPN6 e ocorre sem alteração mesmo quando o CS é isolado funcionalmente da retina através de injeção de lidocaína no nervo óptico (lidocaína é um anestésico local que bloqueia canais de sódio dependentes de voltagem). Estes achados sugerem que os neurônios coliculares sejam os geradores destas descargas espontâneas (Molotchnikoff, 1995). A atividade elétrica evocada se inicia por volta de DPN13 e consiste na ativação da via pela abertura dos olhos, a qual estabelecerá o padrão de projeções encontrado no animal adulto (Katz & Crowley, 2002).

1.1.2 Período crítico

No início do desenvolvimento as sinapses são estruturas lábeis, por conta de sua imaturidade. Esta condição ocorre nas diferentes vias do sistema nervoso em uma janela

temporal, definida como período crítico (Ghoumari *et al.*, 2000). Neste período elas são mais suscetíveis a alterações nos padrões de estimulação apresentando significativa reorganização, causada pelas diferentes etapas do desenvolvimento normal (experiência sensorial) ou por manipulações experimentais, como enucleação ou lesão de retina, bloqueio de atividade elétrica, bloqueio de neurotransmissores, bloqueio da síntese de mensageiros retrógrados (Campello-Costa *et al.*, 2000) ou outros capazes de alterar a estabilização sináptica (Constantine-Paton, 1990).

Cada espécie e cada estrutura de um mesmo sistema possui um período crítico característico de acordo com seu desenvolvimento. Na via retinotectal de ratos este período se dá até DPN 21, a partir de então, as conexões se tornam gradativamente mais estáveis e assim menos plásticas.

1.1.2.1 O período crítico do desenvolvimento retinotectal

Em diversos animais este padrão das projeções retinotectais sofre alterações ao longo do desenvolvimento pós-natal. Em ratos, os axônios provenientes de células ganglionares da retina atingem a porção anterior do colículo superior já no décimo sexto dia embrionário (E16) (Lund & Bunt, 1976; Molotchnikoff, 1995). No início da vida pós-natal ocorre uma distribuição difusa no colículo superior, onde aferentes de ambos os olhos se sobrepõem durante as duas primeiras semanas. Posteriormente, começa a ocorrer retração axonal, passando estes terminais ipsolaterais a ocupar regiões menores no colículo em forma de aglomerados, ou “clusters”. Seguindo o princípio proposto por Hebb (1949), no qual células que disparam em sincronia tendem a fortalecer seus contatos sinápticos, esta retração se deve à degeneração/eliminação sináptica de células ganglionares que foram incapazes de estabelecê-los satisfatoriamente. Injeções intra-oculares de transportadores anterógrados na

retina, como a peroxidase de raiz forte (HRP), são capazes de marcar estes terminais sinápticos ipso e contra-laterais, possibilitando avaliar a densidade de marcação nos terminais que cruzaram ou não (Serfaty & Linden, 1991). Esta técnica permitiu que Serfaty e Linden (1994) demonstrassem a ontogênese das projeções retinotectais em ratos (Fig.6).

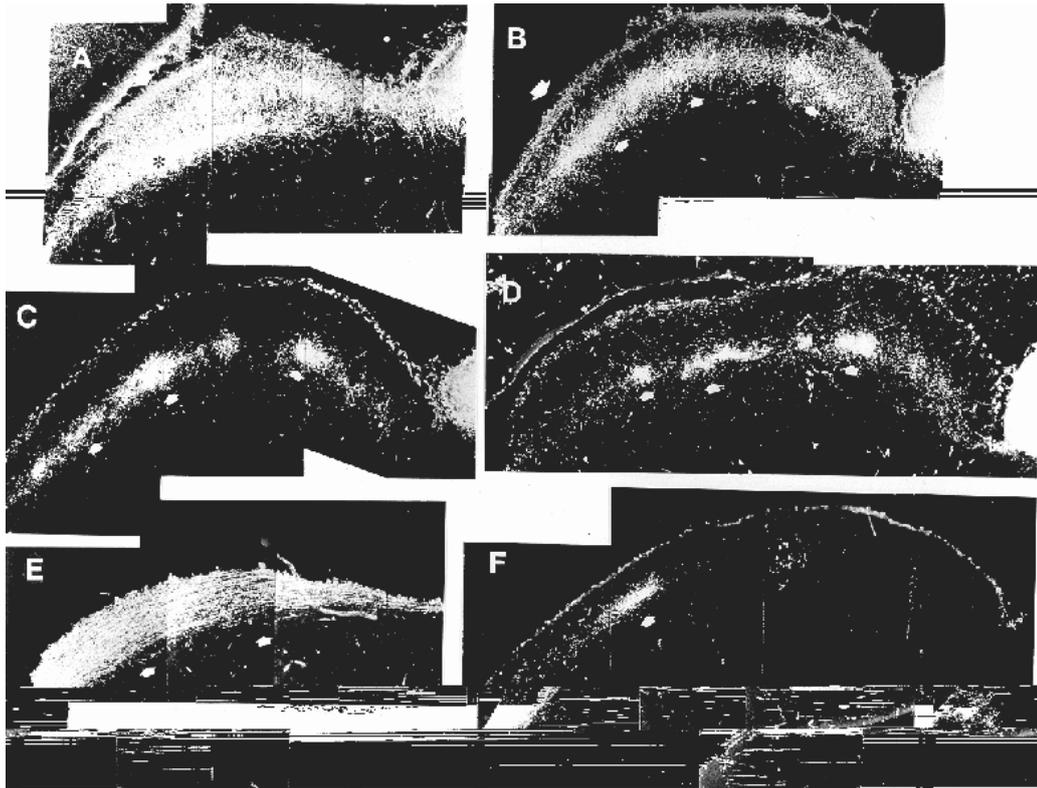


Fig.6: Fotomicrografia de campo escuro mostrando a progressiva restrição topográfica das projeções retinotectais ipsolaterais no terço anterior do colículo superior. A-D (cortes coronais em DPN 0, 3, 5 e 10, respectivamente; E-F (cortes parassagitais em DPN 1 e 10, respectivamente); Os ratos receberam injeção intra-ocular de peroxidase no dia pós-natal 0 (DPN0) Notar que as projeções transitórias entre DPN0-3 (A, B e E), se restringem entre DPN5-10 (C, D e F) e os aglomerados de marcação terminal em regiões profundas do SGS (Serfaty & Linden, 1994).

Quando ocorre uma perturbação nesta via sensorial, alterações no padrão de distribuição das fibras aferentes são observadas. Um dos modelos que vem sendo utilizados em nosso laboratório para induzir reorganização neural é a lesão localizada de retina. Neste modelo, induzimos a degeneração de axônios retinianos e conseqüentemente uma denervação setorizada no colículo superior contralateral ao olho lesado. Desta forma, observa-se uma

distribuição anômala das projeções retinotectais ipsolaterais do olho intacto para regiões superficiais do colículo superior (Serfaty *et al.*, 1990) (Fig.7).

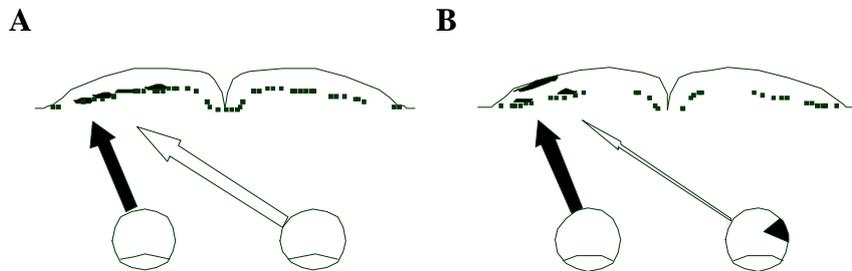


Fig.7: Modelo de lesão localizada de retina. Em A se encontra a representação da projeção retinotectal ipsolateral do animal normal e em B a reorganização da distribuição de fibras ipsolaterais induzida pela lesão de retina temporal contralateral. Notar que há uma marcação na região superficial do colículo superior.

Vários trabalhos têm demonstrado adicionalmente que esta resposta plástica pode ser observada de diferentes maneiras dependendo da etapa do desenvolvimento em que a lesão é feita. Assim, Hanson e Reese demonstraram que lesões de retina em DPN0 induzem respostas plásticas rápidas, a partir de 12 h após a lesão (Hanson & Reese, 1993). Esta resposta plástica rápida é obtida dentro do período crítico de organização destas conexões (até DPN10) e respostas lentas podem ser detectadas em fases mais tardias do desenvolvimento (DPN21), onde é necessário aumentar de 2 dias para 3 a 24 semanas o tempo de sobrevivência pós-lesão para obtenção de uma projeção aberrante característica (Serfaty *et al.*, 2005). Outros trabalhos do nosso laboratório demonstraram ainda a importância do óxido nítrico e do ácido araquidônico na estabilização sináptica e plasticidade induzida ao longo do desenvolvimento (Campello-Costa *et al.*, 2000; Campello-Costa *et al.*, 2006). Estes resultados demonstram que é possível obter modificações das respostas plásticas induzidas por lesões no sistema visual até etapas mais tardias do desenvolvimento o que transforma este modelo em uma excelente ferramenta para o estudo das condições que permeiam os fenômenos de reorganização plástica no sistema nervoso central.

Este processo também está relacionado à ativação de receptores pós-sinápticos para os aminoácidos glutamato e aspartato, chamados N-metil-D-aspartato (NMDA). Constantine-Paton demonstrou que o bloqueio desta subclasse de receptores interfere no desenvolvimento das projeções retinotectais, gerando um padrão semelhante ao presente em períodos anteriores do desenvolvimento (1990), sugerindo fortemente seu envolvimento no correto desenvolvimento desta via. Diz-se desta forma que o refinamento topográfico é um evento dependente de atividade, sendo este receptor de extrema importância no desenvolvimento por ter a capacidade de ser um detector de coincidências entre as células pré e pós-sinápticas. As características desses receptores ao longo do desenvolvimento pós-natal, entretanto, podem sofrer regulação. Em áreas como tálamo e córtex somatossensorial de camundongos observa-se um aumento da expressão da subunidade NR2A, assim como uma diminuição nos níveis da

Vários laboratórios vêm tentando determinar quais são os agentes responsáveis por este fenômeno (para revisão, Pfeifer *et al.*, 2006). Estudos têm indicado que a LTP e LTD utilizam os mesmos agentes que atuam em vias antagônicas sugerindo que sejam modificações reversíveis de um processo sináptico comum. Corroborando com esta idéia, já foi demonstrado que o íon cálcio é necessário em ambos os processos, mas, dependendo da concentração intracelular e do padrão temporal de aumento desta concentração, poderá atuar em diferentes vias metabólicas tais como a ativação de proteínas cinases ou fosfatases que levam ao fortalecimento ou enfraquecimento sináptico respectivamente (Fig 8) (Mulkey *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1995). Além do cálcio, a adenosina também desempenha um papel modulatório sobre a transmissão sináptica em diferentes regiões do sistema nervoso, sendo associada aos dois processos descritos acima.

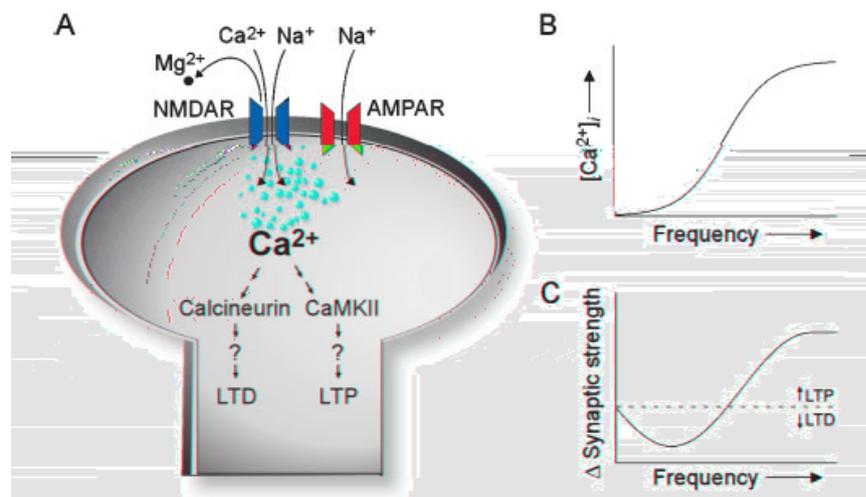


Fig.8: Esquema que ilustra que a ativação de receptores AMPA e NMDA pós-sinápticos induzindo a aumentos diferenciados na concentração citossólica de cálcio podendo levar a LTP ou LTD pela ativação de diferentes enzimas intracelulares (A). Gráfico demonstra que a concentração do cálcio é proporcional a frequência de estimulação (B). Gráfico que ilustra as variações de força sináptica de acordo com a frequência de estimulação, induzindo LTP ou LTD (C) (Franks *et al.*, 2002).

Nos últimos anos vários estudos têm demonstrado a LTP no sistema visual (Schmidt & Buzzard, 1990; Maffei L, 2002), colículo superior de mamíferos (Miyamoto *et al.*, 1990) e no córtex visual de gatos (Artola & Singer, 1990). Por outro lado, a LTD também foi

observada no colículo superior, núcleo geniculado lateral (NGL) e córtex visual (Bear, 1996; Mize & Lo, 2000). Lo e Mize demonstraram uma forte relação entre a LTD e o refinamento topográfico de conexões retinotectais de ratos (Lo & Mize, 2000a; 2000b; Mize & Lo, 2000).

1.3 Adenosina

A adenosina é uma molécula da classe das purinas que ativa receptores purinérgicos do tipo P1. Não é descrita classicamente como neurotransmissor, pois não é armazenada em grânulos sinápticos ou liberada de forma quântica, sendo classificada como neuromodulador (Agranoff *et al.*, 1999). A adenosina ganha o meio extracelular através da quebra de nucleotídeos de adenina neste espaço ou pela liberação através de transportadores de membrana, principalmente em tecidos submetidos a estresse ou hipóxia (Lloyd *et al.*, 1993). Atua em quatro subtipos de receptores: A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃ (Pearson *et al.*, 2003), estando todos ligados à enzima adenilil ciclase, que modula os níveis de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) intracelulares. É descrita como um potente inibidor da transmissão sináptica no sistema nervoso central de mamíferos (Dunwiddie & Haas, 1985; Dunwiddie & Fredholm, 1989), sendo este efeito dependente da dose e do local do cérebro. Aumentos na taxa de disparo neuronal podem aumentar significativamente os níveis extracelulares de adenosina no cérebro (Mitchel *et al.*, 1993). É, portanto, relacionada a efeitos neuroprotetores frente a quadros de isquemia ou anóxia onde, por mecanismos ainda não completamente conhecidos, a adenosina diminui a excitotoxicidade causada pelo aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios, sendo o principal deles o aminoácido glutamato (Paluchka *et al.*, 2001). Algumas das sugestões para explicar este efeito da adenosina é que estaria atuando em terminais pré-sinápticos, levando a uma diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios (Dunwiddie & Haas, 1985) via diminuição do influxo de íons cálcio (Ca²⁺) no

Estudos eletrofisiológicos têm gerado grande avanço na descoberta das formas de modulação produzidas pelos diferentes receptores de adenosina, assim como técnicas farmacológicas, imunocitoquímicas, bioquímicas entre outras, na localização e distribuição dos mesmos. Os receptores A_1 e A_3 são descritos como acoplados negativamente à enzima adenilil ciclase (Pearson *et al.*, 2003), estando sua ativação diretamente relacionada com a diminuição dos níveis intracelulares de AMPc, o que faz com que a ativação destes apresentem efeito inibitório, enquanto A_{2a} e A_{2b} são acoplados positivamente. A localização de A_1 é descrita como sendo prioritariamente pré-sináptica (Wan & Geiger, 1990). A ativação dos receptores A_2 é a principal via responsável pelos efeitos estimulatórios que a adenosina é capaz de gerar em algumas regiões cerebrais, prioritariamente via receptores A_{2a}

inibição do recaptção desta purina (Hiroshi *et al.*, 1999), além de modular efeitos anti-inflamatórios, no sistema renal, cardiovasculares e no sistema nervoso central (Kaiser & Quinn, 1999 para revisão). Estudos têm demonstrado a participação dos receptores de adenosina em diferentes quadros, visto que antagonistas de A_{2a} , como o KW-6002, reduziram os sintomas de Parksonismo em humanos (Hauser, *et al.*, 2003; Bara-Jimenez, *et al.*, 2003).

Embora os efeitos da adenosina no sistema nervoso central, em sua maioria, sejam inibitórios, alguns estudos revelaram efeitos excitatórios da adenosina em regiões como núcleo do trato solitário (Mosqueda-Garcia, 1991; Barraco *et al.*, 1995), striatum, córtex cerebral (O'Regan *et al.*, 1992) hipocampo (Nishimura *et al.*, 1990; Sebastiao & Ribeiro, 1992; Cunha & Ribeiro, 2000) e colículo superior (Okada *et al.*, 1990; Miyamoto *et al.*, 1991; Hirai & Okada, 1995), além do aumento de liberação de glutamato em cultura de células gliais (Li *et al.*, 2001). Porém, estes efeitos, mesmo nas regiões supracitadas, são dose-dependentes. Em fatias de hipocampo, a aplicação de adenosina em concentrações baixas, entre 10 nM e 1 μ M, aumentou a transmissão sináptica, enquanto que em concentrações maiores que 10 μ M gerou diminuição. Por outro lado, em fatias de colículo superior, a administração de adenosina em concentrações maiores que 10 nM gera facilitação da transmissão sináptica, condição que não muda nem com concentrações de 1 mM (Kobayashi & Okada, 1999).

Tão importante quanto a manipulação direta dos efeitos da adenosina através da aplicação de drogas que ativam ou bloqueiam seus receptores é a indireta, que ocorre por alterações em sua via metabólica. Em fatias de hipocampo de ratos a enzima adenosina cinase desempenha um papel maior na regulação da concentração extracelular de adenosina sob condições com adequadas taxas de oxigenação e glicose, enquanto a adenosina deaminase se torna importante quando a formação de adenosina é elevada por depleção de energia (ATP>ADP>AMP>adenosina) (Lloyd & Fredholm, 1995). Desta forma, além da distribuição

de receptores purinérgicos, o estudo da expressão destas enzimas nas diferentes regiões torna-se necessário. No colículo superior de ratos, por exemplo, a atividade da adenosina deaminase é maior que em outras regiões cerebrais (Geiger & Nagy, 1986;1990).

Corroborando das idéias expostas, estudos comprovam que na via retinotectal de ratos há presença de A_1 e de A_{2a} e naqueles submetidos a uma enucleação monocular há uma diminuição de receptores A_1 , proveniente da degeneração das células ganglionares da retina (Geiger & Wan, 1990), mas não de A_{2a} , abundantes no *stratum griseum superficiale*, reforçando a localização de cada subtipo destes receptores nesta via.

Mesmo tendo sido descrito que a ativação de A_{2a} no striatum deprime a transmissão GABAérgica (Kurokawa *et al.*, 1994; Kirk & Richardson, 1995) e existindo no colículo superior, principalmente no *stratum griseum superficiale*, grande quantidade de ácido - aminobutírico (GABA), e intensa atividade da enzima glutamato descarboxilase (GAD) (Kurokawa *et al.*, 1994), que sintetiza GABA a partir de glutamato, além de 60% dos neurônios do *stratum griseum superficiale* serem interneurônios GABAérgicos (Fredholm & Dunwiddie, 1988), Kobayashi e Okada (1999) demonstraram que os efeitos excitatórios da adenosina não são mediados por inibição do sistema GABAérgico.

Kessey & Mogul (1998) demonstraram portanto que a ativação de A_2 é capaz de modular a transmissão sináptica no hipocampo em conjunto com estímulos tetânicos (100Hz) por uma via dependente de AMPc, pois os efeitos facilitatórios da transmissão sináptica alcançados são mimetizados por administração de 8-Br-AMPc.

No colículo superior, a adenosina tem um papel facilitador na transmissão sináptica já que a aplicação intraperitoneal de EHNA, um inibidor da adenosina deaminase, promove, além do acúmulo de adenosina no fluido cérebro-espinhal, um aumento na amplitude dos potenciais excitatórios (Ishikawa *et al.*, 1997). Por outro lado, a adenosina pode ter um efeito

inibitório na resposta pós-sináptica, o qual é abolido durante a indução da LTP na regeneração da via retinotectal (Zhang *et al.*, 1998).

1.4 AMPc

O AMPc é um segundo mensageiro essencial para uma vasta gama de processos de sinalização intracelular, culminando, entre outras, em respostas como desenvolvimento e plasticidade do sistema nervoso. Estes efeitos se relacionam à responsividade a fatores tróficos assim como às mudanças na transmissão sináptica dependente de atividade (Weisskopf *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1994). É sintetizado por uma família de enzimas, denominadas adenilil ciclases (ACs). Em mamíferos pelo menos dez isoformas já foram identificadas e caracterizadas (Tang & Hurley, 1998; Buck *et al.*, 1999). Como estas enzimas estão amplamente distribuídas pelo organismo, e podem ser moduladas por inúmeros neurotransmissores, entre eles dopamina, serotonina e adrenalina e neuromoduladores (Chern *et al.*, 2000) através da proteína G, sugere-se que elas sejam cruciais em mediar inúmeras respostas aos diferentes sistemas aos quais estão ligadas.

Alguns membros da família das ACs servem como detectores de coincidências na integração de múltiplos sinais (Bourne & Nicoll, 1993). Esta característica se faz importante uma vez que um único neurônio recebe entrada de sinais (*input*) de várias fontes distintas em fração de segundo, permitindo assim que estes detectem simultaneamente a estimulação de dois ou mais neurotransmissores. Mudanças específicas na expressão destas isoformas da AC estão envolvidas em diversos eventos fisiológicos e patológicos, como ritmo circadiano (Tzavara *et al.*, 1996), plasticidade sináptica, alcoolismo (Ikeda *et al.*, 1999), doença de Alzheimer (Yamamoto *et al.*, 1996), entre outros.

Como as variações nos níveis intracelulares de AMPc têm íntima relação com promoção de eventos plásticos, na via visual de ratos as enzimas desta família que poderiam estar causando tais eventos são AC1 e AC8 (Ravary *et al.*, 2003). Elas parecem ter distribuições complementares no desenvolvimento, pois somente a AC1 é expressa nas células ganglionares da retina durante o período de refinamento das projeções retinianas, enquanto AC8 é a principal AC estimulada por íons cálcio em neurônios coliculares. Na ausência de expressão de AC1 em ratos há uma alteração na distribuição e na formação dos aglomerados nas projeções ipsolaterais no colículo superior e no núcleo geniculado lateral dorsal, que se inicia em DPN3 (Ravary *et al.*, 2003), período caracterizado pela retração axonal próximo ao início da atividade elétrica espontânea nesta região. Segundo Ravary (2003), após um início de desenvolvimento pós-natal normal até DPN3 os axônios das células ganglionares da retina de animais KO para AC1 falham em segregar em regiões olho-específicas no CS e no LGN.

Através da ativação de receptores A_2 , e o conseqüente aumento dos níveis intracelulares de AMPc, pode ocorrer a mediação de inúmeros processos bioquímicos. Hirai e Okada (1993) demonstraram que os efeitos excitatórios da adenosina são mediados pela ativação do sistema de proteínas cinases (PKs), pois estes são abolidos com bloqueadores inespecíficos de PKs, como o H-7.

A proteína cinase A (PKA) é proposta como participante destes efeitos, pois é diretamente estimulada por AMPc. Tem como função fosforilar alvos, sendo um deles o fator de transcrição gênica conhecido como elemento de ligação responsivo ao AMPc (CREB). Quando este fator é fosforilado recruta a uma outra proteína chamada CREB Binding Protein (CBP), que se une à anterior formando um complexo ativado capaz de transcrever informações gênicas para promover, à posteriori, síntese protéica.

Os locais pós-sinápticos onde ocorrem alterações morfológicas decorrentes dos fenômenos de LTP e LTD são pequenas protusões com grande capacidade plástica, que podem ser rapidamente produzidos ou perdidos em resposta a uma sorte de estímulos internos e externos. São os chamados espinhos dendríticos (Johnson & Ouimet, 2004), os quais necessitam de síntese protéica para sua modulação. Murphy e Segal (1997), com um protocolo de estimulação da PKA dependente de AMPc através da administração de estradiol em neurônios de hipocampo em cultura, demonstraram que ocorreu um aumento de CREB fosforilada, um aumento de recrutamento de CBP e que estas são etapas necessárias na via para gerar o aumento na densidade dos espinhos dendríticos em resposta ao estradiol. Mostrando desta forma uma relação entre o aumento de AMPc e a síntese protéica, que levam à plasticidade destas regiões, e também a provável participação de outros elementos, como ativação de receptores NMDA, aumento intracelular das concentrações de cálcio e de PKA dependente de AMPc (fig. 10).

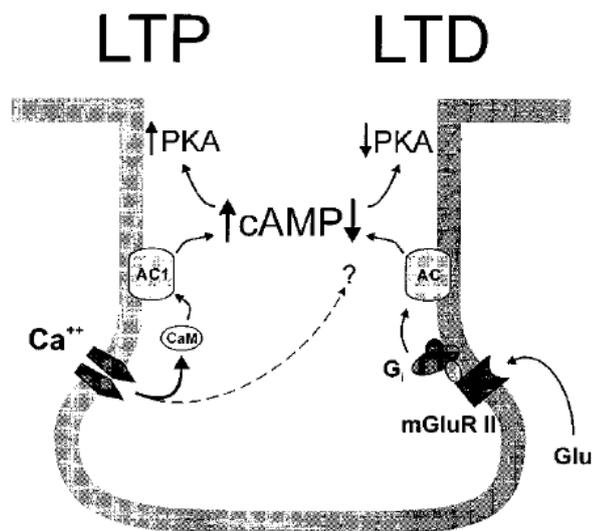


Fig.10. Esquema que ilustra como variações nos níveis de íons cálcio e de AMPc e conseqüentemente da atividade da PKA podem gerar modificações sinápticas de longa duração. (Tzounopoulos *et al.*,1998).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo geral estudar a influência da adenosina, um neuromodulador, e do segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) na reorganização sináptica natural do desenvolvimento do sistema visual de roedores.

Particularmente temos o interesse em investigar se variações na concentração extracelular de adenosina no cérebro são capazes de promover alterações topográficas na projeção retinotectal de roedores e ainda se os níveis de AMPC são regulados de acordo com o desenvolvimento destas conexões.

Para tal, foram estabelecidos como objetivos específicos:

- 1- Avaliar os níveis de AMPC no colículo superior de animais normais em diferentes idades;
- 2- Investigar a regulação *in vitro* dos níveis de AMPC por agonista de receptores purinérgicos presentes no colículo superior de animais em

3 MATERIAIS E MÉTODOS:

Neste trabalho utilizamos ratos pigmentados da linhagem Lister Hooded entre o dia pós-natal 0 e 70 (DPN 0, 14, 28, 42 e 70). Os animais foram divididos em grupos para a avaliação *in vivo* dos efeitos do acúmulo de adenosina endógena sobre o padrão de distribuição dos axônios retinotectais dentro e fora do período crítico do desenvolvimento (DPN14 e DPN28, respectivamente). Outros grupos de animais foram utilizados para avaliação *in vitro* dos níveis de AMPc em condições normais e sua modulação por agonista purinérgico e também da expressão de receptores purinérgicos A₁ e A_{2a} em animais submetidos aos tratamentos sistêmicos.

Os experimentos seguiram as normas para uso de animais de laboratório de acordo com as estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991).

3.1) TÉCNICAS BIOQUÍMICAS:

3.1.1) Dosagem de AMPc:

Dissecção do Colículo Superior: Os animais foram sacrificados por inalação com clorofórmio, decapitados e as camadas superficiais do colículo superior dissecadas com auxílio de um bisturi n^o 15. O tecido foi transferido para placa de petri sobre o gelo contendo um meio de cultura modificado Eagle (BME) suplementado com HEPES 20 mM. Utilizamos, para todos os experimentos, 2 colículos por mililitro de solução.

Estimulação e Extração do AMPc: As placas de petri contendo fatias de colículo superior foram transferidas do gelo para o banho-maria a 37°C e a reação bioquímica iniciada pela adição de RO201724 10 nM, um inibidor da enzima fosfodiesterase, responsável pela degradação de AMPc. Após incubação por 5 minutos, algumas placas foram tratadas com agonista purinérgico P1 não seletivo (NECA - 0,1 mM), e a reação prosseguiu por 15 minutos. Após este período a reação foi interrompida com a adição de 110µl ácido tricloroacético (TCA 50%) e as placas lavadas com 1,4 ml de TCA 5%, sendo estes conteúdos transferidos para tubos de centrífuga e congelados para posterior análise.

Recuperação do AMPc: Nesta etapa, as amostras receberam 50 µl de [³H]-AMPc (Sigma® - 20 nCi/50 µl), foram centrifugadas por 30 minutos a uma velocidade de 20.000 RPM em centrífuga de Sorval. O pellet foi ressuscitado em 500 µl de NaOH 1.0N para posterior dosagem de proteína. A fase aquosa das amostras foi utilizada para processamento em colunas de cromatografia de troca iônica previamente ativadas com ácido clorídrico (HCl - 1 N). Após eluição de 3 frações das amostras, 150 µl de cada uma delas foram transferidos para um filtro GFB, secos a 100°C por 30 minutos. A determinação do *input* foi feita através de contagem de uma amostra de 50 µl de [³H]-AMPc carreador (20 nCi/50 µl). Em seguida, os filtros secos foram colocados em *vials* contendo 5 ml de líquido de cintilação (composta de tolueno + 4 g PPO) para contagem por 1 minuto através da cintilografia líquida. Após análise do percentual de recuperação obtido nas colunas, a fração de eluição com maior contagem de radioatividade foi utilizada para a dosagem do AMPc.

Dosagem da Atividade da PKA: Nesta última etapa foi construída uma curva padrão com água MilliQ, tampão acetato 0,2 M pH 4,0, concentrações definidas de AMPc não-marcado (frio - 0, 1, 3, 5, 10 e 15 pmoles), [³H]- AMPc (quente - 3, 5, 7, 12 pmoles) e

proteína cinase A (PKA) adicionada de albumina de soro bovino (BSA). Paralelamente, a curva experimental foi realizada, utilizando os mesmos compostos e duas alíquotas de amostra no lugar do AMPc frio. Após a preparação dos tubos as amostras foram incubadas por 2 horas a 4° C em gelo. A reação foi interrompida com 2 mL de tampão fosfato 0,2M pH 6,0 a 4° C . Cada amostra foi filtrada em bomba de vácuo utilizando filtro Millipore. Os filtros foram secos por 10 minutos e transferidos para *vials* para contagem no cintilador.

Dosagem de Proteína: Todas as amostras tiveram a quantidade de proteína padronizada para que fosse feita a correção dos níveis de AMPc por miligrama de proteína. Utilizamos para tanto o método de Lowry que utiliza como padrão a albumina sérica bovina (Lowry, 1951).

Análise dos Resultados: A quantidade de AMPc no colículo superior foi avaliada, em cada idade, em pelo menos 3 experimentos realizados em duplicatas. Para a avaliação da modulação dos níveis de AMPc pela ativação não seletiva de receptores de adenosina os valores basais, em cada idade, foram normalizados (100%) e o resultado obtido em relação a este valor foi considerado (% do controle). Os resultados finais foram plotados em gráficos utilizando o programa Graphpad Prism 3.0 e submetidos à análise estatística utilizando o teste *t student* para avaliação do efeito do NECA sobre os níveis de AMPc nas diferentes idades e análise de variância (One-Way ANOVA) na ontogênese. Foram consideradas como significativas diferenças onde $p < 0,05$.

3.1.2) Western Blot:

Os animais utilizados para western blot foram previamente submetidos ao tratamento sistêmico com dipiridamol, um inibidor da recaptação de adenosina (50 mg/Kg), ou óleo de oliva puro (controle) durante 4 ou 8 dias e nestes foram avaliados os níveis dos receptores A₁ e A_{2a}.

Preparo das Amostras: Os animais foram sacrificados por inalação com clorofórmio, decapitados e as camadas superficiais do colículo superior dissecadas com auxílio de um bisturi N° 15, mantidas no gelo. O tecido foi transferido para um homogeneizador, macerado em 1 ml de tampão TRIS-HCl pH 7,4 50 mM, dentro do gelo. O macerado foi então centrifugado à 15000 rpm por 2 minutos a 4 °C e o pellet ressuscitado em 100 µl de tampão de amostra-SDS e levado a fervura por 5-8 minutos. As amostras foram conservadas congeladas no freezer à -70 °C. Utilizamos nestes experimentos 2 animais/amostra.

Dosagem de Proteína: As amostras tiveram a quantidade de proteína padronizada para que fosse aplicada a mesma quantidade em cada raia do gel de eletroforese. Utilizamos para dosagem de proteína o método de Bradford que utiliza como padrão a albumina sérica bovina (Bradford, 1976). Depois de dosadas, adicionamos as amostras, 10% do volume, de azul de bromofenol. As amostras foram congeladas à -70 °C, para posteriormente serem submetidas à eletroforese.

Eletroforese em Gel SDS/PAGE: Utilizamos 30 µg de proteína para correr no gel SDS/PAGE 10% para o receptor A₁ de adenosina, e 45 µg de proteína para correr no gel SDS/PAGE 10% para o receptor A_{2a}. A corrida se processa em torno de 2 h e 30 min com amperagem constante, a 20 mA. Após a corrida realizamos a transferência para uma membrana de PVDF. A transferência ocorre em 1h com voltagem fixada entre 45-60 V. Logo

após a transferência, realizamos o bloqueio da membrana com uma solução de bloqueio de TBS-T + 5% de leite em pó desnatado por duas horas. Em seguida a membrana foi lavada uma vez por 5 minutos com TBS-T e incubada com anticorpo primário anti-A₁ ou anti- A_{2a} policlonal de coelho overnight (diluição de 1:1000 ou 1:2500, respectivamente). No dia seguinte, a membrana foi lavada por 3 vezes de 10 minutos com TBS-T, incubada com anticorpo secundário específico na diluição de 1:5000 por 1 hora, lavada mais 2 vezes com TBS-T e uma vez com TBS e, só então, revelada com o reagente ECL após exposição em filme fotográfico. Realizamos também o controle de carregamento das proteínas no gel de eletroforese, utilizando a β -actina como proteína controle. Para isso, realizamos o *stripping* da membrana da qual obtínhamos resultados, para observarmos a expressão dessa proteína controle e para termos resultados quantificados de forma fidedigna. O *stripping* da membrana foi realizado da seguinte forma: após a membrana ter sido utilizada na revelação, ela era lavada com TBS e incubada com uma solução de glicina 0,2M pH 2,2 por 1h em agitação orbital. Em seguida, a membrana estava pronta para ser novamente bloqueada e, assim, dar início novamente ao protocolo do western blotting. Abaixo segue a tabela com os anticorpos utilizados.

Anticorpo	Origem	Fonte	Diluição
Anticorpos Primários			
Anti-A1	Coelho	Oncogene	1:1000
Anti-A2a	Coelho	Chemicon	1:2500
β -actina	Cabra	Santa Cruz	1:300
Anticorpos Secundários			
Anti-IgG goat	Burro	Santa Cruz	1:3000
Anti-IgG de coelho	Burro	Amersham Bioscience	1:5000

Tabela 1 – Relação de anticorpos utilizados, suas respectivas concentrações e fonte de obtenção. Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos em TBS-T+5% de leite em pó desnatado.

ANÁLISE DOS RESULTADOS: A quantificação dos resultados bioquímicos foi realizada após análise de densitometria óptica utilizando o programa Scion Image. Os dados foram plotados no programa Prism 3.0, onde confeccionávamos os gráficos e a análise estatística utilizando o teste-t ou o ANOVA-one way com pós-teste de Tukey. Foram consideradas como significativas diferenças onde $p < 0,05$.

3.2) TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS:

Estudamos o papel funcional da adenosina endógena na formação e manutenção topográfica do sistema retinotectal de ratos dentro e fora do período crítico. Esta avaliação foi realizada *in vivo* através da análise anatômica do padrão de conectividade desta via em animais submetidos ao tratamento sistêmico com drogas que aumentam a disponibilidade de adenosina e seus respectivos veículos.

3.2.1) Tratamento Sistêmico:

Os animais receberam injeções intraperitoneais diárias de EHNA (10 mg/kg - Sigma®), um inibidor da enzima adenosina deaminase que degrada a adenosina, diluída em solução salina ou solução salina pura para o grupo controle. Outros grupos receberam injeções intraperitoneais diárias de dipiridamol (10, 30 ou 50 mg/Kg - Sigma®), um inibidor do transportador de adenosina, diluído em óleo de oliva ou óleo de oliva puro para estabelecimento do grupo controle. Estabelecemos uma injeção com volume de 0,1 ml/10 gramas de animal, em seringas BD® de 1 ml. O protocolo experimental está demonstrado na tabela a seguir.

Tabela Experimental

Grupo	Droga (n)	Início	Duração (dias)	Inj HRP	Perfusão
DPN 14	EHNA (7)	DPN 10	4	DPN 13	DPN 14
	Veículo (2)				
DPN 14	Dip 10 mg/Kg (3)	DPN 10	4	DPN 13	DPN 14
	Dip 30mg/Kg (2)				
	Dip 50 mg/Kg (9)				
	Veículo (12)				
DPN 28	Dip 50 mg/Kg (11)	DPN 20	8	DPN 27	DPN 28
	Veículo (8)				

Tabela 2. Tabela experimental ilustrando os tratamentos aos quais foram submetidos os diferentes grupos de animais. DPN = dia pós-natal; EHNA = erythro - 9 - (2 - HYDROXY - 3 - NONYL) ADENINE; Dip = dipiridamol; Veículo = controle salina ou óleo de oliva. N total = 56.

3.2.2) Injeção intra-ocular de traçador

Injeções intraoculares no olho direito foram feitas com o objetivo de estudarmos o desenvolvimento do padrão topográfico das projeções retinotectais ipsilaterais em animais normais ou submetidos aos diferentes tratamentos sistêmicos (Fig 11). Após o período de tratamento adequado, ambos os grupos foram anestesiados com uma mistura de água destilada e éter (1:1) para serem submetidos à injeção intra-ocular do traçador neuroanatômico - peroxidase de raiz forte (HRP tipo IV - Sigma), conforme previamente descrito (Serfaty *et al.*, 1990). Resumidamente, foi realizada uma pequena incisão na região dorsal do limbo com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 5. Através desta incisão foi feita a injeção de 4 µl de solução HRP 30% em dimetilsulfóxido (DMSO 2%), utilizando uma micro-seringa Hamilton®. Em seguida, as pálpebras foram suturadas com gel de cianoacrilato, quando necessário (no grupo DPN10-14).

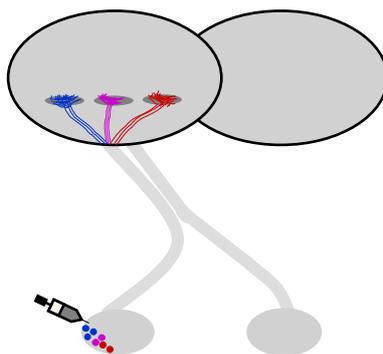


Fig 11. Desenho esquemático da via retinotectal do rato, ilustrando a injeção de HRP no olho direito para marcar a projeção retinotectal ipsilateral.

3.2.3) Perfusão e processamento histológico:

Após sobrevivência de 24 h, os animais receberam anestesia profunda com clorofórmio, e foram perfundidos através do coração com solução salina heparinizada (0,1%) por 10 minutos totalizando aproximadamente 30 ml e, posteriormente, solução fixadora de Karnowski (paraformaldeído 1% + glutaraldeído 2% diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) por 25 minutos (aproximadamente 70 ml). Imediatamente após a fixação, os cérebros foram removidos e transferidos para uma solução crioprotetora de sacarose 20% em tampão fosfato 0.1M pH7.4 onde foram mantidos durante pelo menos 24h. Após a crioproteção os cérebros foram congelados em gelo seco e cortes parasagittais de 40 µm foram obtidos no criostato. No lado contralateral à injeção intra-ocular foram recolhidos um para cada quatro cortes, enquanto no lado ipsilateral esta proporção era 1:1.

3.2.4) Histoquímica para Peroxidase:

Os cortes foram recolhidos em tampão fosfato 0.1M pH 7,4 e mantidos a 4°C por até 24h. Após esse período foram lavados com água milliQ e submetidos à reação histoquímica

de acordo com o protocolo de Mesulam (Mesulam, 1978). Os cortes contidos em cada cuba foram então incubados em uma solução final com 10ml de tampão acetato 0.1M pH 3,3, 185ml de água milliQ, 180mg de nitroprussiato de sódio e 10mg de tetrametilbenzidina dissolvidos em 2ml de álcool por 20 min. Após este período foram acrescentados 4 ml de H₂O₂ 3% (em água milliQ) por mais 20 minutos. A seguir os cortes foram lavados por 1h em 6 trocas de 10 min com uma solução de tampão acetato 0.5%, pH 3,3, e montados em lâminas previamente gelatinizadas. As mesmas foram então mantidas ao ar livre durante 24h. Após este período, as lâminas foram desidratadas em álcool absoluto durante 5 segundos, clarificadas em duas trocas de xilol por 5 minutos e montadas com lamínulas utilizando Entelan (Merck®) como meio de montagem.

3.2.5) Análise histoquímica:

As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico Axiophot usando iluminação de campo escuro. A marcação da peroxidase foi avaliada segundo alguns critérios estabelecidos anteriormente (Serfaty & Linden, 1994). Desta forma, foram considerados bons os animais com marcação contralateral densa e uniforme nas camadas superficiais do colículo superior e apresentando densa marcação ipsolateral de terminais e fibras na borda ventral do SGS e SO. A marcação ipsolateral normal madura se encontra especificamente na região ventral do SGS, restrita ao terço anterior do colículo superior. Assim, consideramos aberrante toda a projeção para regiões superficiais e/ou caudais das camadas visuais do colículo.

Após digitalização das imagens com uma câmera Sound Vision acoplada ao microscópio, foi feita uma análise quantitativa da área total do colículo superior ipsolateral à injeção assim como densidade óptica global desta estrutura dos animais controle e dipiridamol (10, 30 e 50 mg/Kg) através do programa Scion Image. As mensurações foram repetidas e

feita uma média das mesmas. Nos animais tratados com a dose de 50 mg/Kg de dipiridamol, além da mensuração já citada, o colículo superior foi separado em três regiões distintas no eixo médio-lateral (regiões medial, intermediária e lateral). Para cada uma destas regiões três cortes foram selecionados para análise da área e densidade óptica (escala aleatória de 0-255) em sua região anterior, média e posterior (Fig 12).

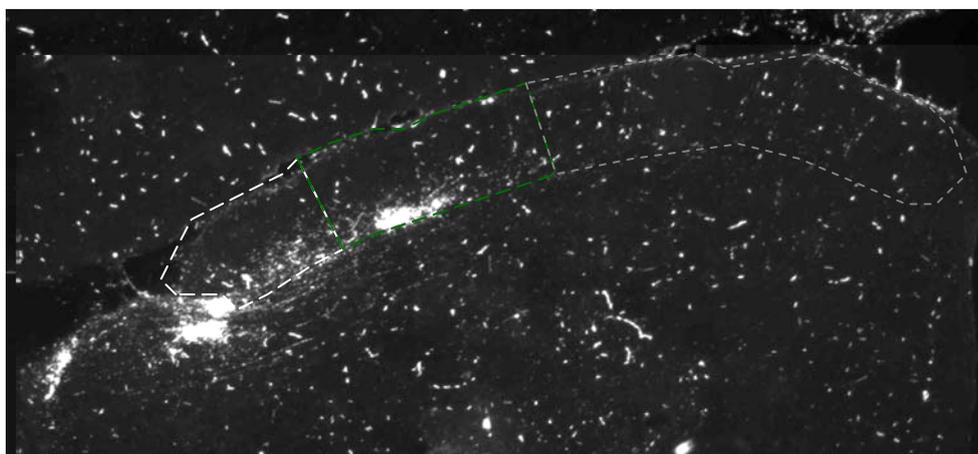


Fig 12: Fotomicrografia de campo escuro na plano parassagital das regiões do colículo superior analisadas. Região anterior (limitada em branco), média (em verde) e posterior (em cinza) .n total = 56.

4 RESULTADOS

4.1 Ontogênese do AMPc no Colículo Superior

Como descrito anteriormente, o AMPc vem sendo relacionado ao desenvolvimento e a plasticidade no sistema nervoso (Zufall *et al.*, 1997). Diversos trabalhos demonstraram que a via do AMPc está implicada no crescimento neurítico de neurônios do gânglio da raiz dorsal (Andersen *et al.*, 2000), no crescimento e orientação do nervo óptico durante a regeneração de peixe (Rodger *et al.*, 2005), na modulação da eficácia de sinapses glutamatérgicas no hipocampo (Lebmann & Heumann, 1997), na LTD e LTP hipocampal (Slack *et al.*, 1995; Tzounopoulos *et al.*, 1998) bem como na formação do mapa retinotópico no colículo superior de camundongos (Ravary *et al.*, 2003).

Desta forma, com o objetivo de correlacionar os níveis intracelulares de AMPc com o processo de maturação da via visual de ratos, utilizamos algumas idades que são marcos específicos do desenvolvimento das projeções retinotectais, como nascimento, abertura dos olhos, entre outras.

A Figura 13 ilustra os níveis basais de AMPc nas diferentes idades mencionadas. Nossos resultados mostram que os níveis de AMPc são baixos no início do período pós-natal, aumentam, atingindo seu valor máximo na etapa próxima a abertura dos olhos, por volta do décimo quarto dia pós-natal, e se mantêm elevados entre a quarta e sexta semana pós-natal (DPN28 e DPN42), retornando a níveis próximos daqueles encontrados em DPN0 quando o animal atinge a idade adulta (DPN70). Estes dados sugerem não apenas uma correlação entre os níveis deste segundo mensageiro e a estabilização seletiva das sinapses retinotectais, mas também que o AMPc seja regulado pela atividade elétrica evocada.

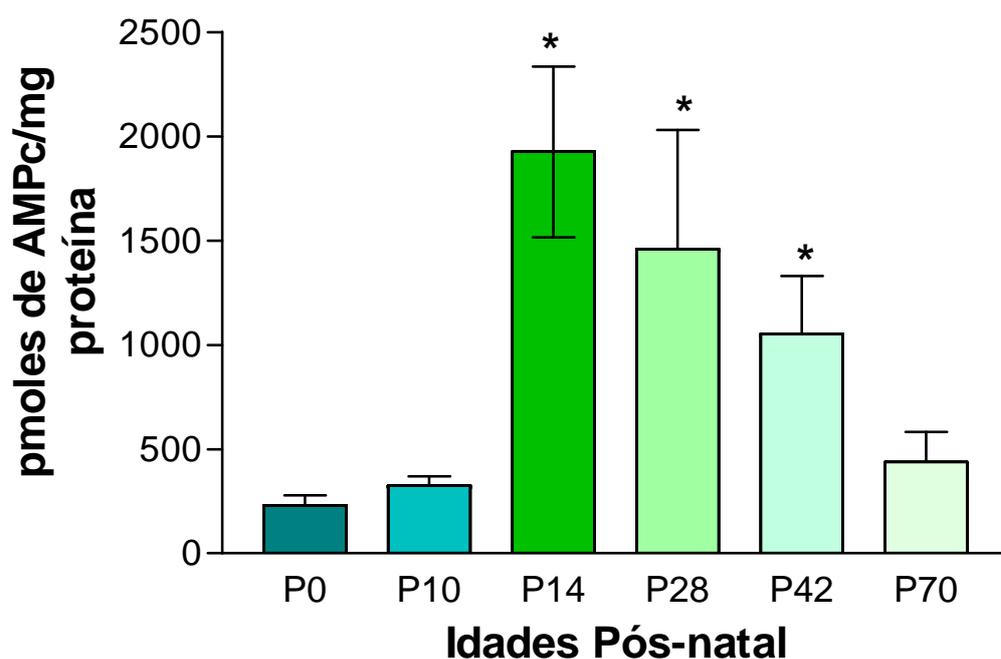


Figura 13: Ontogênese dos níveis basais de AMPc no colículo superior de ratos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Os níveis de AMPc são modulados por diferentes neurotransmissores e neuromoduladores presentes no colículo superior, dentre eles a adenosina (Kessey & Mogul, 1998). Assim, a nossa próxima etapa foi avaliar se a atividade de receptores purinérgicos P1 é capaz de modular os níveis de AMPc *in vitro*. Para tanto estimulamos o colículo com um agonista não-seletivo dos receptores de adenosina (NECA) nestas diferentes idades.

Os valores basais de AMPc encontrados nas diferentes idades foram normalizados e a sua modulação apresentada em relação a estes valores (% do controle). Nossos resultados mostram que a aplicação de NECA foi capaz de produzir aumento dos níveis de AMPc em DPN42. Entretanto, efeito semelhante não foi observado em DPN14 (figura 14). Em conjunto estes resultados indicam um possível mecanismo regulatório da síntese do AMPc em determinadas etapas do desenvolvimento retinocolicular.

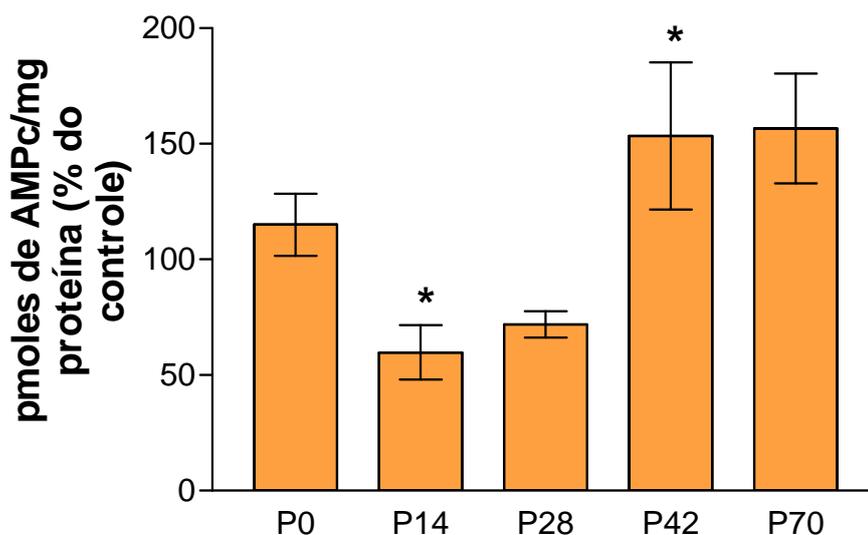


Figura 14: Efeito do NECA sobre o acúmulo de AMPc em relação aos níveis basais no colículo superior de roedores em diferentes idades. Observa-se uma diminuição deste em PND14 e um aumento em PND42.* para $p < 0,05$.

4.2 - Papel da adenosina na formação das projeções retinotectais

Durante o desenvolvimento normal, os axônios dos dois olhos estão expandidos sobre os núcleos visuais subcorticais durante a primeira semana pós-natal. Após este período, passam a ocupar a região apropriada dos seus alvos e ficam com o padrão anatômico característico do animal adulto onde a projeção contralateral está distribuída por todas as camadas visuais do colículo superior e a ipsilateral preferencialmente nas camadas profundas no terço anterior do SGS (Land & Lund, 1979; Jeffery *et al.*, 1984; Serfaty & Linden, 1994). Com o objetivo de avaliarmos o papel da adenosina através do acúmulo de adenosina endógena na formação de especificidade sináptica da via retinotectal, um grupo de animais recebeu tratamento sistêmico com 10 mg/Kg de EHNA, um inibidor da enzima adenosina deaminase ou salina (veículo) intraperitoneal durante 4 dias dentro do período crítico (entre DPN10–13) A marcação contralateral foi avaliada como um dos critérios de qualidade de marcação. Em ambos os grupos, observamos uma marcação de forma densa e uniforme nos

diversos eixos de orientação do colículo superior (fig. 15). Desta forma, podemos afirmar que o padrão de marcação ipsilateral pode ser comparado diretamente entre os grupos já que o transporte anterógrado de marcador e a reação histoquímica funcionaram de forma homogênea nos dois grupos.

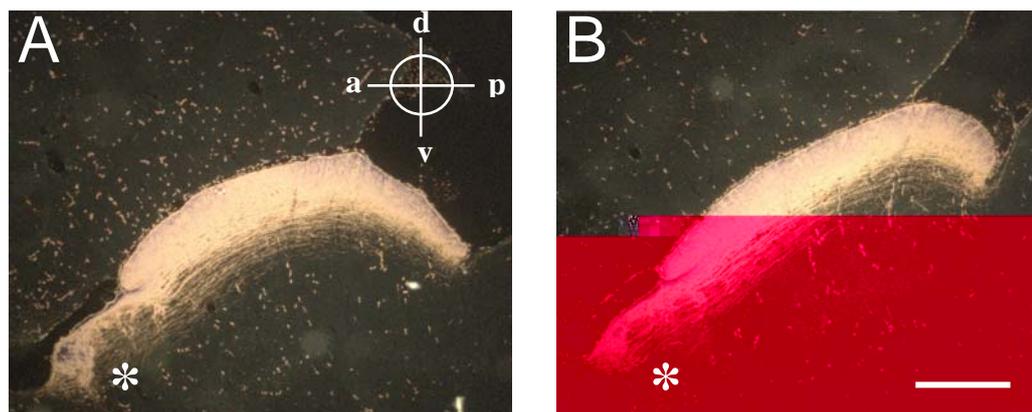


Figura 15: Fotomicrografias de campo escuro de cortes parasagittais do colículo superior contralateral à injeção do traçador peroxidase (HRP), com aumento de 40X. A: Animal submetido ao tratamento com salina (controle); B: Animal tratado com EHNA (10 mg/kg ip.). Asteriscos indicam a região do pré-tecto; v: ventral; d: dorsal; a: anterior; p: posterior. A barra representa 500 μ m.

O aspecto laminar e o padrão topográfico da projeção retinotectal ipsilateral foram observados em cortes parasagittais do colículo superior dispostos em posições semelhantes (cortes mediais, intermediários ou laterais) nos diferentes grupos experimentais (salina ou EHNA). Em DPN14, o padrão laminar e topográfico da projeção retinotectal já é semelhante ao de um animal maduro, onde a projeção ipsilateral está restrita a regiões profundas das camadas visuais, formando aglomerados de marcação histoquímica bem delimitados no terço anterior do colículo superior, por toda extensão médio-lateral, localizando-se no limite ventral do SGS e com pouca marcação na superfície (Serfaty & Linden, 1994). Os animais submetidos ao tratamento sistêmico com salina apresentaram a marcação ipsilateral típica de um animal normal, nesta etapa (Fig 16A e C). No entanto, os animais tratados com EHNA por 4 dias apresentaram um padrão mais desorganizado no CS. Nestes animais, observamos uma maior densidade de fibras em regiões posteriores, e um maior espalhamento dos aglomerados

de marcação na região ventral do terço anterior. Em alguns casos também notamos um aumento na quantidade de fibras em direção a camadas visuais mais superficiais do colículo superior (Fig 16B e D). A figura 17 ilustra a análise quantitativa destes resultados onde é possível notar que na maioria das regiões avaliadas a densidade óptica de marcação ipsolateral é significativamente maior nos animais tratados com EHNA em comparação aos animais veículo. Em conjunto estes dados demonstram que o acúmulo de adenosina endógena induzido pelo tratamento sistêmico com EHNA dentro do período crítico é capaz de promover uma alteração topográfica dos axônios retinianos no colículo superior sugerindo que a adenosina participe como importante neuromodulador no desenvolvimento da circuitaria retinotectal.

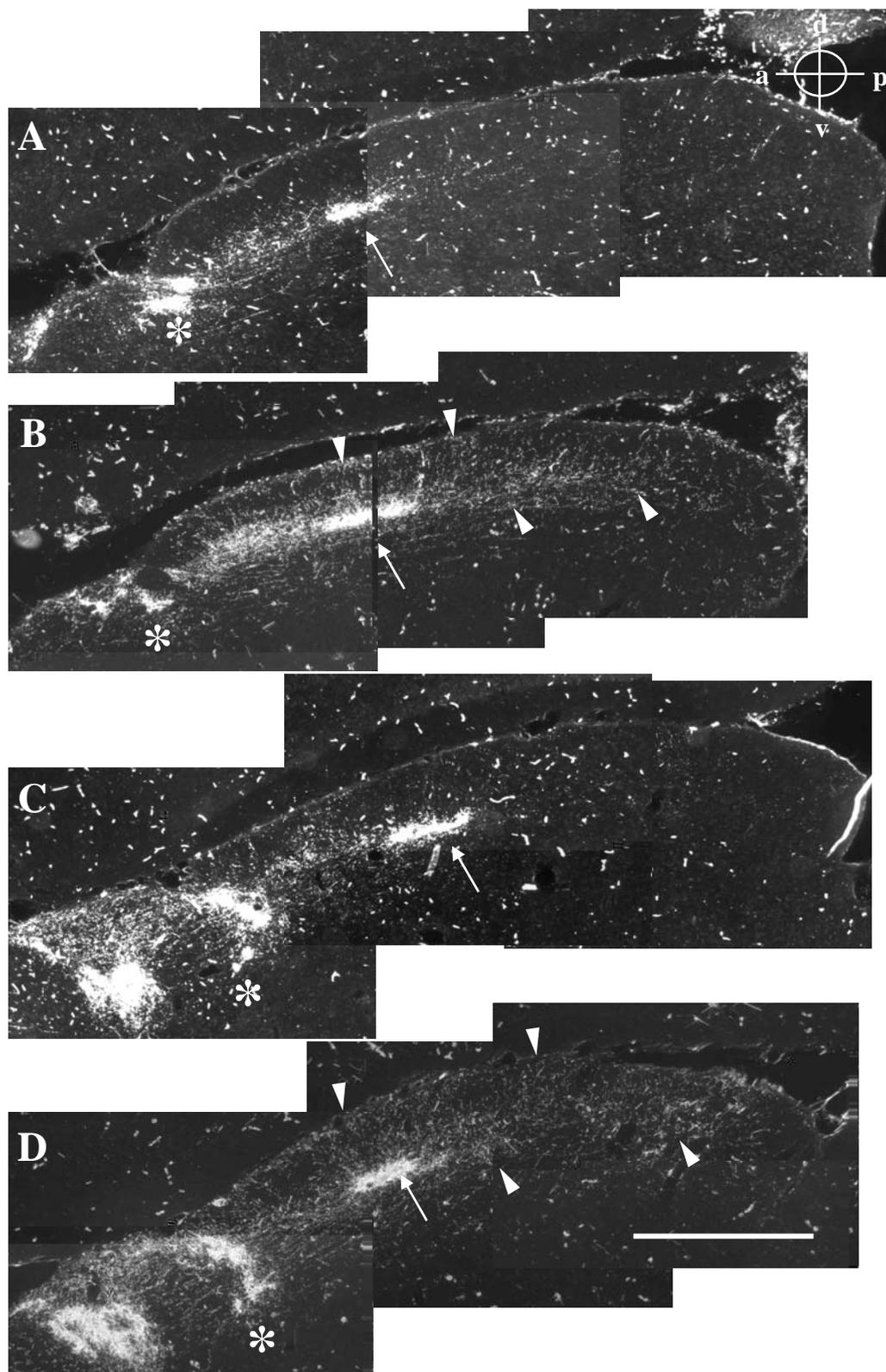


Figura 16: Fotomontagens de campo escuro de cortes parassagitais do colículo superior ipsilateral ao olho injetado com peroxidase (HRP), em aumento de 100X. (A e C): cortes medial e lateral, respectivamente do animal controle; (B e D): cortes medial e lateral do animal tratado com EHNA. Os asteriscos localizam o pre-tectum, setas brancas indicam os aglomerados de marcação ipsilateral, ou “clusters” e cabeças de seta indicam marcações aberrantes para regiões anômalas do CS. v: ventral; d: dorsal; a: anterior; p: posterior. A barra representa 500 μ m.

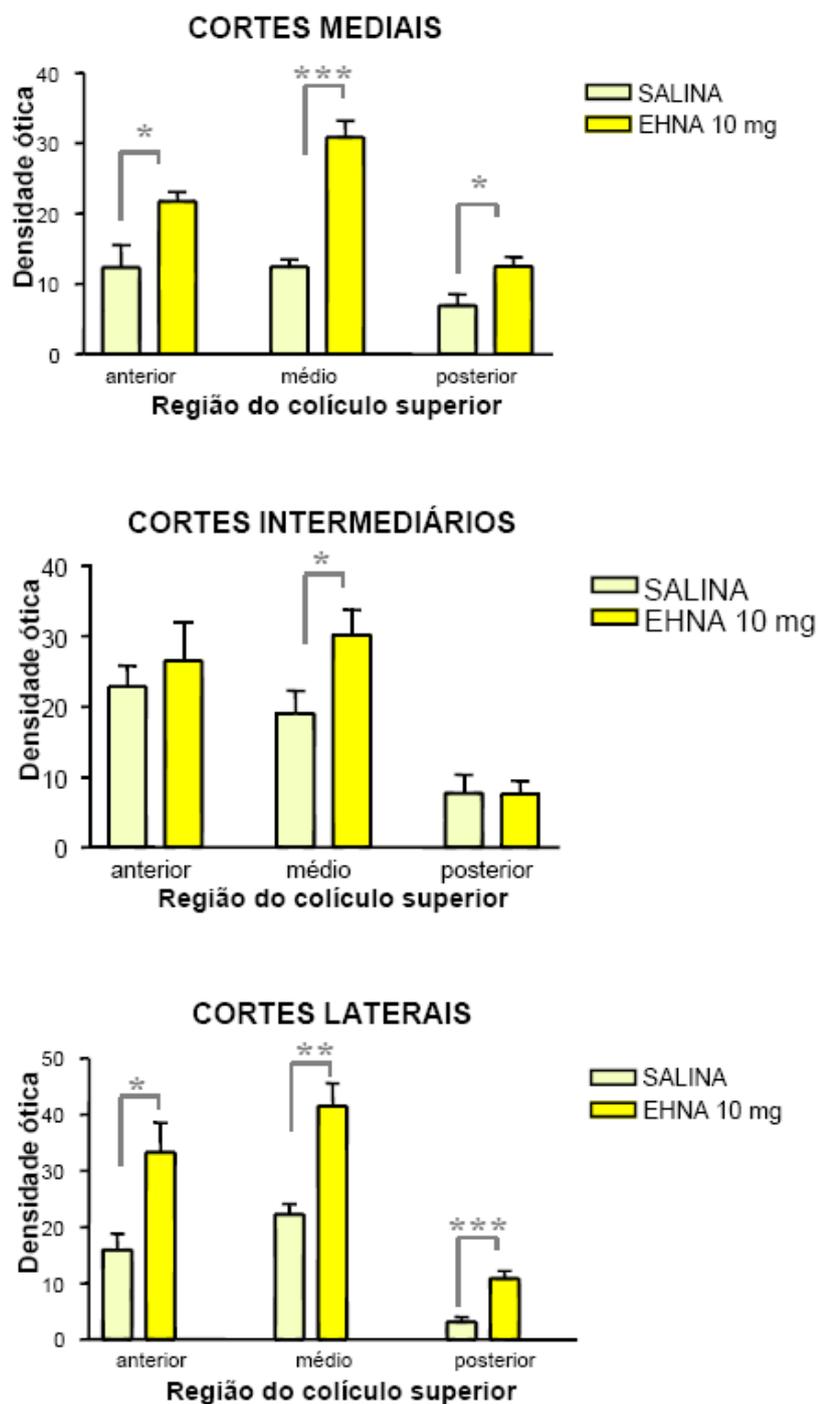
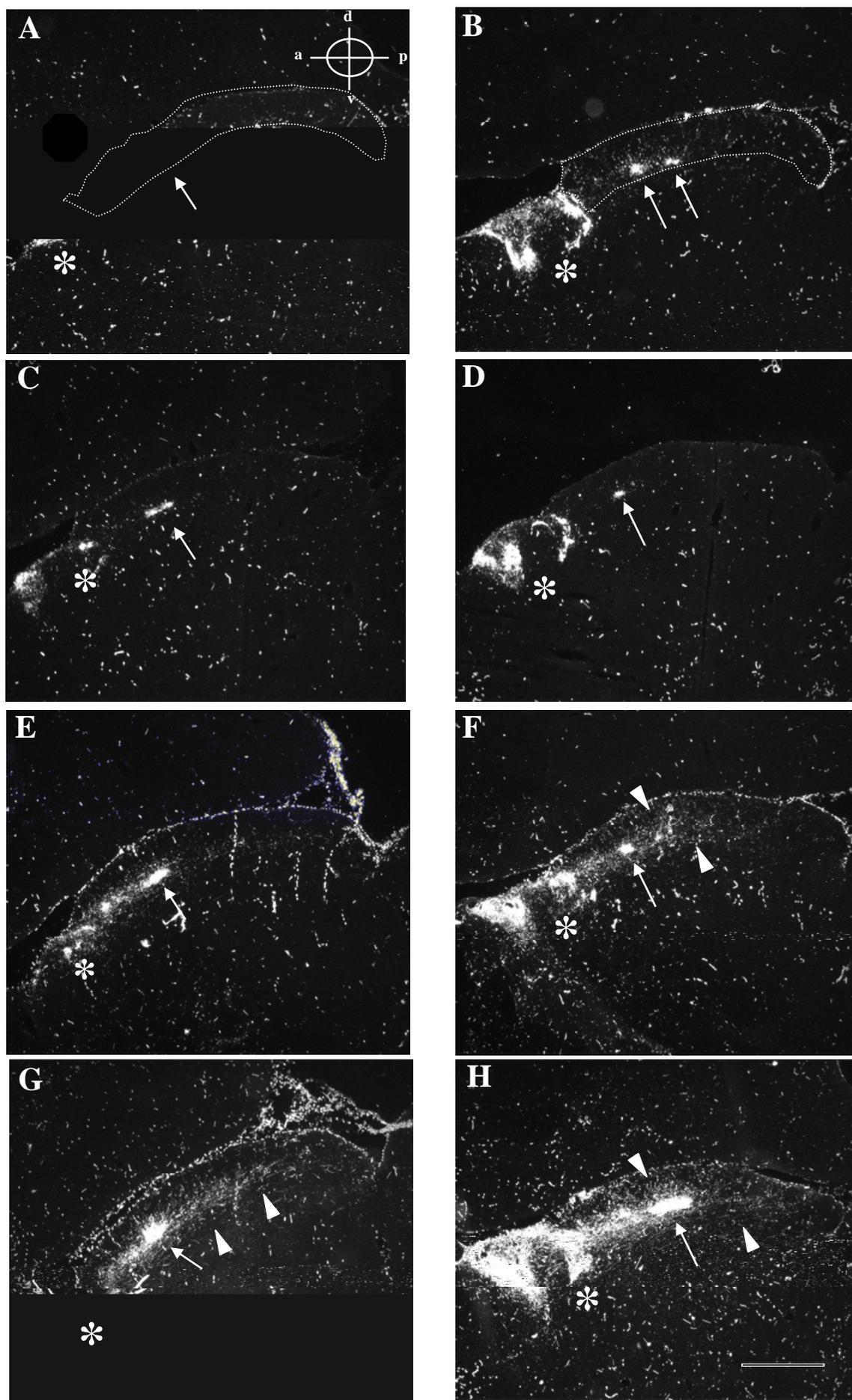


Figura 17: Quantificação da densidade óptica das regiões anterior, média e posterior de cortes mediais, inermidiários e laterais, respectivamente. * para $p < 0,5$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Com o objetivo de nos certificarmos do efeito da adenosina sobre a formação do mapa topográfico retinotectal, buscamos utilizar outra droga que também é capaz de induzir acúmulo deste nucleosídeo. O dipiridamol é usado clinicamente para elevar os níveis extracelulares de adenosina já que inibe os seus transportadores (Thorn & Jarvis, 1996). Desta forma, iniciamos a próxima etapa que foi avaliar o efeito dose-resposta do tratamento com 10, 30 e 50 mg/Kg de dipiridamol intraperitoneal sobre o desenvolvimento topográfico retinotectal. A figura 18 ilustra cortes parassagitais de animais submetidos ao tratamento sistêmico com óleo de oliva (veículo) ou dipiridamol nas diferentes concentrações. É possível observar, tanto em cortes mediais (A, C, E e G) quanto em cortes laterais (B, D, F e H) que os tratamentos com doses crescentes de dipiridamol geram uma maior dispersão da marcação retinotectal ipsolateral para regiões anômalas do colículo, alterando assim as densidades ópticas nos diferentes tratamentos. Esta análise quantitativa indica uma tendência a aumento de densidade óptica global nas regiões lateral e medial do colículo (Fig 19). A figura 20 ilustra em maior aumento o efeito da concentração de 50 mg/Kg de dipiridamol na expansão das projeções ipsolaterais para regiões posteriores do colículo superior. Como este efeito dose-dependente foi sugerido após análise da densidade óptica global, análises semelhantes foram realizadas nas regiões anterior, média e posterior em cortes mediais, intermediários e laterais (esquema Fig 12 e Fig 21) dos animais tratados com dipiridamol 50mg/Kg. Em conjunto estes resultados sugerem que o dipiridamol exerça um efeito dose-dependente sobre o desenvolvimento da via visual sub-cortical e ainda confirma o papel da adenosina endógena na formação do mapa retinotópico.



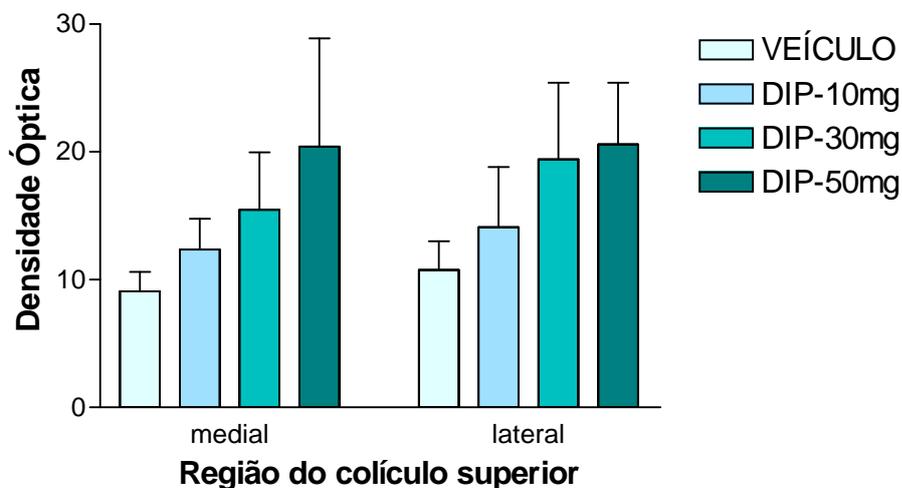


Figura 19: Quantificação da densidade óptica global das regiões medial e lateral do colículo superior de animais tratados com veículo ou com dipiridamol nas doses de 10, 30 e 50 mg/Kg. Notar que em ambas as regiões ocorre uma tendência dose-dependente para aumento de densidade nos animais tratados com dipiridamol entre DPN10 e 13.

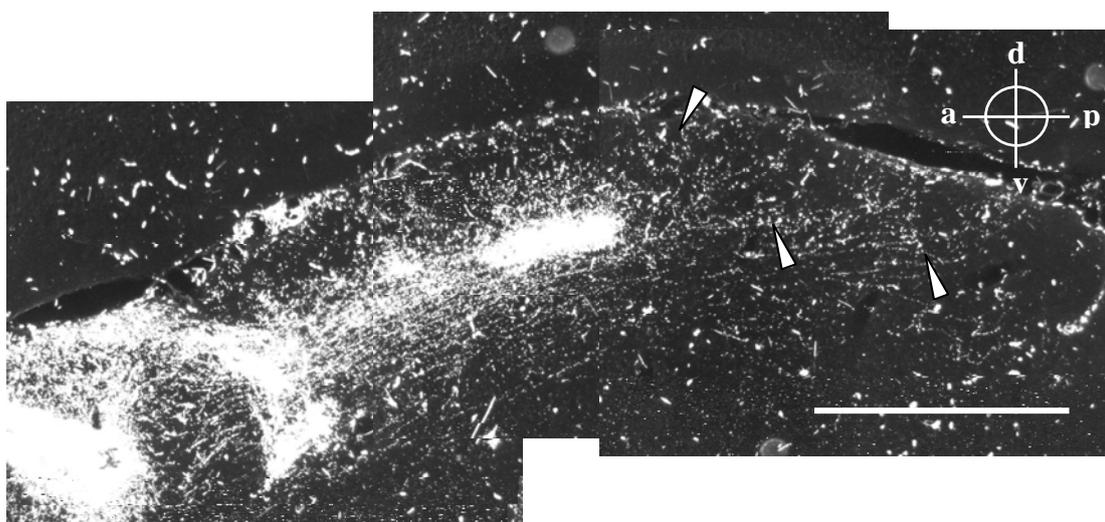


Figura 20: Fotomontagem de campo escuro de corte parassagital do colículo superior ipsilateral ao olho injetado com peroxidase (HRP) do animal tratado com dipiridamol 50mg/Kg, em aumento de 100X. O asterisco localiza o pré-tecto, a seta branca indica o aglomerado de marcação ipsilateral, ou “cluster” e cabeças de seta indicam marcações aberrantes para regiões anômalas do CS. v: ventral; d: dorsal; a: anterior; p: posterior. A barra representa 500 μ m.

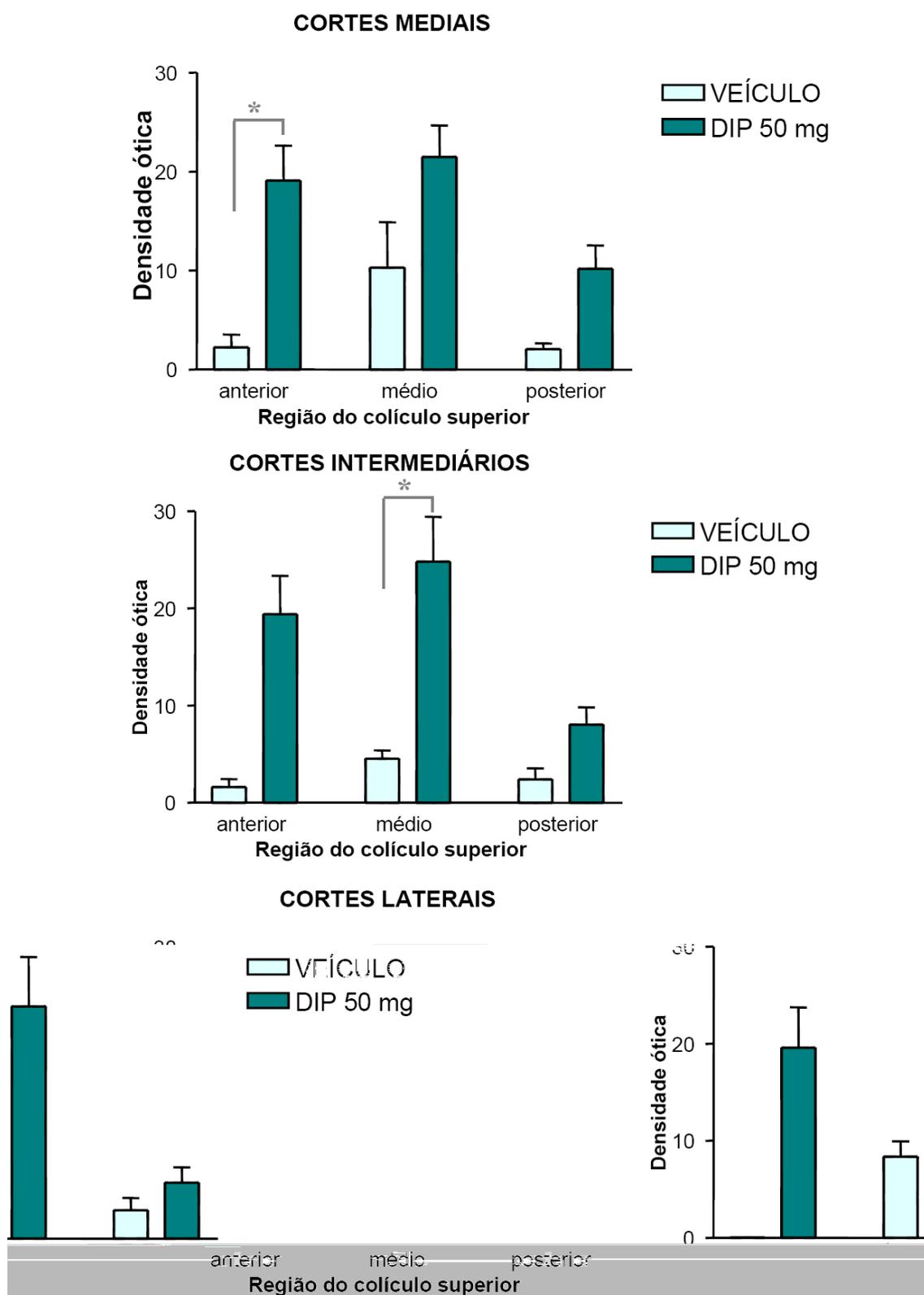
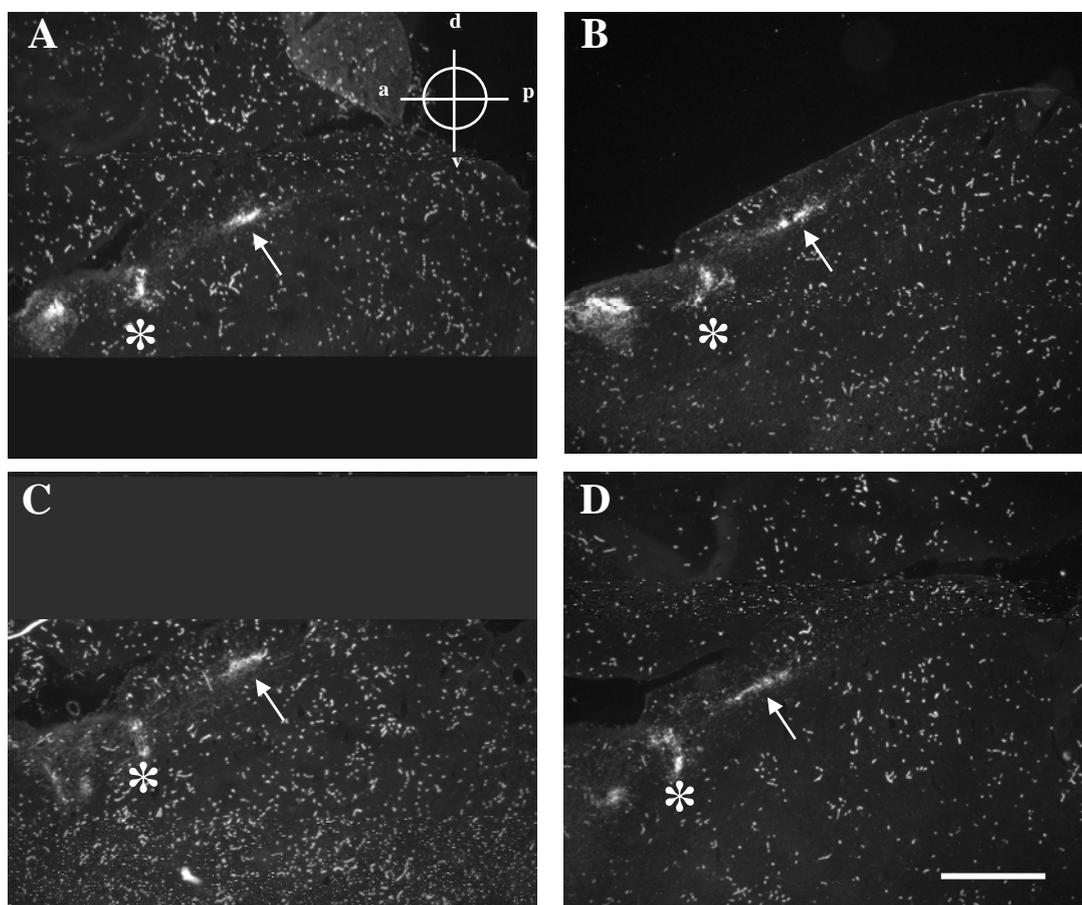


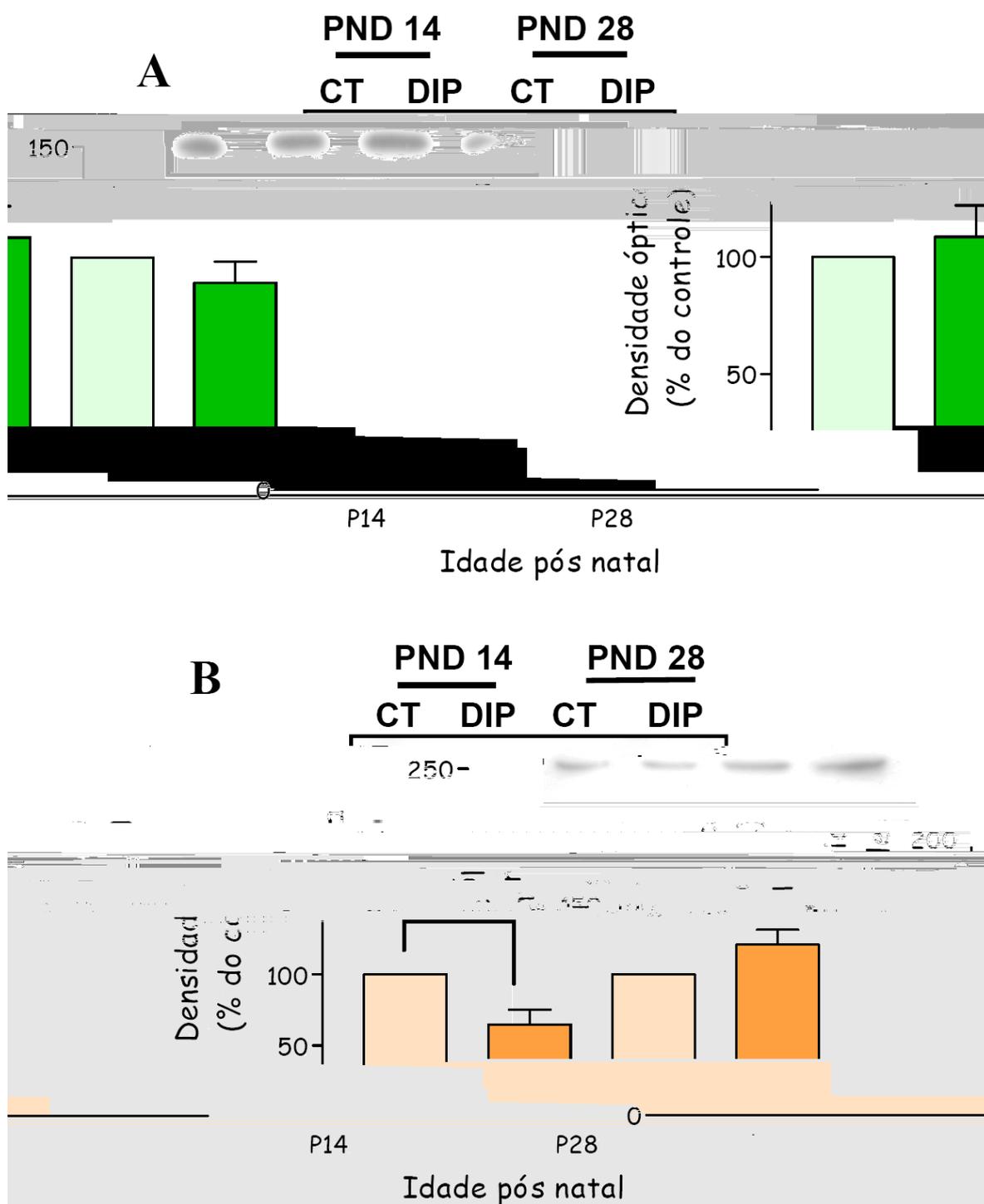
Figura 21: Quantificação da densidade óptica das regiões anterior, média e posterior de cortes mediais, intermediários e laterais, respectivamente. * para $p < 0,5$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Trabalhos anteriores do nosso grupo e de outros têm demonstrado que é possível induzir reorganização em animais adultos que apresentam conexões estabilizadas (Bastos *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2003; Tropea *et al.*, 2003; Kreutz *et al.*, 2004; Serfaty *et al.*, 2005; Campello-Costa *et al.*, 2006;). Desta forma, resolvemos investigar se o tratamento com dipiridamol 50 mg/kg intraperitoneal poderia induzir modificações na conectividade retinotectal após o período crítico do desenvolvimento. Para responder a esta questão, nós analisamos a projeção retinotectal de animais DPN28 que receberam injeções intraperitoneais com veículo ou dipiridamol durante 8 dias. Após o tratamento com veículo entre DPN20 - 27, a projeção retinotectal apresentou um padrão anatômico maduro característico do adulto, onde a via ipsilateral já sofreu completa restrição e apresenta aglomerados de marcação bem delimitados nas regiões anterior e ventral do SGS, com poucas fibras na superfície e ao redor destes aglomerados (Fig 22A e C). Animais tratados com 50 mg/kg de dipiridamol entre DPN20 e DPN 27, exibiram um padrão de marcação normal, semelhante ao controle por toda a extensão do colículo superior (Fig 22B e D).



4.3 – Expressão dos Receptores Purinérgicos A₁ e A_{2a} no Colículo de Animais Tratados com Dipiridamol:

Trabalhos recentes do laboratório indicam que no colículo superior a expressão de receptores de adenosina é variável ao longo do desenvolvimento pós-natal de ratos de tal forma que o receptor A₁ é mais expresso em etapas precoces (até DPN14) e o receptor A_{2a} em etapas mais tardias do desenvolvimento (a partir de DPN21) (Tavares Gomes *et al.*, FESBE 2005). Além disso, nosso grupo demonstrou ainda que a expressão de ambos os receptores pode ser modulada por enucleação monocular dentro e fora do período crítico (Tavares Gomes *et al.*, FESBE 2006). Como nossos dados sugerem que o acúmulo de adenosina endógena leva a modificações plásticas dentro, mas não fora do período crítico, resolvemos avaliar se o tratamento crônico com dipiridamol (50 mg/Kg ip.) induz modificações na expressão destes receptores no colículo superior. A Figura 23A demonstra que o tratamento com dipiridamol por quatro dias, dentro do período crítico, não produziu nenhuma alteração nos níveis de receptores A₁, mas induziu uma diminuição significativa na expressão de receptores A_{2a} (23B), em relação aos animais que receberam injeção de veículo. No entanto, o tratamento com dipiridamol com 8 dias após o período crítico não causou alteração na expressão dos receptores A₁, assim como de receptores A_{2a}(Fig 23A e B).



de **Figura 23**: Efeito do tratamento sistêmico com dipiridamol 50mg/Kg sobre a expressão de receptores A1 (A) e A2a (B) dentro e fora do período crítico. * para $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos a influência da adenosina e do AMPc na reorganização sináptica natural do desenvolvimento do sistema visual de roedores. Para tanto utilizamos técnicas bioquímicas e histoquímicas para avaliar a ontogênese do AMPc e sua regulação pela ativação purinérgica em diferentes etapas do desenvolvimento e ainda se variações na concentração extracelular de adenosina no cérebro são capazes de promover alterações topográficas na projeção retinotectal de roedores dentro e fora do período crítico de desenvolvimento destas conexões.

Assim, a primeira idade escolhida foi o dia do nascimento (DPN0) para representar a etapa mais imatura, que conseguimos acessar, de conectividade desta via. Além disso, o animal do DPN10 foi utilizado já que observamos uma projeção tipicamente parecida com a de um animal maduro, no entanto, com intensa capacidade de reorganização frente a modificações do ambiente (Serfaty *et al.*, 2005). Animais em DPN14 foram utilizados já que é nesta fase que se inicia a atividade elétrica evocada pela abertura dos olhos (Itaya *et al.*, 1995). O animal em DPN28 se trata de um jovem que apresenta um grau de plasticidade maior que os adultos (Campello-Costa, 2000). A maturidade sexual ocorre próximo a DPN42, quando são considerados adultos. Além destas, fomos avaliar os níveis de AMPc numa fase adulta mais tardia (DPN70), quando apresentam projeções ainda mais estabilizadas.

Os resultados apresentados mostram que os níveis basais de AMPc no colículo superior são baixos em etapas precoces do desenvolvimento e aumentam no período próximo a abertura dos olhos, se mantém elevados durante o período de maior estabilidade sináptica, decaindo apenas no animal adulto; observamos ainda que este mensageiro é regulado diferencialmente por receptores purinérgicos nas diferentes etapas estudadas. Além disso, este

trabalho demonstra ainda que o acúmulo de adenosina endógena é capaz de induzir uma reorganização das projeções retinotectais ipsolaterais apenas durante o período crítico do desenvolvimento e que o tratamento sistêmico com dipiridamol promove, apenas nos animais da segunda semana do desenvolvimento, uma diminuição da expressão de receptores A_{2a} , sem contudo alterar a expressão do receptor A_1 . Nos animais da terceira/quarta semana não observamos nem alteração da expressão dos receptores purinérgicos avaliados nem alterações de topografia. Em conjunto nossos dados apontam para um papel da adenosina na especificidade sináptica responsável pela formação do mapa topográfico retinotectal. Além disso, estes dados sugerem ainda que o AMPc esteja participando deste processo e que alterações plásticas nesta via envolvam, em parte, modificações na expressão dos receptores purinérgicos.

5.1 Ontogênese do AMPc

Desta forma, fomos avaliar se os níveis de AMPc no colículo superior são compatíveis com um papel no refinamento topográfico das sinapses retinotectais. Nossos resultados bioquímicos demonstram que os níveis basais de AMPc são baixos no início do desenvolvimento pós-natal (DPN0), aumentando significativamente no período que coincide com o início da atividade elétrica evocada e se mantêm elevados entre a terceira e sexta semana pós-natal. Nos animais adultos estes níveis voltam a diminuir, retornando aos valores encontrados no animal neonato (fig.13). Estes dados estão de acordo com um papel do AMPc na estabilização das sinapses retinotectais já que os maiores níveis são observados em uma fase de grande estabilidade do desenvolvimento (entre a segunda e a sexta semana pós-natal). Por outro lado, no animal adulto os níveis de AMPc e o grau de estabilidade sináptica se dissociam já que estes animais apresentam pouco AMPc apesar de ser a etapa de maior estabilidade sináptica.

A sinalização por AMPc medeia os efeitos de um número variado de moléculas tróficas e de orientação axonal. *In vitro*, o AMPc regula a sobrevivência de células ganglionares da retina (RGCs) e de motoneurônios espinhais (Meyer-Franke *et al.*, 1995, 1998) e modifica o crescimento axonal em respostas a moléculas de orientação como as efrinas (Rodger *et al.*, 2005). Recentemente foi demonstrado que a enzima adenilil ciclase 1 (uma das dez isoformas encontradas no SNC que é responsável pela síntese do AMPc a partir do ATP), é importante para induzir a retração de axônios transitórios dependente do gradiente de efrinas no sistema retinotectal (Ravary *et al.*, 2003; Nicol *et al.*, 2006) e para o refinamento que leva a formação do mapa retinotópico em camundongos (Plas *et al.*, 2004). Além disso, o AMPc está implicado em alterações na transmissão sináptica dependente de atividade elétrica (Huang *et al.*, 1994; Weisskopf *et al.*, 1994). Vários trabalhos já demonstraram que o AMPc está envolvido na geração de atividade elétrica espontânea na retina e na segregação dependente de atividade elétrica dos aferentes retinianos ipso e contralaterais no núcleo

geniculado lateral do tálamo (dLGN) (Stellwagen *et al.*, 1999; Stellwagen and Shatz, 2002). Além disso, o AMPc aumenta a eficácia de sinapses glutamatérgicas no hipocampo (Lebmann & Heumann, 1997) e no colículo superior (Ishikava *et al.*, 1997; Kessey & Mogul, 1998).

Nossos resultados confirmam esta idéia já que observamos que o aumento nos níveis basais de AMPc no colículo superior se dá na etapa que segue a abertura dos olhos e portanto do início da atividade elétrica evocada. Este período é crucial para o perfeito desenvolvimento da circuitaria retinotectal e além do AMPc, outras alterações moleculares têm sido descritas. Dentre as mais estudadas estão os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e NMDA já que são essenciais para a detecção do padrão temporal de atividade elétrica evocada e conseqüentemente para estabilização de sinapses co-ativas (Cline *et al.*, 1987; Kleindschmidt & Singer, 1987; Simon *et al.*, 1992; Constantine-Paton *et al.*, 1990; Debski *et al.*, 1995). Estudos que reforçam esta hipótese demonstraram que a duração das correntes iônicas via NMDAr é maior no colículo superior e córtex de ratos neonatos e decai em adultos, sugerindo a presença de subunidades específicas que conferem propriedades distintas (Carmignoto & Vicini, 1992). Hofer e colaboradores demonstraram através de técnicas de hibridização e análise de mRNA (northern blot) que ocorre um aumento na expressão gênica de uma subunidade do NMDAr no período em que ocorre o completo refinamento das projeções retino e cortico-tectais do rato. Isto indica que o NMDAr com uma subunidade diferente tem uma importância em fases tardias do desenvolvimento (Hofer *et al.*, 1994). Mais recentemente foi demonstrado que ocorre troca de subunidades NR2B para NR2A do receptor NMDA bem como da proteína PSD-95 associada a estes receptores no período que se segue à abertura dos olhos (Townsend *et al.*, 2003; Yoshii *et al.*, 2003) e um aumento nas correntes induzidas por receptores AMPA 12 h após a abertura dos olhos (Lu & Constantine-Paton, 2004).

Estes eventos de modificações na expressão de subunidades e atividade de receptores glutamatérgicos e nos níveis basais de AMPc após abertura dos olhos podem ou não estar associados. Trabalhos da literatura indicam que a via do AMPc possa ser desencadeada não apenas pela atividade de receptores metabotrópicos, acoplados a proteínas G, mas também de receptores ionotrópicos que permeiam cálcio, como o NMDAr já que existem isoformas de adenilil ciclase dependentes de cálcio, como adenilil ciclase tipo 1, presente no colículo superior e importante para o refinamento retinotectal (Chern, 2000; Ravary *et al.*, 2003; Plas *et al.*, 2004; Nicol *et al.*, 2006). Além disso, a adenilil ciclase pode ser regulada por fosforilação induzida por diferentes proteínas cinases, tais como PKA (dependente de AMPc – feedback negativo), PKC (dependente de Ca^{+2}) e CaMK II (dependentes de cálcio-calmodulina) além da fosfatase 2A (PP2A), todas estas podem estar acopladas a ativação de NMDA (Chern, 2000; Waltereit & Weller, 2003; Miyamoto, 2006). Por outro lado, os níveis elevados de AMPc podem ativar vias de transdução que alteram não só a atividade mas também a expressão dos receptores glutamatérgicos. O receptor NMDA devido a sua grande importância para o sistema nervoso central possui diferentes sítios de regulação, incluindo sítio de fosforilação para PKA, principal alvo do AMPc. Além disso o AMPc pode diretamente alterar a função de canais iônicos ou desencadear, através de PKA e CREB, a ativação de transcrição gênica que pode levar a aumento da expressão de receptores AMPA, por exemplo (Miyamoto, 2006).

Após este período de abertura dos olhos, nossos resultados apontam para uma diminuição significativa nos níveis de AMPc nos animais adultos. Este fato vai, a princípio, contra nossa hipótese de que este segundo mensageiro participe da estabilização das sinapses retinotectais. No entanto, trabalhos da literatura já demonstraram que o AMPc é importante apenas para fase de indução e manutenção da fase precoce da potenciação de longa duração (eLTP) e que a fase tardia (l-LTP) depende de fosforilação e síntese protéica, e não mais de

AMPC (Schulman *et al.*, 1995; Nguyen & Kandel, 1996; Murphy *et al.*, 1997; Johnson & Ouimet, 2004). Além disso, é possível que outros mecanismos estejam relacionados à estabilidade sináptica nas diferentes idades estudadas. De fato, dados do nosso laboratório indicam a participação do neurotransmissor serotonina (Bastos *et al.*, 1999) e do mensageiro retrógrado óxido nítrico (Campello-Costa *et al.*, 2000) na formação do mapa retinotópico preciso no colículo superior de ratos e do ácido araquidônico na manutenção destas projeções a partir da sexta semana pós-natal (Campello-Costa *et al.*, 2006). Estes resultados em conjunto confirmam a existência de múltiplos mecanismos envolvidos com a especificação sináptica no colículo superior nos diferentes períodos do desenvolvimento retinotectal.

Adicionalmente, vale ressaltar que nós avaliamos, ao longo do desenvolvimento do colículo superior, os níveis globais de AMPC e que fisiologicamente, o AMPC é regulado pela ativação das enzimas adenilil ciclase (síntese) e fosfodiesterase (degradação). Como mencionado anteriormente, a ciclase é controlada a princípio, por receptores acoplados a proteína G (Gs – estimulatória e Gi – inibitória, por exemplo). Dentre os receptores acoplados a adenilil ciclase no colículo podemos destacar: receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), receptores serotoninérgicos (5-HT1A e 1B), receptores dopaminérgicos (Sajani *et al.*, 1997; Sanudo-Pena *et al.*, 2000) e receptores purinérgicos de adenosina (A₁ e A_{2a}) (Ishikawa *et al.*, 1997; Kessey & Mogul, 1998). A inervação serotoninérgica no colículo superior, por exemplo, se desenvolve paralelamente a chegada dos aferentes retinotectais (Rhoades *et al.*, 1990; Crissman *et al.*, 1992) e parece estar acoplada a proteína Gi. Desta forma, a serotonina presente em etapas mais precoces do desenvolvimento, mantém a adenilil ciclase inibida, sugerindo que este neurotransmissor esteja contribuindo para manter os níveis baixos de AMPC, conforme nosso trabalho demonstra. Além disso, dados do nosso laboratório indicam que os receptores de adenosina também são modulados ao longo do desenvolvimento do colículo superior, de tal forma que até DPN14 a expressão do receptor A₁ (acoplado a Gi e

adenilil ciclase) é maior enquanto que a partir de DPN21-28 a expressão do receptor A2a (acoplado a Gs e adenilil ciclase) torna-se predominante (Gomes *et al.*, FESBE 2005; Campello-Costa *et al.*, Soc. NSC, 2006). Desta forma, podemos concluir que os níveis basais de AMPc encontrados neste trabalho refletem a maturação diferenciada das diferentes vias de neurotransmissão.

5.2 Efeitos da Ativação Purinérgica sobre o acúmulo de AMPc *In Vitro*:

A adenosina atua em receptores purinérgicos, P1, que modulam a atividade da adenilil ciclase, além de atuar sobre outros sistemas efetores (para revisão, Cunha, 2001; Akbar *et al.*, 1994; Cunha *et al.*, 1999; Cunha & Ribeiro, 2000; Kirk & Richardson, 1995). Ela é um importante neuromodulador inibitório no SN, que atua através do aumento na condutância ao íon potássio ou na diminuição na liberação de neurotransmissores (Thompson *et al.*, 1992; Wu & Saggau, 1994). Entretanto, é sabido também que a adenosina pode ter uma ação excitatória no córtex, striatum, hipocampo e colículo superior adulto (Ishikawa *et al.*, 1997; Kessey & Mogul, 1998; Rebola *et al.*, 2003).

Desta forma, fomos avaliar a modulação dos níveis de AMPc pela adenosina em diferentes etapas do desenvolvimento. Para tanto, fatias de colículo superior foram incubadas com um agonista não-seletivo dos receptores purinérgicos P1, o NECA. Nossos resultados mostraram que o NECA não promoveu alterações significativas nos níveis de AMPc no animal neonato (DPN0), mas induziu diminuição nas taxas deste segundo mensageiro entre a segunda e quarta semana do desenvolvimento (DPN14 e 28) e aumento a partir da sexta semana (DPN42 e 70) (Fig 14). Estes resultados corroboram dados do laboratório que demonstram a presença dos receptores A1 e A2a em todas as idades estudadas, mas com perfil de expressão diferenciado (Gomes *et al.*, 2005 FESBE). O receptor A1 é acoplado a

proteína Gi e inibe a síntese de AMPc. Este receptor é mais expresso em fases precoces do desenvolvimento (até DPN14), e provavelmente por isso observamos a redução nos níveis de AMPc induzidas por NECA. O contrário é verdade para o receptor A2a que é acoplado a Gs, aumenta AMPc e é mais expresso em fases tardias do desenvolvimento (a partir de DPN28). Assim, observamos que a estimulação com NECA induz, nos animais DPN42 e DPN70, acúmulo de AMPc, já que provavelmente o receptor A2a esteja sendo mais ativado. No entanto, alguns dados não podem ser diretamente correlacionados. No animal neonato, embora a expressão do receptor A1 seja bem maior do que do A2a, o NECA não foi capaz de modificar negativamente os níveis de AMPc em relação ao controle. Este fato pode ser explicado porque a expressão dos receptores pode não refletir: (1) a localização destes receptores na membrana já que para o ensaio de western blot utilizamos homogenados de colículo superior e, portanto, avaliamos os receptores totais da célula (internos e de superfície celular); (2) a afinidade destes receptores pelo agonista NECA; (3) o acoplamento destes receptores ao sistema de proteína G e/ou efetor onde os níveis de A2a são mais elevados. No animal de quarta semana, onde a expressão de A2a é maior do que de A1, observamos uma diminuição no acúmulo de AMPc induzida por NECA e não um aumento, conforme esperado. Possivelmente este fato ocorre já que embora exista mais A2a, a expressão do A1 é bastante alta e sua atividade pode prevalecer nesta fase do desenvolvimento retinotectal. Alternativamente podemos ainda imaginar que os receptores purinérgicos estejam interagindo no colículo superior, como já demonstrado em outros (O'Kane & Stone, 1998). No hipocampo e no córtex de ratos jovens (DPN42) a administração de agonistas do receptor A2a leva a uma diminuição na ligação do receptor A1 com seus agonistas; este efeito é bloqueado por uma prévia administração de antagonista de A2a (Lopes *et al.*, 1999). Além disso, têm sido descrito que ambos os receptores podem interagir e modular outros sistemas através de transativação de receptores tirosina cinase (Rajagopal *et al.*, 2004), hetero-oligomerização com

receptores de ATP tipo P2Y (Youshioka *et al.*, 2002) bem como com receptor D3 de dopamina (Torvinem *et al.*, 2005). Como todas estas moléculas estão presentes no colículo superior, não podemos descartar que estas interações possam ocorrer durante o desenvolvimento retinotectal. Mais estudos, utilizando agonistas e/ou antagonistas purinérgicos específicos na diferentes etapas, são necessários para comprovar estas hipóteses. Além disso, também pretendemos avaliar a regulação do AMPc induzida por outros neurotransmissores do colículo como a serotonina, dopamina e glutamato.

5.3 Adenosina e Desenvolvimento Topográfico Retinotectal: Um modelo de Estudo *In Vivo*

A precisão com que o sistema nervoso funciona requer que suas células se conectem de forma apropriada com os seus alvos. Esta organização gera os diferentes mapas topográficos que permitem o perfeito processamento das informações sensoriais e motoras. O sistema visual tem sido foco, nos últimos anos, de vários estudos que buscam determinar os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela formação e manutenção do arranjo topográfico. Particularmente o sistema retinotectal de diferentes espécies tem levantado importantes questões acerca de como é gerada a especificidade sináptica, essencial à formação adequada das conexões entre a retina e o colículo superior ou teto óptico. Já se sabe que os axônios retinianos crescem e atingem diretamente o colículo superior guiado por pistas ambientais que direcionam o seu crescimento correto (Mellitzer, 2000; Knöll & Drescher, 2002). Entretanto a projeção inicial é sempre mais exuberante que a observada mais tardiamente, no animal maduro (Simon & O'Leary, 1992). O refinamento topográfico das conexões no sistema nervoso ocorre em função da estabilização seletiva de sinapses e da eliminação das conexões inapropriadas (Shatz *et al.*, 1996; Chandrasekaran *et al.*, 2005). Vários trabalhos já demonstraram que este processo depende da atividade elétrica sincrônica

das células pré- e pós-sinápticas, de receptores NMDA e de sinalizadores retrógrados, dentre outros (para revisão, Schmidt, 2004). A formação deste mapa topográfico ocorre dentro de um período crítico que corresponde em roedores as três-primeiras semanas do desenvolvimento pós-natal.

Nosso laboratório tem demonstrado que é possível induzir modificações no padrão de conectividade retinotectal em resposta a lesões seletivas no sistema visual e após inibição da síntese de moléculas de sinalização retrógrada como o óxido nítrico e o ácido araquidônico dentro e fora do período crítico do desenvolvimento (Campello-Costa *et al.*, 2000; Serfaty *et al.*, 2005; Campello-Costa *et al.*, 2006).

Desta forma, avaliamos o papel funcional da adenosina, um neuromodulador que participa de diferentes formas de plasticidade sináptica, na formação e manutenção da topografia retinotectal (de Mendonça & Ribeiro, 1997). Para isso utilizamos 2 drogas que induzem aumento na concentração extracelular de adenosina por vias distintas. O EHNA é um inibidor da adenosina deaminase, enzima que degrada a adenosina em inosina e o dipiridamol é um inibidor do transportador de adenosina. A administração de ambas as drogas, dentro do período crítico, induziu uma desestabilização de projeções retinotectais ipsolaterais ao olho injetado com traçador de tal forma que elas passaram a ocupar territórios anômalos no colículo superior, tais como a região caudal e eventualmente, superficial das camadas visuais (Fig 16, 18). Este efeito foi observado com apenas quatro dias de tratamento iniciado no DPN 10, ou seja, em uma fase onde a projeção retinotectal já se encontra com um padrão anatômico semelhante de um animal maduro, de tal forma que a projeção isolateral ocupa apenas a porção anterior e profunda do colículo superior, já que o sistema já passou pela maior fase de refinamento sináptico (Serfaty *et al.*, 2005).

Do ponto de vista neuroquímico, acreditamos que o aumento na disponibilidade de adenosina esteja induzindo maior ativação de receptores A1 (mais abundantes nesta fase do desenvolvimento) e por isso estejamos facilitando a inibição sináptica no colículo o que estaria promovendo a desestabilização ou o enfraquecimento de conexões previamente formadas e conseqüente crescimento de colaterais para diferentes regiões.

Por outro lado, o tratamento sistêmico com dipiridamol no final do período crítico (entre o DPN20–27) não foi capaz de induzir rompimento topográfico desta via. Nestes animais submetidos ao tratamento intraperitoneal com 50 mg/kg de dipiridamol, o padrão de marcação dos axônios retinotectais se mostrou qualitativamente similar àqueles tratados com veículo (FIG 22). Acreditamos que este resultados sejam decorrente da presença mais abundante dos receptores A2a que normalmente estão associados à estabilização ou fortalecimento sináptico e devem estar sendo mais ativados pela adenosina acumulada no espaço sináptico (Mendonça *et al.*, 1994).

Têm sido proposto que os mecanismos celulares que medeiam o fortalecimento ou enfraquecimento sináptico observado durante o desenvolvimento sejam a potenciação (LTP) e depressão de longa duração (LTD). Dessa forma, as sinapses co-ativas se estabilizariam através de um aumento na eficácia da transmissão sináptica (LTP), enquanto o enfraquecimento e conseqüente retração dos terminais assincrônicos envolveria uma diminuição na eficácia sináptica (LTD) (Bear *et al.*, 1987; Mize & Lo, 2000). Recentemente Mize demonstrou uma correlação entre o desenvolvimento da LTD e o refinamento da via retinotectal ipsolateral (Mize & Lo, 2000). Desta forma é possível especular que a adenosina influencie o refinamento topográfico através da ativação da LTP ou LTD colicular.

De fato, vários estudos já demonstraram que os receptores purinérgicos de adenosina estão relacionados a alterações de eficácia sináptica. Assim, a aplicação de antagonistas de receptor A1 ou agonista de A2 induzem LTP (Mendonça *et al.*, 1994). Recentemente, Lopes

demonstrou que, a ativação de receptores A1 pré-sinápticos inibem a transmissão sináptica no hipocampo. Por outro lado, caso estes receptores estejam tonicamente inibidos por receptores A2a, é possível observar a facilitação nesta transmissão, sugerindo que a adenosina participe ativamente no processo de modulação sináptica observado durante o desenvolvimento e na plasticidade no sistema nervoso central (Lopes *et al.*, 2002).

No colículo superior observou-se que a adenosina tem um papel facilitador na transmissão sináptica através da injeção intraperitoneal do EHNA. Neste trabalho, o acúmulo de adenosina no fluido cérebro-espinhal induziu um aumento, mediado por AMPc, na amplitude dos potenciais excitatórios (Kessy & Mogul, 1998; Ishikawa *et al.*, 1997). Por outro lado, a adenosina pode ter um efeito inibitório na resposta pós-sináptica, o qual é abolido durante a indução da LTP na regeneração da via retinotectal (Zhang *et al.*, 1998).

Adicionalmente, avaliamos a expressão dos receptores purinérgicos no colículo superior de animais submetidos ao tratamento sistêmico com 50 mg/Kg de dipiridamol dentro e fora do período crítico. A nossa hipótese de que este tratamento poderia alterar a expressão dos receptores para produzir o rompimento topográfico seria baseada no fato de que aumentos na disponibilidade de agonistas geram uma dessensibilização ou “down-regulation” nos seus próprios receptores (Chern *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 1998). Se esta regulação estiver ocorrendo preferencialmente sobre os receptores A2a, ocorreria uma diminuição dos níveis de AMPc, levando a uma diminuição da estabilidade sináptica. Esta proposta estaria em consonância com os resultados da ontogênese do AMPc, onde baixos níveis deste segundo mensageiro, em fases iniciais do desenvolvimento pós-natal, estariam associados à baixa estabilidade sináptica.

Para testar esta hipótese, após o término das injeções intraperitoneais, os colículos foram removidos e utilizados para avaliação por western blot da expressão dos receptores A1 e A2a. Nossos resultados demonstram que o tratamento sistêmico com dipiridamol não foi

capaz de alterar a expressão de receptores A1 em nenhuma das etapas estudadas e induziu uma *down-regulation* dos receptores A2a dentro, mas não fora do período crítico (Fig 23). Em conjunto com os dados anatômicos, podemos sugerir que o rompimento topográfico observado após o tratamento com dipiridamol dentro do período crítico, seria resultado da ativação de receptores A1 (mais expressos neste período) e da diminuição da ativação de receptores A2a (*regulados negativamente*) que estariam contribuindo para desestabilização sináptica e conseqüente brotamento dos colaterais. Por outro lado, a ausência de efeitos plásticos induzidos pelo tratamento após o período crítico deve ser decorrente da ativação dos receptores A2a que são normalmente mais expressos nesta etapa e induzem estabilização sináptica (Mendonça *et al.*, 1994).

Estes dados também podem ser explicados pela modulação da adenosina sobre uma série de sistemas de neurotransmissores. Em algumas regiões, a adenosina modula a liberação de serotonina (Mossner *et al.*, 2000), estabelece-se uma possível via de sinalização envolvendo estas moléculas na indução de plasticidade no colículo superior. Dados de pesquisas recentes em nosso laboratório têm demonstrado que o aumento de serotonina através do tratamento intraperitoneal com a fluoxetina, um inibidor seletivo de sua recaptação de serotonina, induz plasticidade retinotectal (Bastos *et al.*, 1999). Este efeito parece ser mediado pela inibição da adenilil ciclase pré-sináptica já que animais submetidos a dietas com restrição de triptofano, aminoácido precursor da serotonina, apresentaram acúmulo de AMPc no colículo, em relação àqueles submetidos a dietas com complemento de triptofano (Gonzáles *et al.*, 2003).

Além disso, a adenosina interage com outros sistemas de neurotransmissores, como por exemplo, a acetilcolina e a dopamina (Jin *et al.*, 1993). No striatum, há uma co-localização de receptores A2a e dopaminérgicos D2 em fibras colinérgicas. Assim, a ativação de A2a nesta via diminui a liberação de dopamina, que tem ação inibitória sobre a liberação

da acetilcolina, neurotransmissor excitatório. Por diminuir a inibição pela dopamina, a ativação de A2a aumenta a transmissão sináptica neste núcleo (Ishikawa *et al.*, 1997). Todos estes neurotransmissores estão presentes no colículo superior então é possível que a adenosina desempenhe seus efeitos no desenvolvimento e na plasticidade do sistema retinotectal indiretamente através da modulação destes sistemas de neurotransmissão.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que os níveis de AMPc no colículo superior de ratos sofrem variações ao longo do desenvolvimento pós natal, sendo baixos no início (DPN0 e 10), aumentando entre a segunda e a sexta semana de vida pós-natal e retornando aos menores níveis no animal adulto.

O agonista não seletivo dos receptores de adenosina (NECA) induziu diminuição nos níveis de AMPc entre a segunda e a quarta semana do desenvolvimento pós-natal, mas promoveu acúmulo deste segundo mensageiro a partir da sexta semana. No animal neonato a aplicação do agonista não alterou os níveis deste segundo mensageiro.

O tratamento intraperitoneal com drogas capazes de gerar um aumento nos níveis endógenos de adenosina (EHNA 10mg/Kg ou dipiridamol 50mg/Kg) foi capaz de induzir um rompimento topográfico da projeção retinotectal ipsolateral dentro do período crítico.

O tratamento com dipiridamol 50mg/Kg entre DPN20-27 não promoveu alterações na organização topográfica dos axônios retinianos ipsolaterais.

Animais submetidos ao tratamento com dipiridamol 50mg/Kg entre DPN10-13 apresentaram uma diminuição na expressão de receptores A_{2a} no colículo superior, mas não no receptor A_1 . Nos animais tratados entre DPN20-28, não observamos qualquer alteração na expressão de ambos os receptores.

Em conjunto, estes resultados indicam que a adenosina participe como neuromodulador na formação e manutenção da topografia retinotectal e ainda apontam para a via do AMPc como um possível mediador intracelular destes efeitos. Além disso, demonstramos também que a plasticidade neural induzida por acúmulo de adenosina endógena dentro do período crítico,

envolve a regulação negativa de receptores purinérgicos do tipo A2a que sabidamente participam de mecanismos de estabilização sináptica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abracchio, M. P. et al. *Modulation of apoptosis by adenosine in the central nervous system: a possible role for the A3 receptor. Pathophysiological significance and therapeutic implications for neurodegenerative disorders.* Ann N Y Academy of Science, 15; 825: p. 11-22, 1997.

Agranoff, B. W.; Albers, R.W.; Altemus, M. *Basic Neurochemistry- molecular, cellular and medical aspects.* USA: Lippincott Williams & Wilkins, 6. ed, 1999.

Andersen P.L., Webber, C. A., Whitmore S.R., Schreyer, D. J. Divergent regulation of GAP-43 expression and CNS outgrowth by cyclic AMP. *J. Neurosci Res.* 2000 Sep 15;61(6):626-35

Artola; Singer, W A. *The involvement of n-methyl-d-aspartate receptors in induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex.* Europ. J. Neurosc, v. 2, p. 254-269, 1990.

Bara-Jimenez, W. et al. *Adenosine A2a receptor antagonist treatment of Parkinson's disease.* Neurol.,v. 61,p. 293-296,2003.

Barraco, R. A.; Clough-helfman, C.; Goodwin, B. P.; Anderson, G. F. *Evidence for presynaptic adenosine A2a receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius.* J. Neurochem., v. 65, p. 1604-1611, 1995.

Bastos E.F.; Marcelino, J. L. S.; Amaral, A.R.; Serfaty, C.A. *Fluoxetine-induced plasticity in the rodent visual system.* Brain Res. V. 824, p. 28-35, 1999.

Bear, M.F. *A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex.* Proceedings Nation. Acad. of Sci. USA. v. 93, p. 13453-13459, 1996.

Binns, K.; Salt, T. E. *Developmental changes in NMDA receptor mediated visual activity in the rat superior colliculus, and effect of dark rearing.* *Exper. Brain Res.*, v. 120, p. 335-344, 1998.

Bliss, T.V.P.; Collingridge, G.L. *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus.* *Nature*, v. 361, p. 31-39, 1993.

Bourne, H.R.; Nicoll, R. *Molecular machines integrate coincident synaptic signals.* *Cell*, v.72, p.65-75, jan.1993

Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Buck, J. et al. *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals.* *Proceed. Nat. Acad. Sci., 1.ed., U S A.*, v. 96, p.79-84, 1999.

Campello-Costa, P. L. et al. *Acute blockade of nitric oxide synthesis induces disorganization and amplifies lesion-induced plasticity in the rat retinotectal projection.* *J. Neurobiol.*, v. 44, p. 371-381, 2000.

Campello-Costa, P. L. *Mensageiros retrógrados regulam o desenvolvimento e a plasticidade da projeção retinotectal de roedores.* Rio de Janeiro, 2001.115f. Tese de Doutorado – Inst. Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, 2001.

Campello-Costa, P, Fosse-Junior AM, Oliveira-Silva P, Serfaty CA. *Blockade of arachidonic acid pathway induces sprouting in the adult but not in the neonatal uncrossed retinotectal projection.* *Neurosc.* 2006;139(3):979-89. Epub 2006 Feb 10.

Cynader, M.; Shaw, C.; Prusky, G.; Van, H. F. *Neural mechanisms underlying modifiability of response properties in developing cat visual cortex.* *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* , v.67, p. 85-108, 1990.

Chern, Y. *Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system.* *Cel. Signal.*, v.12, p. 195-204, 2000.

Ciruela, F., Casadó, V., Rodrigues, R. J., Luján, R., Burgueño, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S., Maool, J., Cortés, A., Canela, E. I., López-Gimenez, J. F., Milligan, G., Lluís, C., Cunha, R.A., Ferré, S. & Franco, R. *Presynaptic control of Striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2a receptors heteromers*. J. Neurosci., 26(7) 2080-2087, 2006.

Constantine-Paton, M. *NMDA receptor as a mediator of activity-dependent synaptogenesis in the developing brain*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol , v.55, p.431-443, 1990.

Crissman, R.C., D. Jiang, E.A. Arce, C.A. Bennet-Clarke, R.W.Rhoades. *Progressive loss of serotonergic synapses from the superficial layers of the hamster's superior colliculus*, Soc. Neurosci. . Abstr. 18 1992 1311

Cunha , R. A. & Ribeiro, J. A. *Adenosine A2a receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires PKC but not PKA activation*. Neurosci. Let. 289 (2000) 127-130.

Cunha , R. A et al. *Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus*. Brain R.v. 649, p. 208-216, 1994.

Davies, A. M. *Neurotrophins – the yin and the yang of nerve growth factor*. Cur. Biol., v. 7, p. 38-40, 1997.

Debsky, E. A. ; Cline, H. T. *Activity-dependent mapping in the retinotectal projection*. Curr Opin Neurobiol. 2002 Feb;12(1):93-9. Review.

Dunwiddie, V. *The physiological role of adenosine in the central nervous system*. Int. Rev. Neurobiol. , v.27, p. 63-139, 1985.

Dunwiddie TV, Haas HL. *Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action*. J Physiol. 1985 Dec;369:365-77

Dunwiddie, V. ; Fredholm, B. B. *Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus.* J.Pharmacol. , v. 249, p. 31-37, 1989.

Franks, K. M., Sejnowski, T. J. *Complexity of calcium signaling in synaptic spines.* Bioessays. 2002 Dec;24(12):1130-44. Review.

Fredholm & Dunwiddie, *How does adenosine inhibit transmitter release? Trends Pharmacol.Sci.1998 Apr,9(4):130-4. Review.*

Garvitz, L. M., Nalbant, D, Simon C., Fowler, J. C. *Adenosine-mediated activation of Akt/PKB in the rat hippocampus in vivo and in vitro.* Neurosci. Lett. 2002 Aug 9;328(2):175-9.

Geiger, J. D. ; Nagy, J. I. *Distribution of adenosine deaminase activity in rat brain and spinal cord.* J Neurosci. 1986 Sep;6(9):2707-14

Ghoumari AM, Wehrle R, Bernard O, Sotelo C, Dusart I. *Implication of Bcl-2 and Caspase-3 in age-related Purkinje cell death in murine organotypic culture: an in vitro model to study apoptosis.* Eur J Neurosci. 2000 Aug;12(8):2935-49

González, E. M. C. *Efeitos da restrição seletiva de triptofano e serotonina sobre o desenvolvimento e plasticidade das projeções retinotectais de roedores.* Niterói, 2003.112f. Dissertação - Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, 2003. – *Randomized trial of the adenosine A2A receptor antagonist istradefylline in advanced PD,* Neurology, v. 61, p.297-303, 2003.

Hanson, E.S.; Reese, B.E. *Rapid plastic response following early retinal lesions in rats.* Brain Res Dev Brain Res. 1993 Jun 8;73(2):293-8.

Hauser RA, Hubble JP, Truong DD; *Randomized trial of the adenosine A(2A) receptor antagonist istradefylline in advanced PD.* Neurology. 2003 Aug 12;61(3):297-303.

Heiduscha P, Thanos S. *Restoration of the retinofugal pathway*. Prog Retin Eye Res. 2000 Sep;19(5):577-606. Review

Hirai H, Okada Y. *Ipsilateral corticotectal pathway inhibits the formation of long-term potentiation (LTP) in the rat superior colliculus through GABAergic mechanism*. Brain Res. , v. 629, p. 23-30, 1993.

Hirai H, Okada Y. *Adenosine facilitates in vivo neurotransmission in the superior colliculus of the rat*. J Neurophysiol. 1995 Sep;74(3):950-60.

Huang, X. Y.; LI, X. G. ; Kandel, E.R. *cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase*. Cell, v. 79, p. 69-79, 1994.

Ikeda H, Hatta S, Ozawa H, Ohshika H, Saito T. *Effect of chronic ethanol treatment of Ca²⁺-inhibited adenylyl cyclase in mouse striatum*. Alcohol Clin Exp Res. 1999 Apr;23(4 Suppl):7S-10S

Isenmann S, Kretz A, Cellerino A. *Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration*. Prog Retin Eye Res. 2003 Jul;22(4):483-543

Ishikawa, S.; Saijoh, K.; Okada, Y. *Endogenous adenosine facilitates neurotransmission via A_{2a} adenosine receptors in the rat superior colliculus in vivo*. Brain Res., 757, p. 268-275, 1997.

Itaya SK, Fortin S, Molotchnikoff S. *Evolution of spontaneous activity in the developing rat superior colliculus*. Can J Physiol Pharmacol. 1995 Sep;73(9):1372-7111

Jeffery G, Arzymanow BJ, Lieberman AR. *Does the early exuberant retinal projection to the superior colliculus in the neonatal rat develop synaptic connections?* Brain Res. 1984 May;316(1):135-8.

Jin S, Johansson B, Fredholm BB. *Effects of adenosine A₁ and A₂ receptor activation on electrically evoked dopamine and acetylcholine release from rat striatal slices*. J Pharmacol Exp Ther. 1993 Nov;267(2):801-8.

Johnson, O. L. ; Ouimet, C. C. *Protein synthesis is necessary for dendritic spine proliferation in adult brain slices*. Brain Res, 996 (1): 89-96, 2004.

Kaiser, S. M.; Quinn, R. J. *Adenosine receptors as potential therapeutic targets*. DDT., v. 4, 1999.

Katz, C. L. ; Crowley, J. C. *Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns* .Nat Rev Neurosci v. , p.34-42, 2002.

Kempermann, G.; Gage, F. H. *New Nerve Cells for the Adult Brain*. Scientific American. p. 38-43, maio.1999

Kessey, K.; Mogul, D. J. *AdenosineA2 receptors modulate hippocampal synaptic transmission via a cyclic-AMP-dependent pathway*. Neurosci., v 84, n°1, p. 59-69, 1998.

Kirk, J. P.; Richardson, P. J. *inhibition of striatal GABA release by the adenosine A2a receptor is not mediated by increases in cyclic AMP*. Journal of Neurochemistry, v. 64, p. 387-395,1995.

Klassen, H., Sakaguchi, D. S., Young, M. J.. *Stem cells and retinal repair*. Prog Retin Eye Res. 23 (2004) 149 –181.

Knöll, B. and Drescher, U. *Ephrin-As as receptors in topographicProjections*. TRENDS in Neurosc. Vol.25 No.3 March 2002

Kobayashi, K; Okada, Y. *Excitatory effects of adenosine are not mediated by inhibition of GABAergic system in slices of superior colliculus and hippocampus from guinea pig*. Neurosci.Lett., 264, p. 37-40, 1999.

Kurokawa, M. et al. *Inhibition by KF17837 of Adenosine A2a receptor-mediated modulation of striatal GABA and Ach release*. B. J. Pharmacol. , v. 113, p. 43-48, 1994.

Land, P. W. ; Lund, R. D. *Development of the rat's uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies*. Science. v. 205 , p. 698-700, 1979.

Latini, Serena, Pedata, Felicita. *Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations*. J. Neurosci. , 2001, 79 463-484.

Lee, P. ; Hall, W. C. *Interlaminar connections of the superior colliculus in tree shrew. II: projections from the superficial gray to the optic layer*. Vis Neurosci. 1995 May-Jun;12(3):573-88.

Lemke, G. & Reber, M.. *Retinotectal Mapping: New Insights from Molecular Genetics*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2005.21:551-580.

Li, X. X.; Nomura, T.; Aihara, H.; Nishizaki, T. *Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors*. Life Scienc. , v. 68, p. 1343-1350, 2001

Linden , R ; Perry, V. H. *Massive retinotectal projections in rats*. Brain Res., v. 272, p.145-149, 1983.

Lloyd HG ,Lindstrom K , Fredholm BB. *Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation of energy depletion*. Neurochem. Int., v.23, p. 173-185, 1993

Lloyd HG, Fredholm BB. *Envolvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices*. Neurochem. Int., v. 26, p. 387-395, 1995.

Lo, F.S.; Mize, R.R. *Synaptic regulation of L-type Ca²⁺ channel activity and long-term depression during refinement of the retinocollicular pathway in developing rodent superior colliculus*. J. Neurosci. ,v. 20, p. 1-6, 2000 A

Lo, F.S.; Mize, R.R. *NMDA receptor-independent long-term depression occurs during refinement of the retinocollicular pathway in developing rodent superior colliculus*.2000B

Lopes et al., *Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats*. J Neurophysiol. 1999 Dec;82(6):3196-203, 1999

Lund, R. D., Bunt, A. H., *Prenatal development of central optic pathways in albino rats.*

Maffei, L. Plasticity in the visual system: role of neurotrophins and electrical activity. *Arch Ital Biol.* 2002 Oct;140(4):341-6. Review.

Malenka, R. C. et al. *An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation.* *Nature*, v.340, (6234), p. 554-557, 1989.

Malenka, R. C. *Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD.* *Cell*, v.4, p.535-538, 1994.

Mendonça, A. de; Ribeiro, J. A. *Adenosine and neuronal plasticity.* *Life Science*, v. 60, p. 245-251, 1997.

Mendonça, A. de; Almeida, T.; Bashier, Z. I.; Ribeiro, J. A. *Endogenous adenosine attenuates long-term depression and depotentiation in the CA1 region of the rat hippocampus.* *Neuroph.*, v. 36, p.161-167, 1997.

Mey, J ; Thanos, S. *Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis.* *Brain Res. Ver.* , v.35, n. 3, p. 205-245, 2000.

Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA. *Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture.* *Neuron*.15:805–819, 1995.

Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson Jr MG, Reichardt LF, Barres BA . *Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons.* *Neuron* 21:681–693, 1998.

Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. *Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins.* *Curr Opin Neurobiol.* 2000 Jun;10(3):400-8

Mesulam, .*Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents.* J Histochem Cytochem. 1978 Feb;26(2):106-17, 1978

Mitchel, J. B.; Lupica, C. R.; Dunwiddie, T. V. *Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus.* J. Neurosci., v. 13, p. 3439-3447, 1993.

Miyamoto E. *Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus.* J Pharmacol. Sci. 2006;100(5):433-42. Review

Miyamoto, T.; Okada, Y.; Nishimura, S.; Sakura, I. *Excitatory effects of adenosine on neurotransmission in the slices of superior colliculus.* Neurosci. Res., p. 138, 1991. Suplemento 14.

Miyamoto, T.; Sakurai, t. ; Okada, Y. *Masking effect of NMDA receptor antagonists on the formation of long-term potentiation in superior colliculus slices from the guinea pig.* Brain Research., v. 518, p. 166-172, 1990.

Mize, R.R. & LO, F.S. *Nitric oxide, impulse activity, and neurotrophins in visual system development.* Brain Research, v. 886, p. 15-32, 2000.

Mosqueda-Garcia, R. *Cardiovascular effects of adenosine in the nucleus of solitary tract.* Hypertension, v. 18, p.494-502, 1991.

Mossner R, Albert D, Persico AM, Hennig T, Bengel D, Holtmann B, Schmitt A, Keller F, Simantov R, Murphy D, Seif I, Deckert J, Lesch KP. *Differential regulation of adenosine A(1) and A(2A) receptors in serotonin transporter and monoamine oxidase A-deficient mice.* Eur Neuropsychopharmacol. 2000 Dec;10(6):489-93.

Mulkley, R. M.; Herron, C. E.; MALENKA, R. C. *The cellular mechanisms of hippocampal long-term depression.* Biomedical Research, v. 15, p. 83-90, 1994. Supplement 1.

Murphy, D. D. ; Segal, M. *Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein*. Proceedings of the National Academy of Science, v.94, p. 1482-1487, 1997.

Murphy, T. H. *Activity-dependent synapse development: changing the rules*. Nature Neuroscience, 1. ed., v.6, p. 9-11, 2003.

Nakata, H., Yoshioka, K., Kamiya, T., Tsuga, H., Oyanagi, K. *Function of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors*. J.Molec. Neurosci. v 26 pp 233- 238, 2005.

Nicol, X., Muzerelle, A., Rio, J. P., Me´tin, C. and Gaspar P.. *Requirement of Adenylate Cyclase 1 for the Ephrin-A5-Dependent Retraction of Exuberant Retinal Axons*. J. Neurosci., January 18, 2006 , 26(3):862– 87

Nguyen, P. V., Kandel, E. R. *A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices*. J Neurosci. May 15;16(10):3189-98, 1996

Nishimura, S. ; Mohri, M.; Okada, Y; Mori, M. *Excitatory and inhibitory effects of adenosine on the neurotransmission in the hippocampal slices of guinea pig*. Brain Research, v. 525, p. 165-169, 1990.

Okada, Y.; Nishimura, T. ;Miyamoto, T. *Excitatory effects of adenosine and transmission in slices of superior colliculus and hippocampus of guinea pig*. Neuroscience Letters, v. 120, p. 205-208, 1990.

O'Kane, E. M., Stone, T. W. *Interaction between adenosine A1 and A2 receptor-mediated responses in the rat hippocampus in vitro*. Eur J Pharmacol. 1998 Nov 27;362(1):17-25.

O'Leary, D. D.; Schalaggar, B. L.; Tuttle, R. *Specification of neocortical areas and thalamocortical connections*. Annu Rev Neurosci , v.17, p.419-439, 1994.

O'regan , M. H; Simpson, R.E.; Perkins, L.M.; Phillis, J. W. *The selective A2 adenosine receptor agonist CGS21680 enhances excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex.* Neurosci. Lett., v. 138, p. 169-172, 1992

Palucha, A; Branski, P; Krockza, B; Wieronska, J; Pilc, A. *Developmental changes in the modulation of cyclic AMP accumulation by activation of metabotropic glutamate receptors.* Polish J. Pharmacol., v.53,p. 481-486, 2001.

Parsons, M. J., Benca, R. M., Browfield; M. S. & Behan, M. *Age-associated changes in the serotonergic system in rat superior colliculus and pretectum.* Brain Res. Bull., v. 55, 435-44, 2001.

Pearson, T. et al. *Plasticity of purine release during cerebral ischemia: clinical implications ?* J. Cell. Mol. Med., v. 7,n. 4, p. 362-375, 2003.

Perry, V. H., Henderson, Z., Linden, R. *Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat.* J Comp Neurol. 1983 Sep 20;219(3):356-68.

Peters DM, Gies EK, Gelb CR, Peterfreund RA. *Agonist-induced desensitization of A2B adenosine receptors.* Biochem Pharmacol. 1998 Mar 15;55(6):873-82.

[Pfeiffer, B.E.& Huber, K. M.](#) *Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity.* J Neurosci. 2006 Jul 5;26(27):7147-50. Review.

Plas, D.T.; Visel, A.; Gonzalez, E.; She, W.C.; Crair, M.C. (2004). *Adenylate Cyclase I dependent refinement of retinotopic maps in the mouse.* Vis. Res. 44: 3357–3364

Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV. *Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes.* J Neurosci. 2004 Jul 28;24(30):6650-8.

Ravary, A; Muzerelle, A; Herve, D.; Pascoli, V.; Ba-Charvet, K.N.; Girault, J.A; Welker, E.; Gaspar,P. (2003). *Adenylate Cyclase I as a Key Actor in the Refinement of Retinotectal Projection Maps.* J. Neurosci., v. 23, n.6, p. 2228-2238, 2003.

Rebola, N. Sebastião, A.M.; Mendonça, A.; Oliveira, C.R.; Ribeiro, J.A.; Cunha, R.A. (2003). *Enhanced Adenosine A2A Receptor Facilitation of Synaptic Transmission in the Hippocampus of Aged Rats*. *J Neurophysiol* 90: 1295–1303, 2003;

Recasens, M. *Putative molecular mechanisms underlying long term potentiation (LTP): the key role of excitatory amino acid receptors*. *Thérapie* v. 50: p. 19-34, 1995

Rodger J, Goto H, Cui Q, Chen PB, Harvey AR . *cAMP regulates axon outgrowth and guidance during optic nerve regeneration in goldfish*. *Mol. Cell. Neurosci.* 2005 Nov;30(3):452-64

Rhoades, R.W, Mooney, R.D., Chiaia, N.L., Bennet-Clarke, C.A., *Development and plasticity of the serotonergic projection to the hamster's superior colliculus*, *J. Comp. Neurol.* 299 1990 151–166

Sajnani, G. G., Abreu, P., Castro, R. *Pre/postnatal dopamine D1 receptor stimulation induces a differential reduction of serotonin levels in hippocampus and superior colliculus of puber rats*. *Neuroscience Letters* 230 (1997) 121–124

Salin, P. A.; Malenka, C.; Nicol, R. A. *Cyclic AMP Mediates a Presynaptic Form of LTP at Cerebellar Parallel Fiber Synapses*. *Neuron*, 16: p. 797-803, 1996.

Sanudo-Pena MC, Tsou K, Romero J, Mackie K, Walker JM. *Role of the superior colliculus in the motor effects of cannabinoids and dopamine*. *Brain Res.* 2000 Jan 24;853(2):207-14.

Schmidt, J. T. ; Buzzard, M. *Activity-driven sharpening of the regenerating retinotectal projection: effects of blocking or synchronizing activity on the morphology of individual regenerating arbors*. *J. Neurob.*, v. 18, p. 900-917, 1990.

Schulman, H. *Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression*. *Curr Opp. Neurob.*, 5: p. 375-381, 1995.

Sebastiao; A. M.; Ribeiro, J. A. *Evidence for the presence of excitatory A2 adenosine receptors in the rat hippocampus*. *Neurosci. Lett.*, v. 38, p. 41-44, 1992.

Serfaty, C.A.; Linden, R. *Development of abnormal lamination and binocular segregation of retinal afferents onto the rat superior colliculus*. Braz J Med Biol Res. 1990;23(8):663-6.

Serfaty CA, Reese BE, Linden R. *Cell death and interocular among retinofugal axons: lack of binocularly matched specificity*. Brain Res Dev Brain Res. 1990 Nov 1;56(2):198-204.

Serfaty , C. A.; Linden, R. *Evidence that relative densities of afferents from both eyes control laminar distribution and binocular segregation of retinotectal projections in rats*. Dev. Brain Res., v 60, p. 9-17, 1991.

Serfaty , C. A.; Linden, R. *Development of abnormal and binocular segregation in the retinotectal pathways of the rat*. Dev. Brain Res., v 82, p. 35-44, 1994.

Serfaty, C.A. , Campello-Costa, P. and Linden, R. *Rapid and long-term plasticity in the neonatal and adult retinotectal pathways following a retinal lesion*. Brain Res Bull. 2005 Jul 30;66(2):128-34.

Shatz, C. J.; Stryker, M. P. *Ocular dominance in layer IV of the cat's visual cortex and the effects of monocular deprivation*. J. Physiol. v. 281, p. 267-283, 1991.

Shatz, C. J. *Emergence of order in visual system development*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 602-608, 1996.

Simon, D. K.; Prusky, G. T.; O'leary, D. D. M.;Constantine-Paton, M. *NMDA receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map*. : Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 15;89(22):10593-7

Skapper, S. D.; Moore, S. E.; Walsh, F. S. *Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues*. Progr. in Neurobiol., v. 65, p.593-608, 2001.

Slack JR, Walsh C. *Effects of a cAMP analogue simulate the distinct components of long-term potentiation in CA1 region of rat hippocampus*. Neurosci Lett. 1995 Dec 1;201(1):25-8.

Smidt, J. T. Activity. *Driven sharpening of the retinotectal projection: the search for retrograde synaptic signaling pathways*. J. Neurobiol 59(1): 114-33

Stellwagen D, Shatz CJ, Feller MB .*Dynamics of retinal waves are controlled by cyclic AMP*. Neuron 24:673-685,1999.

Stellwagen D, Shatz CJ. *An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity*. Neuron 33:357-367,2002.

Tang, W. J; Hurley, J. H. *Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases*. Molec. Pharmacol., v. 54, n.2, p. 231-40. Review, 1998

Tavares Gomes *et al*. *Expressão de receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2a$ de adenosina no desenvolvimento e na plasticidade induzida do sistema retinotectal de ratos*..Apresentado na forma de pôster, XX Fesbe ,24 a 27 de agosto de 20005-Aguás de Lindóia-SP.

Thanos, S.; Bahr, M.; Barde, Y. A.; Vanselow, J. *Survival and Axonal Elongation of Adult Rat Retinal Ganglion Cells*. Eur. J. Neurosci., p. 19-26, 1989.

Thompson, S.M., Hass, H.L. & Gahwiller, B.H.. *Comparison of the actions of adenosine at pre- and post-synaptic receptors in the rat hippocampus in vitro*. J. Physiol. 451: p. 347-363, 1992.

Thorn & Jarvis, Thorn JA, Jarvis SM. *Adenosine transporters*.Gen Pharmacol. 1996 Jun, 27 (4):613-20. Review.

Townsend, M., Yoshii, A., Mishina, M. & Constantine-Paton, M. *Developmental loss of miniature N-methyl-D-aspartate receptor currents in NR2A knockout mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 1340–1345, 2003.

Tzavara, E.T.; Pouille, Y.; Defer, N.; Hanoune, J. *Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 1;93(20):11208-12.

Tzounopoulos, T. et al. *A Role for cAMP in Long-Term Depression at Hippocampal Mossy Fiber Synapses*. *Neuron*, v. 21, p. 837–845, 1998.

Wan, W. ; Geiger, J. D. *Effects of enucleation and visual deprivation on adenosine A1 and A2 receptor binding in superior colliculus of rat*. *Neurosci. lett.*, v. 117, p. 160-164,1990.

Weisskopf, M. G. ; Castillo, P. E. ; Sekino, Y. et al. *Adenosine A2 antagonist inhibits induction of long-term potentiation of evoked synaptic potentials but not of the population spike in hippocampal CA1 neurons*. *Bioch. and Biophys Res. Communic.*,v. 181, p. 1010-1014, 1991.

Wu, L.G. & Saggau, P. *Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus*. *Neuron*. 12: p. 1139-1148, 1994.

Xia, Z. and Storm, D. R. . *The Role of Calmodulin As A Signal Integrator For Synaptic Plasticity*. *Natur. Ver. Neurosci*

Xiao, M.Y.; Karpefors, M.; Niu, Y.P. ;Wigström, H. *The complementary nature of long-term depression and potentiation revealed by dual component excitatory postsynaptic potentials in hippocampal slices from young rats*. *Neurosci.* , v. 68, p. 625-635, 1995.

Yamamoto, M. et al. *Reduced immunoreactivity of adenylyl cyclase in dementia of the Alzheimer type*. *Neuroreport.*, v. 7, n.18, p. 2965-70, 1996.

Yao Y, Sei Y, Abbracchio, M. P., Jiang, J. L., Kim, Y. C., Jacobson, K. A. *Adenosine A3 receptor agonists protect HL-60 and U-937 cells from apoptosis induced by A3 antagonists*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Mar 17;232(2):317-22

Youshioka et al. *Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains*. *FEBS Lett*. 2002 Nov 6;531(2):299-303, 2002

Yun-Tao, M. et al. *BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death*. *J.Neurosci.*, v. 18, n.6, p. 2097-2107, 1998.

Zalustsky, R. A .; Nicoll, R. A . *Mediation of hippocampal mossy fibre long-term potentiation*. *Neurosci.*, v. 265, p. 1878-1882, 1994

Zhang, L. I. et al. *A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses*. *Nature*,v. 395, p. 37-44, 1998

COBEA – *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*, 1991
<http://www.cobea.org.br/etica.htm>

8 ANEXO – LEGENDAS SEPARADAS DAS FIGURAS 16, 18 E 22.

Figura 16: Fotomontagens de campo escuro de cortes parassagitais do colículo superior ipsilateral ao olho injetado com peroxidase (HRP), em aumento de 100X. (A e C): cortes medial e lateral, respectivamente do animal controle; (B e D): cortes medial e lateral do animal tratado com EHNA. Os asteriscos localizam o pre-tectum, setas brancas indicam os aglomerados de marcação ipsilateral, ou “clusters” e cabeças de seta indicam marcações aberrantes para regiões anômalas do CS. v: ventral; d: dorsal; a: anterior; p: posterior. A barra representa 500 μm .

Figura 18: Fotomicrografias de campo escuro das regiões medial (A, C, E e G) e lateral (B, D, F e H) do colículo superior ipsilateral à injeção da peroxidase (HRP) de animais controle (veículo) em A e B ou tratados com 10 (C e D), 30 (E e F) ou 50 (G e H) mg/Kg de dipiridamol. Aumento de 40X. Notar um maior espalhamento do campo terminal ventral em direção a região posterior do colículo no animal tratado com as doses de 30 e 50 mg/Kg. v: ventral; d: dorsal; a: anterior; p: posterior. O asterisco indica o pré-tecto e a seta o cluster de marcação ipsilateral na região anterior do colículo superior. Cabeças de seta indicam projeções em regiões anômalas. A barra representa 500 μ m.

Figura 22: Fotomicrografias de campo escuro de cortes parassagitais da região medial (superiores) e lateral (inferiores) do colículo ipsilateral à injeção da peroxidase (HRP) de animais controle ou tratados com dipiridamol 50mg/Kg, com aumento de 40X. O asterisco indica o pré-tecto e a seta o cluster de marcação ipsilateral na região anterior do colículo superior. v: ventral; d: dorsal; a: anterior; p: posterior. A barra representa 500 μ m.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)