

**CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

RAFAELA DA SILVA MACIEL

**EFEITO DO TRATAMENTO COM PCPA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E PLASTICIDADE DAS
PROJEÇÕES RETINOTECTAIS DE ROEDORES**

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM NEUROIMUNOLOGIA**

Orientador: Cláudio Alberto Serfaty

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RAFAELA DA SILVA MACIEL

EFEITO DO TRATAMENTO COM PCPA SOBRE O DESENVOLVIMENTO E
PLASTICIDADE DAS PROJEÇÕES RETINOTECTAIS DE ROEDORES

Trabalho desenvolvido no laboratório de Plasticidade Neural do departamento
de Neurobiologia, Instituto de Biologia, UFF.

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade Federal
Fluminense como requisito para
obtenção do grau de Mestre em
Neuroimunologia.

Orientador: CLAUDIO ALBERTO SERFATY

NITERÓI

2007

Universidade Federal Fluminense
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em Neuroimunologia

RAFAELA DA SILVA MACIEL

“EFEITO DO TRATAMENTO COM PCPA SOBRE O DESENVOLVIMENTO E
PLASTICIDADE DAS PROJEÇÕES RETINOTECTAIS DE ROEDORES”

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade Federal
Fluminense como requisito para
obtenção do grau de Mestre em
Neuroimunologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Paula Campello-Costa Lopes (Revisora e Suplente)- UFF

Prof. Dr. Ronald Marques dos Santos – UFF

Profa Dra Adriana da Cunha Faria Melibeu – UFF

Profa Dra Patricia Franca Gardino - UFRJ

Prof. Dr. Claudio Alberto Serfaty – (Orientador)

M 152 Maciel, Rafaela da Silva

Efeito do tratamento com PCPA sobre o desenvolvimento e plasticidade das projeções retinotectais de roedores/

Rafaela da Silva Maciel.—Niterói: [s.n.], 2007
135f.

Dissertação—(Mestrado em Neuroimunologia)-- Universidade Federal Fluminense, 2007.

1. Retina animal. 2. Projeção retinotectal. 3. Sistema nervoso animal. 4. Plasticidade – sistema visual. Título.

CDD 591.48

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE PLASTICIDADE NEURAL, NO PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE SOB A ORIENTAÇÃO DO PROF. CLÁUDIO ALBERTO SERFATY E NA VIGÊNCIA DE AUXÍLIOS CONCEDIDOS PELO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq), COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR (CAPES), FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) E PRONEX-MCT.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha querida mãe por me apoiar em todas as minhas escolhas e por fazer possível a minha chegada até aqui. Mãe, é por você!!!

À minha irmã, por sempre estar comigo, me ajudar na faculdade e na vida. Mila, um beijão.

Ao meu tio Evaldo por sempre acreditar em mim. Tio Dado, te adoro!

Ao meu orientador Cláudio Alberto Serfaty pela oportunidade de trabalhar em um laboratório nota 10, pela paciência e por acreditar em minha capacidade.

Às Professoras Paulinha, Priscilla e Adriana pela competência, carisma e alegria e por estarem sempre dispostas a ajudar no que precisar (não só ajudaram como me salvaram no final deste trabalho). Valeu mesmo, de coração!

Ao Pablo Trindade pela força no começo do meu estágio, por me ensinar técnicas laboratoriais e por estar sempre disposto a me ajudar.

A todo o restante da equipe do laboratório que sempre me incentivou: Aninha, Bruninha, Carlos, Flávio, Henrique, Letícia, Patrícias (Rung e Velasco), Rachel, Sheila, Tita e Wandílson.

Às amigas Carleara, Juliana, Natalinha e Vanessa, pela amizade, pela força e por me aturarem em momentos bons e ruins. Calma "migas", finalmente a tão esperada comemoração.

Aos meus aluninhos da UNIPLI. Só figura!!!

“O homem é mortal por seus temores e imortal por seus desejos”

Pitágoras

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
EPÍGRAFE.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1 ANATOMIA DO SISTEMA VISUAL.....	02
1.2 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS SENSORIAIS.....	07
1.2.1 Desenvolvimento do Sistema Retinotectal.....	10
1.3 ATIVIDADE ELÉTRICA E A PLASTICIDADE USO-DEPENDENTE DO SNC.....	13
1.4 PERÍODO CRÍTICO.....	16
1.5 O SISTEMA SEROTONINÉRGICO.....	18
1.5.1 Síntese e liberação da serotonina.....	21
1.5.2 Receptores serotoninérgicos.....	25
1.5.3 Funções biológicas da serotonina.....	27
1.5.4 Serotonina e o Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.....	29
1.5.5 Serotonina e Plasticidade.....	32
1.6 PROJEÇÕES RETINOTECTAIS DE ROEDORES COMO MODELO DE PLASTICIDADE NO SNC.....	35
2. OBJETIVOS.....	45

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 TRATAMENTO	47
3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA SEROTONINA.....	48
3.2.1 Análise de resultados.....	50
3.3 TÉCNICAS NEUROANATÔMICAS.....	51
3.3.1 Utilização de Traçadores.....	51
3.3.2 Lesões de Retina.....	52
3.3.3 Processamento Histológico	53
3.3.4 Histoquímica para HRP.....	53
3.3.5 Análise de resultados.....	54
3.4 ELETROFORESE E ANÁLISE DE WESTERN BLOT.....	56
3.4.1. Obtenção de amostras para corrida de eletroforese.....	56
3.4.2. Dosagem de proteína pelo método de Bradford.....	57
3.4.3. Eletroforese e Western blot.....	57
3.4.4 Análise de resultados.....	60
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4. RESULTADOS.....	62
4.1 IMUNORREATIVIDADE DE CÉLULAS SEROTONINA-POSITIVAS NOS NÚCLEOS DA RAPE EM ANIMAIS TRATADOS COM PCPA	62
4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PCPA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PROJEÇÕES RETINOTECTAIS EM DPN 14.....	70

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA COM PCPA SOBRE AS PROJEÇÕES RETINOTECTAIS EM DPN 28.....	76
4.4 ANÁLISE DA RESPOSTA PLÁSTICA DE AXÔNIOS IPSOLATERAIS APÓS LESÃO DE RETINA TEMPORAL EM DPN10.....	81
4.5 Análise da Resposta Plástica de Axônios Ipsolaterais após Lesão de Retina Temporal em DPN 21.....	84
4.6 EFEITOS DO TRATAMENTO COM PCPA SOBRE A EXPRESSÃO DE P-CREB NO COLÍCULO SUPERIOR.....	86
5. DISCUSSÃO.....	88
5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM PCPA SOBRE A EXPRESSÃO DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA SEROTONINA NOS NÚCLEOS DA RAPE	89
5.2 SEROTONINA E A PLASTICIDADE DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	92
5.3 REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DE P-CREB PELA SEROTONINA.....	98
6. CONCLUSÕES.....	101
7. BIBLIOGRAFIA.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	5-hidroxiindolacetaldeido
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5,7 DHT	5,7 dihidroxitriptamina
AADC	Ácido decarboxilase amino-aromático
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AMPA	Alfa-amino-5-metil-4-isoxalona propionato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
BDNF	Fator de crescimento derivado do cérebro
BHE	Barreira hemato-encefálica
BSA	Albumina de soro bovino
Cam	Calmodulina
CAM	Molécula de adesão celular
CAMK II	Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
CGR	Células ganglionares da retina
CREB	Elemento de resposta ao AMPc
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CS	Colículo superior
CT	Grupo ou dieta complementada com triptofano
DAB	Diaminobenzedina
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
DPN	Dia pós-natal
E	Dia embrionário
EPH	Efrina
ALF-1	Efrina A2
ERK	Cinase ativada por mitógeno

FAO/WHO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAP – 43	Proteína associada ao crescimento neurítico
GH	Homônio do crescimento
HRP	Peroxidase extraída do rabanete
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAO	Monoaminoxidase
MAPs	Proteína associada aos microtúbulos
MEC	Matriz extra celular
MHC	Molécula do complexo de histocompatibilidade principal
NaCl	Cloreto de sódio
NGF	Fator de crescimento neural
NGL	Núcleo geniculado lateral
NGS	Soro normal de cabra
NMDA	N-metil-D-aspartato
NRD	Núcleo dorsal da rafe
NRM	Núcleo medial da rafe
P	Dia pós-natal
PCPA	Para-clorofenilalanina
PPSEs	Potenciais pós-sinápticos excitatório
PKC	Proteína cinase C
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Grupo ou dieta com restrição em triptofano
S-100 β	Fator trófico secretado por astrócitos
SAI	<i>Stratum album intermedium</i>
SAP	<i>Stratum album profundum</i>
SERT	Transportador de serotonina
SGI	<i>Stratum griseum intermediale</i>
SGP	<i>Stratum griseum profundum</i>

SGS	<i>Stratum griseum superficiale</i>
SNC	Sistema nervoso central
SZ	<i>Stratum zonale</i>
SO	<i>Stratum opticum</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TTX	Tetrodotoxina
VET	Valor energético total

RESUMO

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) é caracterizado por processos que levam a formação adequada de contatos neurais. Em roedores, a especificidade dos circuitos neurais ocorre durante o período pós-natal conhecido como período crítico. Nesta fase do desenvolvimento do SNC, os contatos sinápticos são refinados em um processo determinado pela experiência sensorial. Tem sido demonstrado que a serotonina está envolvida diretamente nos processos de desenvolvimento neural uso-dependente e nos mecanismos de plasticidade sináptica. Neste trabalho, nós avaliamos o papel da serotonina sobre o desenvolvimento das projeções retinotectais e na plasticidade induzida por lesão de retina durante e após o período crítico. Para tanto, os animais foram submetidos ao tratamento agudo e crônico com PCPA -um inibidor da enzima triptofano hidroxilase- por 2 a 28 dias. A eficiência do tratamento com PCPA foi analisada pela quantificação da imunorreatividade para serotonina nos núcleos dorsal e ventral da rafe. Observou-se uma redução significativa após o tratamento agudo com PCPA e a recuperação da imunorreatividade pela permanência do tratamento. O tratamento crônico com PCPA afetou o desenvolvimento topográfico das projeções onde se observou projeções difusas e ausência de aglomerados de marcação na borda ventral do colículo superior. No tratamento subcrônico, foi observado uma reorganização das projeções retinotectais com aglomerados de marcação na borda ventral do CS e ao mesmo tempo um espalhamento das fibras no sentido caudal. Os estudos de lesão de retina em animais com tratamento crônico e subcrônico com PCPA durante e após o período crítico evidenciaram uma amplificação da resposta plástica dos axônios visuais em áreas correspondentes à denervação. Os dados sugerem que a serotonina seja um importante modulador do desenvolvimento e plasticidade do SNC.

ABSTRACT

The development of the central nervous system (CNS) is characterized by several mechanisms that are necessary to the formation of adequate neural contacts. In rodents the specificity of neural circuitry develops at post natal ages during a critical period when synaptic contacts are sculpted in a process determined by sensory experience. Serotonin has been shown to be involved in both use-dependent development and plasticity. In the present work we studied the role of serotonin on normal and abnormal development of retinotectal pathways in a retinal lesion model during and after the critical period. Animals were submitted to either acute or chronic treatment with PCPA, a tryptophan hydroxylase inhibitor, during 2 to 28 days after birth. We then analyzed the immunoreactivity for serotonin in both dorsal and ventral raphe nuclei. Following an acute treatment, we observed a marked reduction in serotonin immunoreactivity, but after subchronic or chronic treatments we observed a recovery and increase in 5-HT positive neurons, respectively. Chronic PCPA treatment affected the topographical development of ipsilateral retinotectal projections with caudally spreading axons and reduced clustering at the ventral border of the visual layers. Similar, but less intense effects were found after a subchronic treatment with this drug. In retinal lesion groups chronic and subchronic PCPA treatment induced a robust plastic reorganization of ipsilateral axons into denervated areas. The data, therefore suggest that serotonin levels are critical for the modulation of development and plasticity of the CNS.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) envolve eventos progressivos tais como a proliferação celular, migração e diferenciação, crescimento de processos neurais e sinaptogênese, além de eventos regressivos que vão desde a degeneração neuronal natural, eliminação de axônios transitórios e restrição sináptica. Os neurônios recém diferenciados, inicialmente, preparam-se para estabelecer conexões com seus alvos, proporcionando assim, a formação de circuitos neurais precisos responsáveis pelo processamento da informação (Finlay & Pallas, 1989, Clarke & Oppenheim, 1995). Estes processos determinarão a especificação dos circuitos neurais responsáveis pela percepção dos sentidos e a coordenação dos sistemas motores e cognitivos que caracterizam o sistema nervoso maduro (Berardi *et al.*, 2000).

Os mecanismos de formação dos circuitos neurais têm sido amplamente estudados nos últimos anos. Esses circuitos são montados durante o desenvolvimento pela formação de conexões organizadas entre neurônios aferentes e seus alvos. Esta organização topográfica constitui uma característica básica do SNC, nos sistemas sensoriais, onde as superfícies sensoriais são representadas de forma ordenada nos núcleos centrais subcorticais e nos córtices.

O sistema visual e em particular, o sistema retinotectal de roedores e vertebrados não-mamíferos, tem sido utilizado nos últimos anos como modelo de desenvolvimento topográfico e plasticidade do sistema nervoso central pela facilidade de abordagem experimental, correlação anatômica e fisiológica entre diversas espécies e pela definição de um período crítico durante seu amadurecimento. (Berardi et al., 2000) O conhecimento gerado tem sido largamente utilizado para a compreensão da organização cerebral, tanto dos sistemas sensoriais quanto cognitivos.

1.1 ANATOMIA DO SISTEMA VISUAL

O sistema visual começa no olho, onde encontramos a retina, o tecido neural que inicia o processamento visual. A retina apresenta diferentes tipos celulares, dentre eles as células ganglionares da retina (RGCs) que são as células eferentes deste tecido, responsáveis por carrear a informação visual até diferentes regiões encefálicas. Os axônios das células ganglionares da retina ao se dirigirem ao disco óptico, tornam-se mielinizados e formam o nervo óptico. (Mey & Thanos, 2000; Thanos & Mey, 2001; Stenkamp & Cameron, 2002). Os nervos ópticos de ambos os olhos combinam-se na base do encéfalo formando o quiasma óptico. Nesta estrutura, as projeções oriundas da

retina nasal sofrem decussação parcial, enquanto que os axônios da retina temporal se projetam ipsilateralmente. Esta decussação parcial permite a cada lado do cérebro receber informações das duas retinas sobre o hemisfério visual contralateral (Schmidt & Tieman, 1985). Este padrão de decussação é variável. Em espécies com olhos frontalizados, como humanos, uma maior proporção de aferentes permanece do mesmo lado do cérebro. Em roedores e outras espécies com olhos lateralizados, somente uma pequena proporção de aferentes segue para o mesmo lado do cérebro. Após a decussação, os axônios das projeções retinofugais (que saem da retina) formam os tratos ópticos e se distribuem pelo núcleo geniculado lateral do tálamo, núcleos pré-tectais e colículo superior (Udin & Fawcett, 1988; Shatz, 1992; 1996) (Fig. 1).

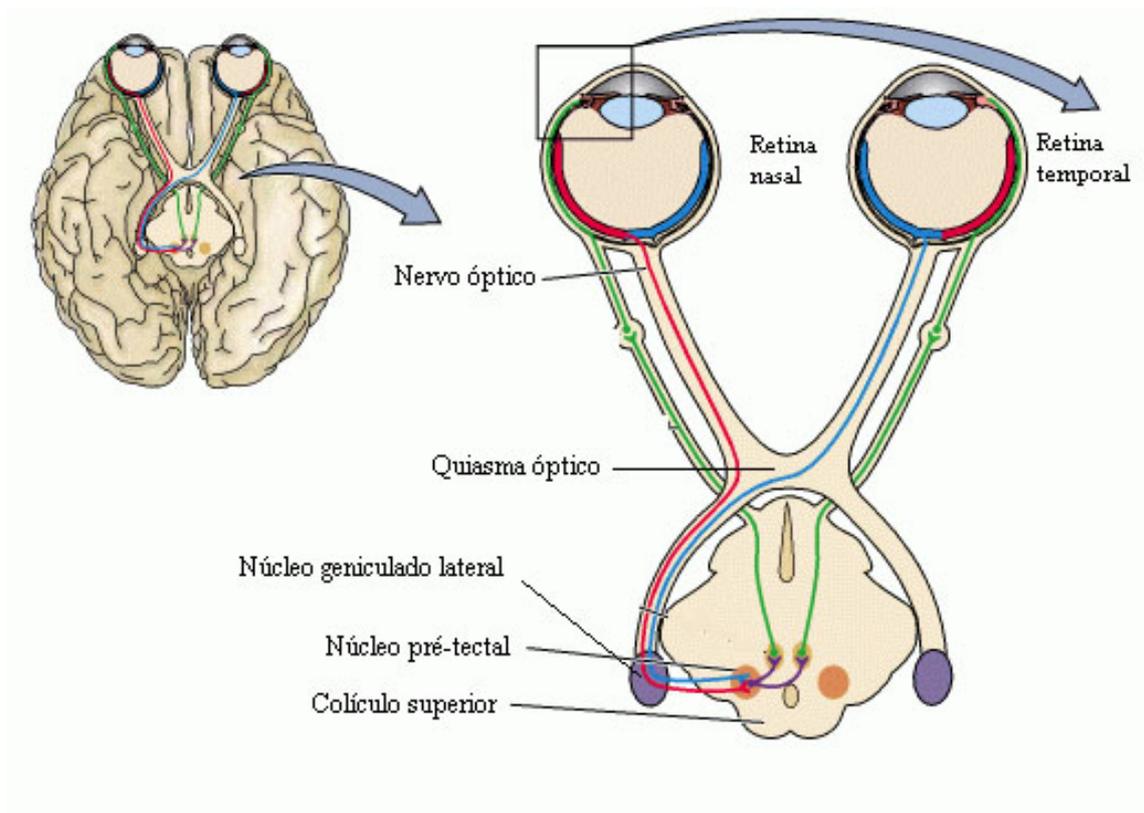


FIGURA 1. Esquema simplificado mostrando as principais vias do sistema visual de humano. Os axônios ipsolaterais (em vermelho) e contralaterais (em azul) de cada olho projetam-se para o núcleo geniculado lateral, núcleo pré-tectal e colículo superior. Destaque para a decussação parcial das projeções retinianas que ocorre no quiasma óptico (Purves et al, 2004).

Em roedores, cerca de 60% dos axônios colaterais do trato óptico inervam o núcleo geniculado lateral (NGL) enquanto que, virtualmente, todas as células ganglionares da retina (CGRs) emitem projeções para o colículo superior. (Linden & Perry, 1983). No núcleo geniculado lateral os axônios originados dos dois olhos terminam em camadas olho-específicas formando campos terminais segregados (Srevatan & Shatz,

1984). O colículo superior é o principal alvo das projeções provenientes da retina de roedores e é considerado uma estrutura homóloga ao teto óptico de vertebrados não-mamíferos (O'Leary *et al.*, 1994, Debski & Cline, 2002). Nele, assim como em outras estruturas visuais, encontramos uma organização retinotópica precisa que reproduz a superfície da retina e conseqüentemente o campo visual.

O colículo superior é uma estrutura laminada, localizada na porção mais dorsal do tronco cerebral, responsável pela integração visuomotora no reflexo orientado e pelo controle dos movimentos sacádicos. Este núcleo é dividido em camadas denominadas *stratum zonal (SZ)*, *stratum griseum superficiale (SGS)*, *stratum opticum (SO)*, *stratum griseum intermediale (SGI)*, *stratum album intermedium (SAI)*, *stratum griseum profundum (SGP)* e *stratum album profundum (SAP)* (Fig. 2). As três primeiras camadas, classificadas em conjunto como camadas superficiais, são responsáveis pelo processamento de informações visuais, enquanto as camadas mais profundas relacionam-se principalmente a funções de integração multimodal de estímulos visuais, auditivos e motores (Dori *et al.*, 1998; Binns, 1999; Isa & Saito, 2001). Além dos aferentes da retina, as camadas visuais do CS também são alvos de projeções oriundas do córtex visual, núcleos parabigeminais (Dori *et al.*, 1998) e de outros núcleos não visuais como os núcleos da rafe (Arce *et al.*, 1992, Parsons *et al.*, 2001).

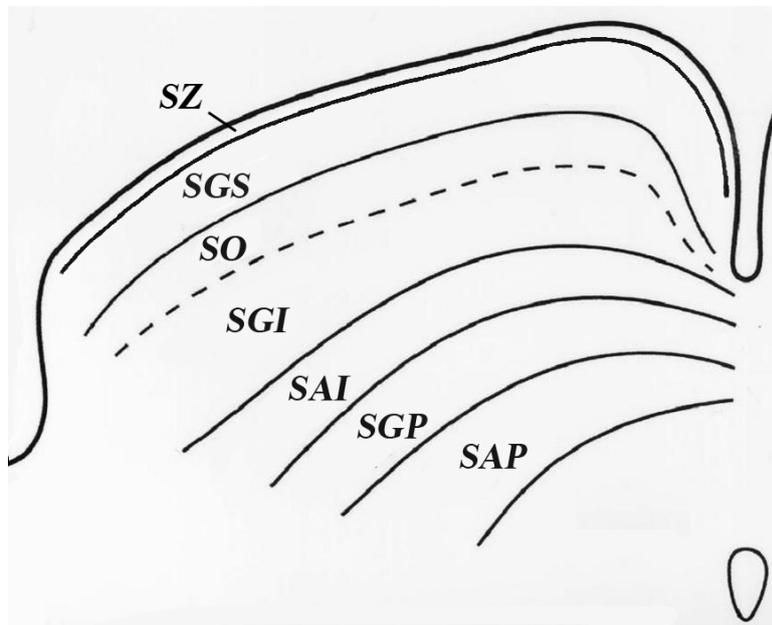


FIGURA 2 – Esquema que ilustra a laminação no colículo superior em um plano de corte coronal. A linha pontilhada delimita as camadas de processamento visual na região dorsal e as camadas profundas de processamento auditivo, motor e integração de informações. (Parsons *et al.*, 2001)

O *stratum griseum superficiale* (SGS) constitui a principal camada que recebe os aferentes pré-sinápticos ipsolaterais da retina (Müller *et al.*, 2000). O transporte anterógrado de traçadores neuroanatômicos mostra que, em roedores, os terminais ipsolaterais da retina formam aglomerados de marcação terminal no limite ventral do SGS enquanto que os aferentes contralaterais ocupam toda a extensão radial das camadas visuais superpondo-se consideravelmente às projeções ipsolaterais (Hofbauer & Drager, 1985).

1.2 DESENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS SENSORIAIS

Durante a embriogênese do sistema nervoso central, várias etapas constituem pontos cruciais do desenvolvimento tais como a histogênese precoce com a formação de primórdios do tecido neural, a neurogênese e gliogênese e por fim, o processo de sinaptogênese e amadurecimento dos circuitos neurais (Ballabriga, 1990; Morgane *et al.*, 1993).

Os processos de diferenciação cerebral incluem uma infinidade de fenômenos regressivos que vão desde a degeneração programada de parte das células inicialmente geradas durante a embriogênese - a chamada morte celular programada - até a eliminação de sinapses e axônios transitórios em fases finais do desenvolvimento (Finlay & Pallas, 1989; Shatz, 1993; Clarke & Oppenheim, 1995).

Uma das características mais marcantes dos sistemas sensoriais, e particularmente do sistema visual, é o da representação topográfica da superfície receptora no tecido neural. Desta forma, a imagem do campo visual é representada nos núcleos visuais centrais de forma que pontos adjacentes na retina são reproduzidos em regiões adjacentes no tecido neural. O mapa retinotectal maduro possui uma orientação antero-posterior e naso-temporal, onde axônios provenientes da retina temporal se projetam para a região anterior do CS, enquanto que axônios da retina nasal se projetam para a região posterior do CS . Da

mesma forma, axônios com origem na retina ventral alcançam alvos no CS medial e projeções oriundas da retina dorsal alcançam alvos no CS lateral (Drescher *et al.*, 1995, 1997; Mey & Thanos, 2000; Debski e Cline, 2002; Thanos & Mey, 2001) (Fig. 3).

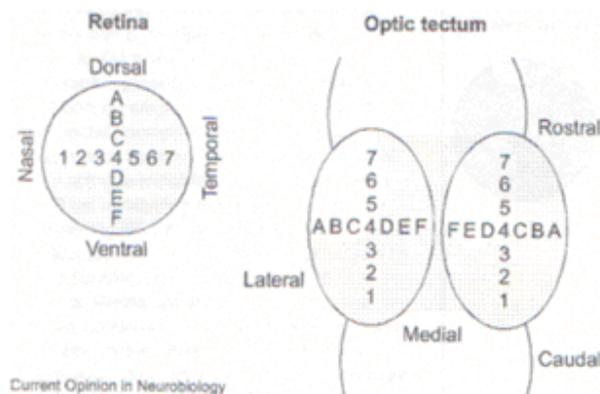


FIGURA 3. Esquema representando a topografia retinotectal. Na retina os números de 1-7 e as letras de A-F representam áreas específicas no eixo nasal-temporal e dorsal-ventral respectivamente, que se correlacionam com áreas específicas no tecto óptico. (Debski e Cline, 2002)

Após a diferenciação e migração neuronal, as células alvo são selecionadas para iniciar a formação de sinapses. Na década de 60, Roger Sperry propôs a teoria da quimioafinidade onde os axônios, ao navegarem rumo ao alvo, interagem com moléculas que atuam como pistas químicas e influenciam a velocidade e o direcionamento do crescimento axonal (Retax & Harris, 1996). Uma classe de moléculas com propriedades repulsivas/atrativas foram descritas em 1993. Estas

moléculas, pertencentes à família das efrinas, estão distribuídas na retina e no colículo superior. Seus receptores são encontrados em baixa concentração em axônios de células ganglionares da retina nasal e em alta concentração na retina temporal. A disposição destas moléculas e de seus receptores influencia o desenvolvimento inicial do mapa retinotectal, pois os aferentes das células ganglionares da retina se distribuem de acordo com o gradiente de concentração destas moléculas (Drescher *et al.*, 1995; Bähr & Wizenmann, 1996; Knöll *et al.*, 2001; Knöll & Drescher, 2002). Outras moléculas, como as pertencentes à família das caderinas, encontradas em neurônios, células gliais, cones de crescimento e moléculas de adesão celular (CAMs), atuam como promotoras do crescimento axonal no desenvolvimento do sistema nervoso (Holt & Harris, 1998). Um conjunto de moléculas presentes na matriz extracelular interage com receptores de superfície celular e regulam uma série de eventos importantes à maturação do SNC incluindo a proliferação, diferenciação e migração celular, crescimentos de neuritos, orientação de cone de crescimento, estabilização sináptica, regeneração e apoptose. (Letourneau *et al.*, 1994, Anton *et al.*, 1999, Sbeith & Corfas, 2002).

Após esta primeira fase independente de atividade elétrica, surgem mecanismos relacionados à atividade entre as células ganglionares da retina. Sabe-se que essa atividade independe da

estimulação elétrica, visto que ainda não ocorreu o desenvolvimento dos fotorreceptores. Cada célula tem sua atividade sincronicamente correlacionada com a atividade de seu vizinho mais próximo. Esta correlação é necessária para ativar e estabilizar sinapses entre as projeções retinianas e seus neurônios-alvo pós-sinápticos. Outros aferentes que, durante intensa competição, não forem capazes de ativar a célula alvo com tanta eficiência serão eliminados (Wong *et al.*, 1993).

1.2.1 Desenvolvimento do Sistema Retinotectal

No sistema visual dos roedores, as células ganglionares da retina são geradas entre os dias embrionários 14 e 22 (E14 – E22), com um máximo entre os dias embrionários 16 e 17 (E16 – E17) (Reese & Collelo, 1992). Em E16, os axônios provenientes da retina chegam ao colículo superior e por volta de E17 ocorrem as primeiras sinapses (Lund & Lunt, 1976).

O desenvolvimento das camadas superficiais do colículo superior inicia-se em E14, prolongando-se até o final do período de gestação por volta do vigésimo primeiro dia embrionário. Essa neurogênese tem seu pico entre E15- E16, juntamente quando emergem os primeiros aferentes retinianos (Altman & Bayer, 1981).

As projeções retinotectais apresentam, durante fases iniciais do desenvolvimento, um padrão no qual os axônios retinianos inervam de maneira pouco organizada e difusa as camadas superficiais do colículo superior. Ao atingir o colículo superior, os axônios ipsolaterais provenientes da retina temporal crescem e se arborizam, ocupando de forma difusa quase toda a extensão do *stratum griseum superficiale*. Inicialmente estas projeções apresentam um padrão topográfico desorganizado (Land & Lund, 1979; Serfaty & Linden, 1994) (Fig. 4 A, B e E). Por volta da segunda semana pós-natal, esses axônios sofrem um processo de reorganização que resulta em uma restrição topográfica onde assumem um grau de desenvolvimento similar ao do animal adulto. Estes aferentes formam pequenos aglomerados de marcação no limite ventral do *Stratum Griseum Superficiale* (SGS) e limite dorsal do *Stratum Opticum* (SO), no terço anterior do colículo superior. Esse processo é essencial para possibilitar a correta representação do campo visual nos núcleos visuais (Lund *et al.*, 1980; Hofbauer & Drager, 1985; Serfaty & Linden, 1994) (Fig. 4 C, D e F).

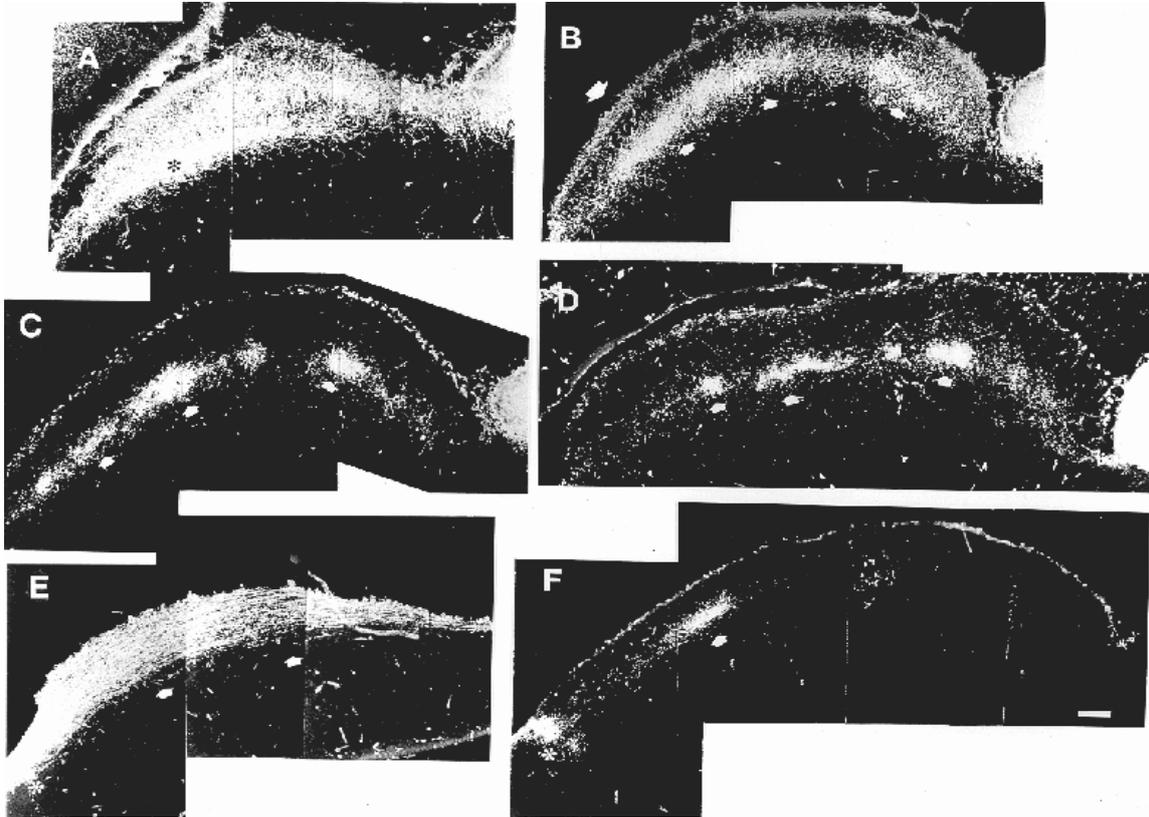


FIGURA 4. Fotomicrografia de campo escuro mostrando a progressiva restrição tótopográfica das projeções retinotectais ipsolaterais no terço anterior do colículo superior. Os ratos receberam injeção intraocular de peroxidase no dia pós-natal 0 (DPN0) (A-plano coronal, E-plano parassagital), DPN3 (B-plano coronal), DPN5 (C-plano coronal, F-plano parassagital), e DPN10 (D-plano coronal). Notar que as projeções transitórias entre DPN0-3 (A, B e E), se restringem entre DPN5-10 (C, D e F) a aglomerados de marcação terminal em regiões profundas do SGS. (Serfaty & Linden, 1994)

1.3 ATIVIDADE ELÉTRICA E A PLASTICIDADE USO-DEPENDENTE DO SNC

A especificação dos circuitos neurais ocorre no período pós-natal e depende, em grande parte, da experiência sensorial. Este processo determina a maneira como os neurônios se conectam a fim de dar funcionalidade aos processos fisiológicos da percepção sensorial, do desenvolvimento psico-motor e cognitivo, conferindo ao indivíduo a capacidade adaptativa necessária à sobrevivência (Singer, 1990). A atividade neural é requerida para a formação da sintonia fina do mapa retino-tectal no colículo superior e para a segregação olho-específico no NGL e córtex visual. O bloqueio da atividade elétrica previne o refinamento destas características, como mostraram os trabalhos utilizando TTX, uma toxina que se liga irreversivelmente aos canais de sódio voltagem-dependente bloqueando a atividade elétrica em peixes, anfíbios e mamíferos. (Meyer, 1982; Schmidt & Edwards, 1983; Schmidt & Tieman, 1985).

Em roedores pode ser observada a atividade elétrica espontânea entre as células ganglionares da retina em E18 (Gallé & Maffei, 1988), no entanto, somente entre o dia pós-natal (DPN) 12-13 é que são detectadas respostas evocadas no colículo superior, justamente no período em que o animal está prestes a abrir os olhos (o que ocorre em

DPN 14) (Molotchonikoff & Itaya, 1993). Recentemente foi demonstrado que esta atividade espontânea interfere de forma decisiva na formação de campos receptivos e, portanto, no processamento visual do colículo superior (Mrsic-Flogel *et al.*, 2005). A experiência visual, que ocorre a partir do DPN 13-14 com a abertura dos olhos, influencia determinantemente o desenvolvimento topográfico e a plasticidade dos aferentes visuais.

A atividade elétrica sincronizada entre células ganglionares vizinhas gera a somação de potenciais pós-sinápticos excitatórios nas células-alvo. Essa soma de potenciais determina a estabilização dessas sinapses, sendo este um dos mecanismos responsáveis pelo refinamento e pelo ordenamento topográficos de padrões iniciais de inervação (Fawcett & O'Leary, 1985; Debski & Cline, 2002). Desta forma a atividade sincronizada entre células ganglionares vizinhas, seja por atividade elétrica espontânea ou evocada, proporciona uma maior eficácia na ativação de células-alvo, importante no refinamento topográfico.

As projeções retinianas que alcançam o colículo superior são eminentemente glutamatérgicas. Os receptores pós-sinápticos para glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) estão intimamente relacionados a esse processo de indução de refinamento. Sua ativação só ocorre quando a membrana pós sináptica é despolarizada por

estímulos excitatórios concomitantes mediados principalmente por receptores AMPA/Kainato (Debsk e Cline, 2002). O influxo de cálcio a partir da ativação do receptor NMDA fortalece as conexões sinápticas.

A plasticidade neural pode ser definida por mudanças adaptativas na estrutura e função do sistema nervoso como resposta às modificações do ambiente interno e externo. Consiste no rearranjo de conexões sinápticas que, durante o desenvolvimento e em menor intensidade na vida adulta, é essencial para a formação adequada dos circuitos neurais. Isto se dá de forma uso-dependente e envolve extensa reorganização dos circuitos imaturos. Esse rearranjo é determinado pela capacidade de formação e estabilização de sinapses.

Os processos de refinamento das projeções retinotectais são mediados principalmente por mecanismos celulares de potenciação e depressão sináptica de longa duração (LTP e LTD), resultando na formação de conexões precisas no adulto (Mu & Poo, 2006). A evidência de que a LTP e a LTD participam do refinamento é mais recente. Enquanto a LTP, no desenvolvimento cerebral, leva a um fortalecimento e estabilização das sinapses pela potenciação da transmissão sináptica (Crair & Malenka, 1995), a LTD leva a um enfraquecimento e eventual eliminação das sinapses em decorrência de sua depressão. Portanto a LTD, estaria envolvida na eliminação de sinapses assíncronas

contribuindo para a sintonia fina dos mapas sensoriais (Mize & Lo, 2000).

1.4 PERÍODO CRÍTICO

A fase do desenvolvimento durante a qual o SNC amadurece para se adaptar da forma ativa ao meio é conhecida como período crítico. Durante este período, os processos de desenvolvimento do SNC ocorrem de forma dinâmica e envolvem alterações anatômicas, fisiológicas e neuroquímicas, sensíveis a estímulos oriundos do meio-ambiente. Esta janela temporal é relevante para diversos níveis de aquisição de habilidades, tais como o desenvolvimento da acuidade sensorial, desenvolvimento motor e aquisição da linguagem (Berardi *et al.*, 2000). Ao nível celular, o período crítico corresponde à etapa do desenvolvimento onde os processos neuroquímicos determinam a forma final dos circuitos neurais - a especificação sináptica.

O período crítico foi extensamente estudado em modelos experimentais que utilizaram o sistema visual de mamíferos (roedores, felinos e primatas). As conexões do sistema nervoso, em particular, as conexões visuais desenvolvem-se, em períodos embrionários e neonatais, a partir de projeções axonais difusas e desorganizadas, características de estágios precoces do desenvolvimento. Na camada IV

do córtex visual primário maduro, por exemplo, os axônios que carregam informação originária dos dois olhos se distribuem de forma intercalada formando as colunas de dominância ocular (Hubel & Wiesel, 1962). Esta organização colunar se estabelece gradativamente durante o desenvolvimento pós-natal a partir de uma sobreposição inicial dos axônios visuais. Portanto, para que os circuitos que compõem o sistema nervoso funcionem de forma adequada, é necessário um "ajuste" sináptico através do qual diversas populações de neurônios formem contatos apropriados. Este período representa, portanto, uma fase do desenvolvimento na qual os axônios visuais apresentam uma grande capacidade de reorganização em resposta à lesões, modificações no padrão de estimulação ambiental ou alterações farmacológicas sobre os sistemas de neurotransmissores (Constantine-Paton *et al.* 1990). Como resultado o sistema nervoso desenvolve uma extraordinária capacidade de se adaptar às variadas condições do meio ambiente.

Estes períodos são típicos de cada espécie (tabela 1), sendo que na espécie humana não existem dados claros na literatura que delimitem com segurança os períodos críticos para maturação dos sistemas sensoriais, motores e cognitivos. Estima-se que grande parte destes processos se estenda até os 5-12 primeiros anos de vida (Berardi *et al.*, 2000). Em roedores, o período crítico de desenvolvimento do

sistema visual estende-se até a segunda/terceira semana de vida pós-natal (Land & Lund, 1979).

TABELA I Períodos Críticos de Desenvolvimento do Sistema Visual

ESPÉCIE	PERÍODO CRÍTICO	REFERÊNCIA
Roedores	2-3 semanas após o nascimento	(Land& Lund, 1979) (Serfaty, 1994)
Felinos	3 ^a à 9 ^a semana após o nascimento	(Cynader et al. 1990)
Primatas	12 semanas pós-natal	(Hubel & Wiesel, 1962)
Humanos	5-12 anos após o nascimento	(Berardi et al, 2000)

1.5 O SISTEMA SEROTONINÉRGICO.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) tem sido descrito como um neurotransmissor modulatório amplamente distribuído no sistema nervoso central. Os neurônios serotoninérgicos estão localizados nos núcleos da rafe e consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios do tronco cerebral que estão organizados ao longo da linha média originando projeções ascendentes e descendentes. (Zigmond et al, 1999).

Dahlstrom e Fuxe em 1964, utilizando marcadores fluorescentes, descreveram nove grupos de núcleos serotoninérgicos aos quais

designaram B1 (palidus), B2 (obscurus), B3 (paragigantus cellularis), B4 (magnus), B5 (pontis), B6 e B7 (dorsalis), B8 (centrais superior), B9 (tegmental reticular da ponte). Neuroanatomicamente, os núcleos da rafe são divididos em grupos rostrais (B7, B8 e B9) os quais correspondem aos núcleos dorsalis (NRD), medianus (NRM) e centralis superior, respectivamente e o grupamento caudal (B1 a B6). (Fig. 5) Estes núcleos recebem aferentes de várias regiões do SNC incluindo o córtex, hipotálamo, núcleo reticular, tronco cerebral, medula espinhal e habênula (Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1997; Adell et al, 2002). Além da serotonina foram também identificados nos núcleos da rafe terminais contendo outros neurotransmissores incluindo norepinefrina, dopamina, acetilcolina, ácido gama-amino-butírico (GABA) e substância P e neurotensina. Os neurônios da rafe por sua vez, inervam praticamente todas as regiões do encéfalo, enviando axônios colaterais a áreas do cérebro com funções relacionadas (Azmitia, 1999). O núcleo B7 que compõe o NRD projeta seus aferentes para o colículo superior, inferior e parte do tálamo. O sistema serotoninérgico é um dos primeiros a surgir no sistema nervoso podendo atuar como fator trófico em fases iniciais do desenvolvimento. Em ratos, os níveis de serotonina são altos no cérebro imaturo assim como a expressão de receptores de alta afinidade no período perinatal (Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1997). Foi descrito que estes neurônios emergem dos núcleos da rafe entre E11 e E12 e

sua maturação só é considerada completa em um período que se estende de E19 até o final do período crítico em DPN 21 (Lautenschlager *et al.*, 2000). O surgimento precoce deste neurotransmissor no sistema nervoso, antes das outras monoaminas, indica que a serotonina pode ser requerida para guiar o desenvolvimento dos outros sistemas de neurotransmissores. (Benes *et al.*, 2000; Azmitia , 1999). No colículo superior as fibras serotoninérgicas oriundas deste núcleo estão presentes desde a chegada dos primeiros aferentes da retina (Beitz *et al.*, 1986; Rhoades *et al.*, 1990).

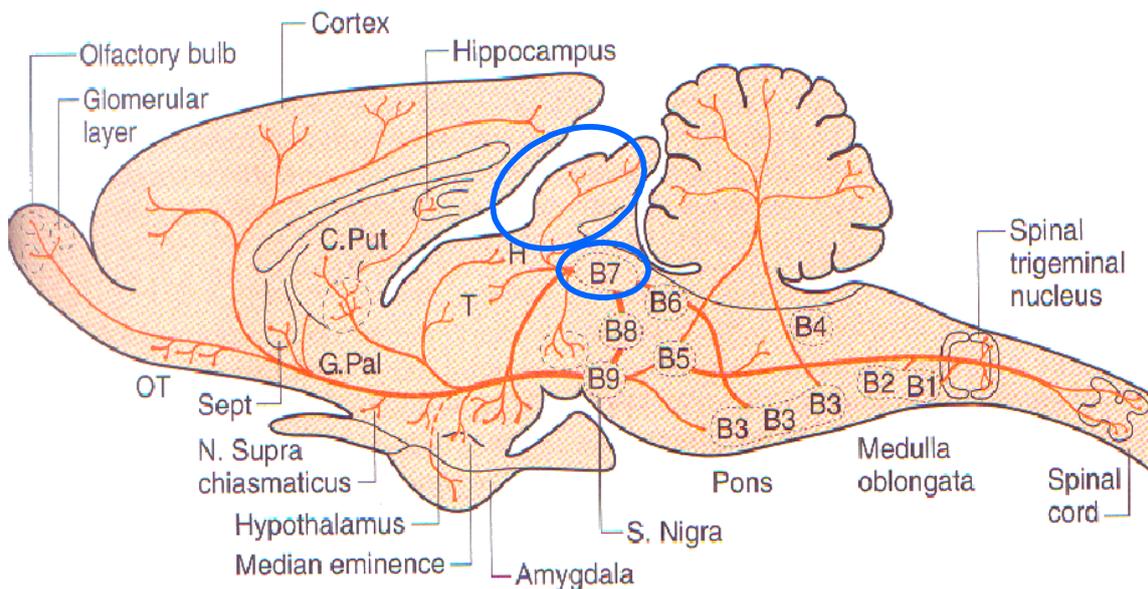


FIGURA 5. Esquema mostrando os núcleos da rafe e as suas projeções. O núcleo B7 emite projeções para o colículo superior (Siegel *et al.*, 1999)

1.5.1 Síntese e liberação da serotonina

O neurotransmissor serotonina é sintetizado a partir do aminoácido triptofano nos neurônios do núcleo da rafe mediana mesencefálica. Por suas características hidrofílicas a serotonina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), e é sintetizada no SNC. Sua síntese ocorre através da captação ativa do triptofano plasmático por carreadores de aminoácidos neutros na BHE, por esta razão a variação do triptofano plasmático influencia profundamente a produção de serotonina nos núcleos da rafe (Blundell, 1992). A enzima *triptofano hidroxilase*, presente nos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, converte o aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) a partir de uma hidroxilação na posição cinco do anel aromático do aminoácido. A seguir, o 5-HTP é descarboxilado pela enzima ácido-amino-aromático decarboxilase (AADC), formando então a 5-hidroxitriptamina ou serotonina (Eaton *et al.*, 1993; Azimitia, 1999). O AADC também é encontrado em neurônios catecolaminérgicos onde é responsável pela conversão da 3,4-dihidroxifenilamina (DOPA) em dopamina (Siegel, 1999) (Fig. 6).

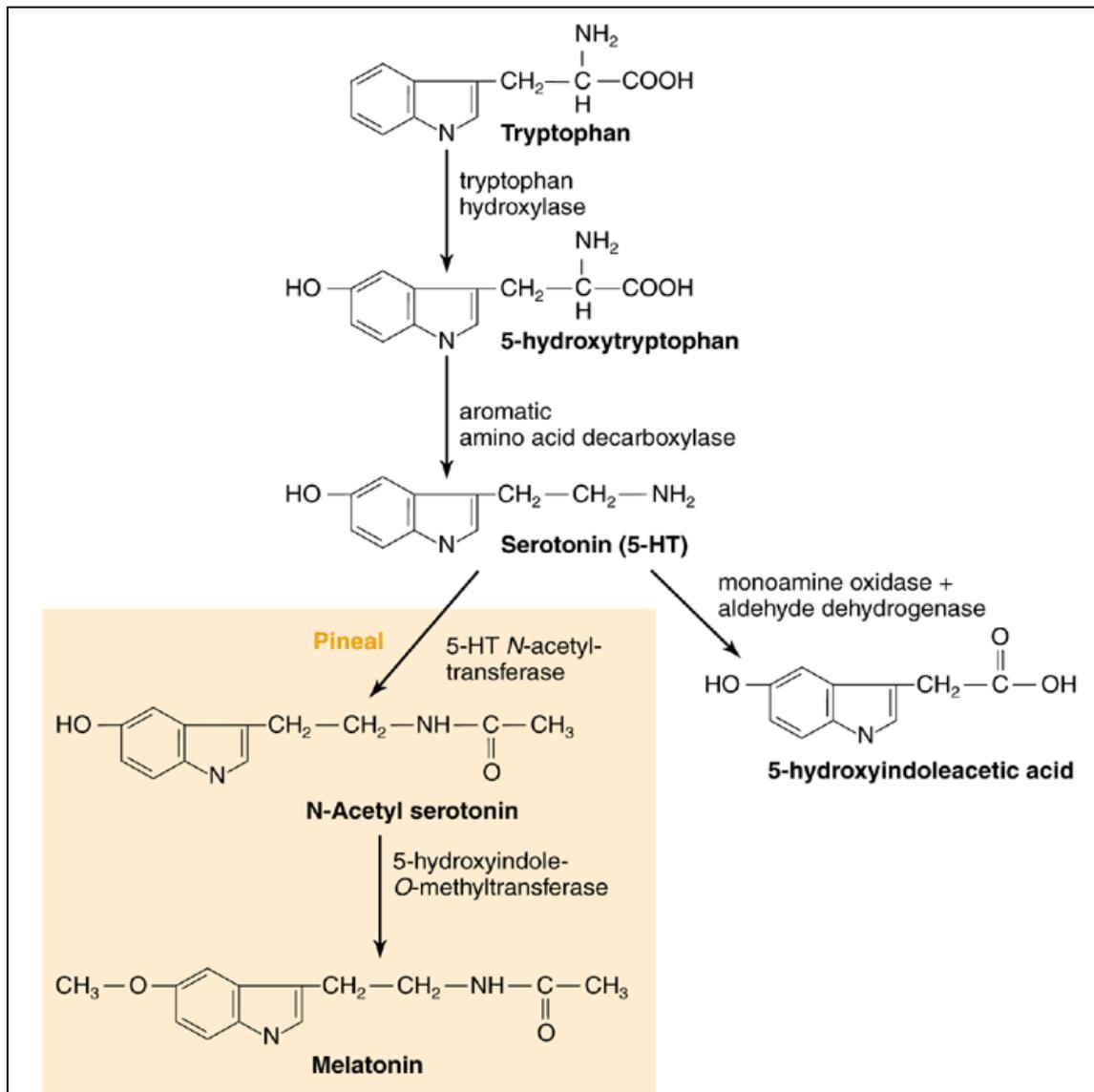


FIGURA 6. Esquema mostrando as vias de síntese e degradação da serotonina (Siegel *et al.*, 1999)

A hidroxilação inicial do triptofano em 5-HTP pela enzima triptofano hidroxilase é alvo de estratégias para bloquear a síntese de serotonina. O inibidor enzimático mais utilizado em trabalhos experimentais é o paraclorofenilalanina (PCPA). *In vivo*, o PCPA inibe irreversivelmente a enzima triptofano hidroxilase, incorporando-se à enzima para produzir uma proteína inativa. Esta inativação produz marcante depleção de estoques de serotonina no cérebro, tecidos periféricos e sangue de ratos e cães (Koe & Weissman, 1966). Seu pico de ação é alcançado rapidamente, 2-3 dias após a administração, podendo diminuir até 90% os níveis de serotonina. Ao contrário das outras drogas utilizadas para depletar a serotonina, como anfetaminas, diidroxitriptamina que são neurotoxinas, o PCPA não produz dano à inervação serotoninérgica. Mesmo com a acentuada diminuição dos níveis de serotonina, os níveis de outras catecolaminas sofrem pouca ação desta droga, deixando evidente a especificidade do PCPA (Koe, 1971).

Após a síntese, a serotonina é armazenada em vesículas através de um mecanismo mediado por bomba de prótons. A despolarização do neurônio serotoninérgico induz a liberação vesicular deste neurotransmissor na fenda sináptica, através de um processo dependente de Ca^{++} . Esta liberação é controlada por auto-receptores pré-sinápticos.

Uma vez liberada na fenda sináptica, a serotonina tem sua ação encerrada pelo transportador SERT, localizado nos neurônios serotoninérgicos. Trata-se de uma proteína transmembrana pertencente à família de transportadores de neurotransmissores dependentes de Na^+/Cl^- , que capta a serotonina, regulando seus níveis na sinapse (Biakely *et al.*, 1994; Borowsky *et al.*, 1995). Drogas psicoativas, como a fluoxetina, a paroxetina, a fluvoxamina, o citalopram, utilizadas no tratamento da depressão, transtornos de ansiedade e outras desordens psiquiátricas, se ligam seletivamente à SERT inibindo a recaptação de serotonina (Lesch, 2005).

Um outro processo para terminar a ação da serotonina é a degradação enzimática pela enzima monoamina oxidase (MAO) localizada no terminal pré-sináptico e na membrana mitocondrial. A MAO tipo A ou tipo B converte a serotonina em 5-hidroxiindolacetaldeído (5-HIAA) e este produto é oxidado por um NAD⁺-desidrogenase aldeído-dependente, formando ácido 5-hidroxi indoacético. O 5-hidroxiindolacetaldeído também pode sofrer ação de uma NADH-aldeído para formar o álcool 5-hidroxitriptofol. O produto final da serotonina na via de degradação irá depender da razão NAD⁺/NADH no tecido (Zigmond *et al.*, 1999).

1.5.2 RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

A serotonina possui diversos receptores amplamente distribuídos no organismo. Esses receptores foram divididos em 7 famílias, entre eles: 5-HT1; 5-HT2; 5-HT3; 5-HT4; 5-HT5; 5-HT6; 5-HT7. Com exceção do receptor 5-HT3, pertencente à família de receptores acoplados a canais iônicos seletivamente permeáveis a sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cálcio (Ca⁺), os demais receptores estão incluídos na superfamília de receptores acoplados a proteína G (metabotrópicos). Sua estimulação afeta várias enzimas efetoras incluindo adenilil ciclase, fosfolipase A e C e canais de cátions, especialmente canais de K⁺ e Ca⁺⁺, através da ativação de proteínas G específicas. Existem no mínimo 14 subtipos diferentes de receptores serotoninérgicos que foram clonados de tecidos de mamíferos (Barnes & Sharp, 1999; Raymond *et al.*, 2001).

A família 5-HT1 contém receptores que são acoplados negativamente a adenilil ciclase e inclui os receptores 5-HT 1A, 1B, 1D, 1E e 1F. O receptor 5-HT1A foi o primeiro a ser clonado e além de inibir a síntese de AMPc também leva a hiperpolarização da célula através da ativação de canais de potássio. Agonistas 5-HT1A induzem inibição da PKA e da fosforilação do fator de transcrição CREB (P-CREB), em culturas de neurônios hipocâmpais. Este receptor, nos núcleos da rafe localiza-se em terminais pré-sinápticos e atua como auto-receptor

somato-dendrítico enquanto nas áreas alvo dos neurônios serotoninérgicos, como o hipocampo, ele corresponde a heteroreceptores localizados em terminais pós-sinápticos (Lanfumeey, 2000). O receptor 5-HT1B é expresso tanto em neurônios serotoninérgicos como não-serotoninérgicos, atuando como auto- e hetero-receptores, respectivamente. Este receptor está distribuído em diferentes regiões do SNC e encontra-se predominantemente ao nível pré-sináptico (Sari, 2004). Em diversos tipos celulares este receptor também está associado à via das ERKs (Raymond *et al.*, 2001). Tanto os receptores 5-HT1A quanto 5-HT1B são amplamente distribuídos nas camadas visuais do colículo superior (Mooney *et al.*, 1996; Sari, 2004). O receptor 5-HT1D é conhecido por suas funções inibitórias atuando como autoreceptor nos terminais serotoninérgicos (Barnes *et al.*, 1999; Del Angel-Meza *et al.*, 2002) inibindo a liberação de serotonina na rafe mesencefálica, hipocampo e córtex frontal (Raymond *et al.*, 2001). A família 5-HT2 possui três subtipos de receptores sendo eles classificados como 5-HT2A, 5-HT2B e 5-HT2C. Eles atuam ativando a fosfolipase C aumentando os níveis de Ca^{++} intracelular (Barnes, 1999). O receptor 5-HT3, como mencionado anteriormente, é um canal iônico seletivamente permeável a íons Na^+ , K^+ e Ca^{++} , sendo distribuído tanto centralmente como periféricamente nos tecidos (Siegel *et al.*, 1999; Barnes *et al.*, 1999). Os receptores 5-HT4, 5-HT6 e 5-HT7 estão acoplados a proteína

Gs a qual ativa a adenilil ciclase. A família do receptor 5-HT5 contém dois subtipos 5-HT5A e 5-HT5B. Acredita-se que o tipo 5-HT5A esteja acoplado negativamente a adenilil ciclase enquanto que o 5-HT5B está ligado a outro sistema efetor ainda não muito bem caracterizado (Barnes, 1999).

1.5.3 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DA SEROTONINA

A serotonina tem sido implicada na regulação de atividades que regem o comportamento (Jacobs & Fornal, 1999) incluindo apetite, ritmo circadiano (Morin, 1999; Jiang *et al.*, 2000), sono/vigília (Leonard, 1996; Thase, 2000) e fenômenos cognitivos como aprendizado e memória e processos autonômicos (McNamara & Skelton, 1993).

A serotonina é um dos muitos neurotransmissores que participam do controle hipotalâmico sobre a secreção da hipófise, participando da regulação da secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), prolactina e hormônio de crescimento (GH) (Siegel, 1999) No hipocampo, a 5-HT aumenta os receptores para hormônios glicocorticóides os quais diminuem a síntese de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipotálamo inibindo então o estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior sobre as

glândulas adrenais. Ao reduzir os níveis de corticoesteróides a resposta imune é facilitada. (Mossner & Lesch, 1998).

A serotonina também está envolvida na regulação do ritmo circadiano. Essa hipótese tem sido postulada devido à densa inervação de fibras serotoninérgicas provenientes da rafe mesencefálica no núcleo supraquiasmático.

Inúmeros trabalhos vêm estudando o possível envolvimento da serotonina no comportamento alimentar. Estudos farmacológicos têm contribuído para a idéia de que a serotonina possui um efeito inibitório sobre o apetite. Manipulações experimentais dos níveis serotoninérgicos causam alterações na freqüência alimentar (Blundell, 1992; Stubbs, 1999) ao modular negativamente no hipotálamo a ação de mensageiros reguladores do apetite como as leptinas e neuropeptídio Y (Meguid *et al.*, 2000).

A serotonina também está associada à etiologia de diversas doenças mentais, incluindo depressão, ansiedade, esquizofrenia, distúrbios alimentares, transtorno obsessivo compulsivo e síndrome do pânico.

1.5.4 Serotonina e o Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

Atualmente fortes evidências têm mostrado que a síntese de serotonina é crucial durante os primeiros estágios do desenvolvimento de mamíferos. Walther e Bader em 1999 observaram que a expressão de RNA mensageiro para a enzima triptofano hidroxilase é induzida imediatamente após a fertilização, ainda em estágios zigóticos (Walther & Bader, 1999). Outros trabalhos, utilizando PCPA durante a gestação em camundongos, mostraram que a administração desta substância inibidora da síntese de 5-HT causa ausência de citocinese no zigoto e interrompe a divisão de embriões pré-implantados (Walther & Bader, 1999).

O sistema serotoninérgico regula sua própria diferenciação através da ativação de auto-receptores. O desenvolvimento de terminais serotoninérgicos parece ser dependente de um balanço entre forças positivas e negativas. O crescimento positivo é mediado em grande parte pelo S-100 β liberado por astrócitos após ativação do receptor 5-HT_{1A}. A inibição do crescimento ocorre através da ativação do auto-receptore 5-HT_{1B} (Whitaker_Azimitia, 2001).

A serotonina altera o citoesqueleto regulando a proliferação, diferenciação, migração e maturação de vários tipos celulares incluindo

neurônios e astrócitos. Este neurotransmissor também possui importante função no refinamento dendrítico e remodelagem sináptica. Sua ação no desenvolvimento do sistema nervoso central é mediada principalmente pelos receptores 5-HT1A e 5-HT2A. O receptor 5-HT1A desenvolve-se precocemente no sistema nervoso central e através da secreção de S-100 β por astrócitos e atua sobre o crescimento neurítico e plasticidade do sistema nervoso central através da estabilização de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs). Estas ações promovem estabilização intracelular de citoesqueleto e resultam na proliferação e diferenciação celular, promovendo o desenvolvimento neuronal. O 5-HT2A está associado com glicogenólise em astrócitos e aumento da disponibilidade de Ca⁺⁺ em neurônios, culminando em proliferação celular, sinaptogênese e apoptose (Azmitia, 2001, para revisão).

A serotonina também regula a síntese de BDNF no sistema nervoso central. A ativação de seus receptores pode levar a produção de AMPc e ativação de CREB induzindo a transcrição do gene BDNF. O BDNF é uma proteína solúvel pertencente à família das neurotrofinas, sendo conhecida como fator neurotrófico derivado do cérebro. Ela atua no sistema nervoso promovendo neurogênese, sobrevivência de células e plasticidade sináptica e sua ação é mediada pela ativação de seus receptores de alta afinidade TrKB. Durante o desenvolvimento do córtex cerebral e hipocampo, o BDNF induz a diferenciação de células tronco

em neurônios e promove a sobrevivência dos mesmos. Na plasticidade sináptica, ela atua aumentando a potenciação de longa duração (LTP). Inversamente, o BDNF pode estimular o crescimento e sobrevivência de neurônios serotoninérgicos (Mark *et al.*, 2004). Djalali e colaboradores, ao tratar culturas de neurônios derivados da região da rafe de camundongos com BDNF, observaram um aumento no número de neurônios serotoninérgicos e de seus neuritos após 5 horas. Estes efeitos foram inibidos pela utilização de anticorpos contra BDNF ou por bloqueadores do receptor TrkB (Djalali *et al.*, 2005).

No sistema retinotectal, a serotonina atua inibindo a estabilização dos aferentes retinianos tanto em fases precoces do desenvolvimento como em animais adultos (Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1997). O desenvolvimento das fibras serotoninérgicas no colículo superior ocorre paralelamente à maturação das conexões retinotectais (Rhoades *et al.*, 1993; Brusco *et al.*, 1995) e sua densidade é progressivamente reduzida. A diminuição progressiva dos aferentes serotoninérgicos no colículo superior, que ocorre no final da terceira semana pós-natal, é mais um indicativo de que estas sinapses podem estar relacionadas com o desenvolvimento dos axônios visuais retinotectais (Dori *et al.*, 1998). Esta redução foi comprovada por Rind e colaboradores em 2000 ao observarem a atividade da enzima triptofano hidroxilase no núcleo da rafe dorsal entre E18 e DPN8, e sua progressiva redução entre DPN9 e

DPN22. Estas evidências mostram que os níveis de serotonina no SNC são maiores em animais em desenvolvimento se comparados aos animais na fase adulta. Sendo assim, torna-se claro a importância deste neurotransmissor durante a formação de circuitos neurais e na plasticidade sináptica (Rind *et al.*, 2000).

1.5.5 Serotonina e Plasticidade

A serotonina está envolvida nos processos de desenvolvimento neural uso-dependente. Este neurotransmissor é capaz de influenciar a excitabilidade celular e sistemas de segundos mensageiros intracelulares, o que aumenta a despolarização pós-sináptica e facilita a ativação de receptores NMDA. Dependendo do subtipo do receptor envolvido, a serotonina pode exercer funções excitatórias ou inibitórias durante os processos de desenvolvimento neural uso-dependente (Debski *et al.*, 2002). Gu e Singer demonstraram o papel permissivo da serotonina na formação da organização do córtex visual de gatos (Gu e Singer, 1995). Estes pesquisadores utilizaram bloqueadores farmacológicos para receptores serotoninérgicos, do tipo 5-HT1 e 5-HT2, demonstrando uma grande redução na re-distribuição uso-dependente dos circuitos corticais. Outros estudos, demonstram uma relação entre a quantidade de axônios serotoninérgicos e receptores para serotonina,

em núcleos visuais mesencefálicos e corticais em fases precoces do desenvolvimento, com a maturação sináptica do sistema visual, sugerindo que a serotonina tenha um efeito facilitador sobre a organização uso-dependente dos circuitos neuronais (Rhoades *et al.*, 1990; Cynader, 1990).

A serotonina atua no processo de aprendizado e memória ao facilitar a geração da Potenciação de Longa Duração (LTP) entre sinapses no hipocampo (Bliss *et al.*, 1983) e em contrapartida inibe a indução de LTP no córtex visual primário de rato (Edagawa *et al.*, 1999). O receptor para glutamato NMDA está intimamente envolvido no processo de geração de LTP. Este receptor é encontrado nos neurônios pós-sinápticos do hipocampo e sua ativação depende tanto da ligação do glutamato quanto da despolarização prévia da membrana. Esta última desloca o íon Mg^{+} que obstrui seu canal. O receptor NMDA é permeável ao Ca^{++} e o aumento da concentração intracelular deste íon desencadeia mecanismos bioquímicos que aumentam a eficiência da sinapse, induzindo LTP. Estudos mostraram que a LTP no córtex visual primário mediada pelo receptor NMDA é inibido por agonistas 5-HT_{1A} e 5-HT₂ (Kim *et al.*, 2006).

Os receptores serotoninérgicos presentes no hipocampo são responsáveis por cascatas que levam a ativação de enzimas e segundos mensageiros, como Ca^{++} e o AMPc, responsáveis pelo fortalecimento das

conexões. Níveis elevados de AMPc são responsáveis pela ativação de CREB, uma proteína extremamente importante para a manutenção da LTP. Ela se liga a segmentos de DNA regulando assim a síntese de proteínas necessárias a consolidação da memória. O Ca^{++} , por sua vez, leva a ativação de uma proteína chamada CAMkinase II. Após sua ativação pelo complexo Ca^{++} /calmudolina, ela se autofosforila, isto é, ativa-se sozinha. A atividade persistente da CAMK II também pode contribuir para manter a potenciação sináptica. (Beahr & Wizenmann, 1996).

Foi demonstrado que a ativação de receptores 5-HT1B localizados em terminais pré-sinápticos no sistema retinotectal de hamsters adultos, tem efeitos inibitórios sobre a transmissão retinotectal. Como resultado, estas mesmas projeções oriundas da retina podem ser expandidas se houver um aumento da inervação serotoninérgica no colículo superior (Rhoades *et al.*, 1993). Estudos do nosso laboratório utilizando a fluoxetina, um inibidor da recaptação de serotonina, mostraram que este tratamento induziu uma perda da topografia com subsequente reorganização de aferentes retinianos no colículo superior, assim como uma amplificação das respostas plásticas observadas após lesões no sistema visual (Bastos *et al.*, 1999).

1.6 PROJEÇÕES RETINOTECTAIS DE ROEDORES COMO MODELO DE PLASTICIDADE NO SNC.

A via retinotectal de vertebrados mamíferos e não-mamíferos tem sido extensamente utilizada como modelo biológico para o estudo da formação de especificidade das conexões neuronais e no estudo de neuroplasticidade durante o desenvolvimento e após lesões do sistema nervoso central (Constantine-Paton, 1990; Lund *et al.*, 1980; Debbski & Cline, 2002; Campello-Costa *et al.*, 2000; 2006; Serfaty *et al.*, 2005).

Em roedores as projeções da retina sofrem um progressivo refinamento entre a primeira e a segunda semana pós-natal (Land & Lund, 1979, Serfaty e Linden, 1994) de forma que por volta da segunda semana pós-natal os axônios retinianos sofreram um processo de eliminação seletiva e apresentam um padrão morfológico semelhante ao de animais adultos. Axônios do olho ipsolateral arborizam em pequenos aglomerados de terminais localizados em uma região profunda das camadas visuais do colículo superior, mais precisamente, na borda entre o SGS e o SO. (Lund *et al.*, 1980, Serfaty e Linden, 1994).

Estudos utilizando modelos de lesão no SNC são bastante numerosos uma vez que neste tipo de abordagem é possível averiguar a viabilidade ou não de se restabelecer conexões neuronais viáveis e de se identificar elementos envolvidos nesse processo. Vários estudos em

nosso laboratório têm demonstrado plasticidade induzida por lesão na laminação das conexões retinotectais em ratos pigmentados jovens e adultos. Este modelo experimental resulta em modificações na distribuição laminar da projeção retinotectal ipsolateral (Serfaty & Linden, 1994; Serfaty & Linden, 1991; Serfaty *et al.*, 2005). Após lesões unilaterais do trato óptico em ratos neonatos, uma projeção ipsolateral estende-se com grande densidade à superfície do colículo superior onde desloca a projeção do olho contralateral, induzindo segregação binocular (Serfaty & Linden, 1991). Alterações semelhantes na laminação da projeção ipsolateral foram observadas após lesões em porções localizadas da retina temporal em animais jovens e adultos (Fig. 7). Estas lesões induzem a denervação localizada de um setor correspondente no colículo superior contralateral (Frost & Schneider, 1979; Lund & Lund, 1976). Nestas condições, as projeções ipsolaterais do olho intacto, originárias de um número normal de células ganglionares de axônio ipsolateral, apresentam respostas plásticas caracterizadas por uma inervação anômala da superfície do colículo superior (Serfaty *et al.*, 1990).

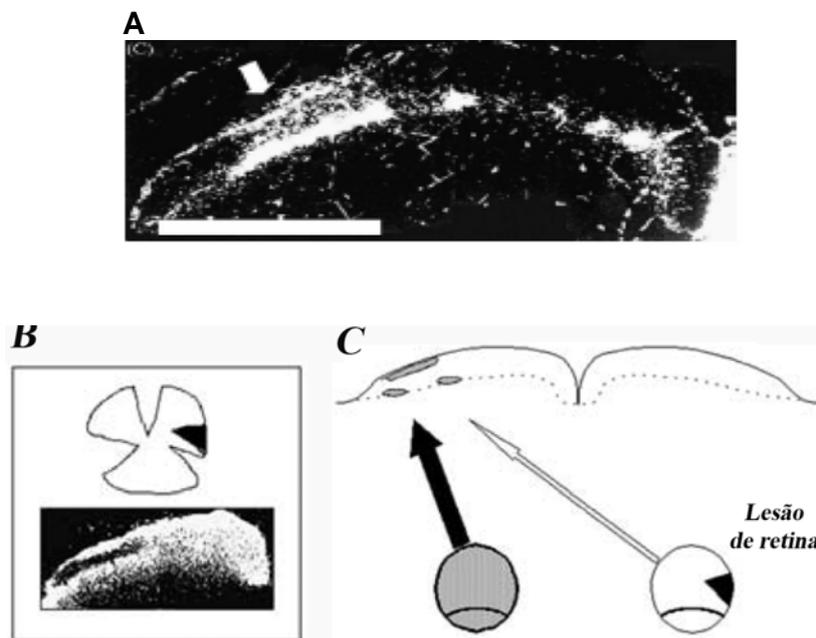


FIGURA 7 – Efeito da lesão de retina temporal no CS. **A**, fotomicrografia de corte coronal do CS de um animal que recebeu lesão de retina em DPN 10 e injeção de HRP no olho intacto 48 hrs depois. Notar a reorganização das projeções ipsolaterais orientada para a superfície (seta) e caracterizada por um padrão bilaminar de marcação. **B**, mapeamento da área lesionada no CS através da injeção de traçador no olho submetido à lesão. **C**, esquema da reorganização dos terminais retinianos a partir do estímulo lesivo no olho contralateral (Serfaty *et al.*, 2005).

Nestas lesões as projeções ipsolaterais apresentam uma tendência a se reorganizar de forma orientada no sentido dorsal. É possível observar que a marcação anterógrada dos axônios ipsolaterais muitas vezes apresenta um padrão bilaminar: uma camada superficial e uma camada mais ventral que exibem intensa marcação, separadas por uma camada intermediária que apresenta pouca ou menor densidade de marcação (Serfaty *et al.*, 2005).

A reorganização induzida pela lesão de retina é especialmente intensa em idades mais precoces, gerando respostas plásticas mais rápidas e robustas do que em fases tardias. Tal efeito parece ser apenas retardado em animais com idades mais avançadas (Serfaty *et al.*, 2005). Classicamente, o fim período crítico de desenvolvimento das projeções retinotectais em ratos está relacionado a uma janela temporal situada entre a segunda e a terceira semana de desenvolvimento. Entretanto, estes dados de lesão de retina demonstram que modificações plásticas ainda podem ser observadas em idades mais avançadas (Serfaty *et al.*, 2005).

Recentemente novos estudos têm demonstrado um importante papel modulatório da serotonina no desenvolvimento e plasticidade induzida do sistema visual. Uma das abordagens utilizadas foi o tratamento farmacológico com um bloqueador de recaptção de serotonina (fluoxetina), cujo efeito fisiológico no colículo superior se dá através da ativação de receptores inibitórios pré- e pós-sinápticos 5HT-1B e 5HT-1A pelo acúmulo de serotonina endógena resultante (Mooney *et al.*, 1998). Dados do nosso grupo mostram que a fluoxetina induz desorganização topográfica tanto na fase de maturação dos axônios retinotectais (entre DPN 0 e DPN 10) quanto em animais juvenis (DPN 28) que apresentam um padrão maduro de conexão. Em animais neonatos, a fluoxetina interfere no desenvolvimento normal da

topografia retinotectal, mantendo axônios espalhados no sentido rostro-caudal e, na maioria dos casos, com ausência de aglomerados de marcação na borda ventral do SGS. Este efeito é parcialmente reversível pela interrupção do tratamento. Em animais juvenis, a fluoxetina foi capaz de induzir uma reorganização das projeções retinotectais reduzindo a densidade de marcação dos *clusters* na borda ventral do SGS e, ao mesmo tempo, promover um espalhamento das fibras no sentido caudal. Adicionalmente foi mostrado que o tratamento crônico com fluoxetina amplifica as respostas plásticas de axônios intactos após lesão de retina, mesmo ao final do período crítico do desenvolvimento, quando este tipo de reorganização axonal é limitada. (Bastos *et al.*, 1999) (Fig. 8).

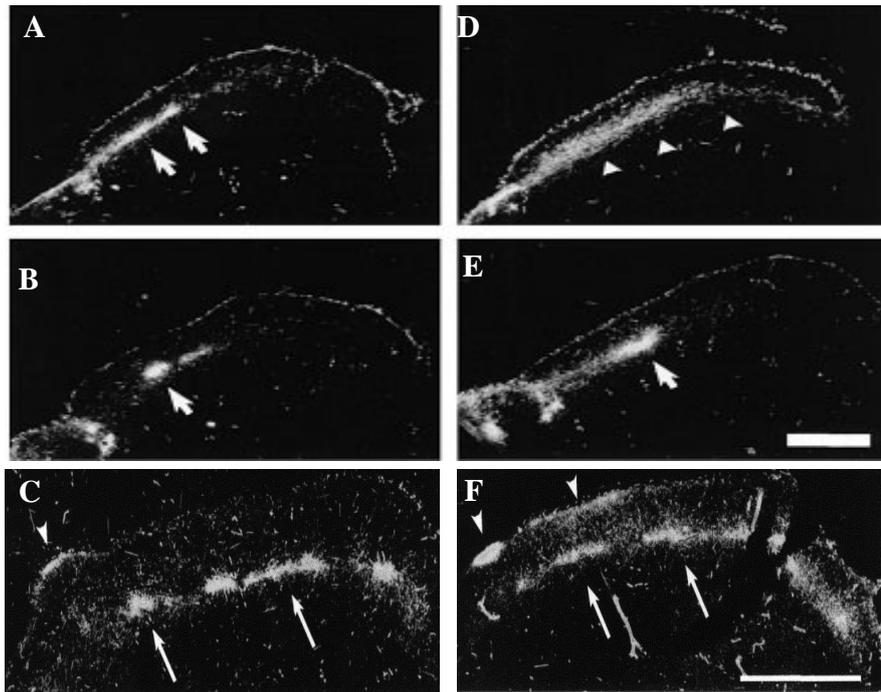


FIGURA 8. Fotomicrografia em campo escuro ilustrando as projeções retinotectais ipsolaterais no colículo superior. Coluna à esquerda mostra animais tratados com salina e à direita com fluoxetina. A-E) Cortes parassagitais em DPN 10. Setas mostram aglomerados de marcação terminal. C e F) Cortes coronais em DPN 28. Cabeças de seta: reorganização das projeções ipsolaterais após lesão de retina em DPN 21. Setas: aglomerados de marcação em camadas profundas do colículo. Escala 500 μ m (Bastos *et al.*, 1999).

Por outro lado, a tese de mestrado de Ericka M.C. González (González *et al.*, 2003, artigo em preparação) mostrou que a redução da serotonina endógena obtida através da restrição dietética de triptofano alterou o padrão de desenvolvimento topográfico das projeções retinotectais de animais em DPN 10 e DPN 21 no grupo com restrição de triptofano (RT). Em DPN 10 foi possível a visualização de várias fibras na região caudal em secções parassagitais do colículo superior, sendo este padrão semelhante a estágios mais precoces do desenvolvimento.

Em DPN 21, os animais do grupo RT apresentaram fibras ectópicas na região caudal do CS menos densas do que aquelas observadas em DPN 10, sendo este resultado compatível com um atraso na eliminação de axônios transitórios no CS. Além disso, a redução crônica deste neurotransmissor através da dieta reduziu dramaticamente a plasticidade induzida por lesão de retina, confirmando desta forma um papel modulatório deste neurotransmissor na plasticidade uso-dependente dos sistemas sensoriais. Este estudo mostrou que animais alimentados com dietas com o requerimento normal de triptofano (CT) apresentam uma reorganização pós-lesão típica dos axônios ipsolaterais (intactos) caracterizada por um aumento da inervação na região superficial/lateral do colículo. Animais alimentados com dietas restritas de triptofano apresentam, por outro lado, uma acentuada redução da inervação superficial, caracterizando, portanto um decréscimo no potencial plástico do sistema visual (Fig. 9).

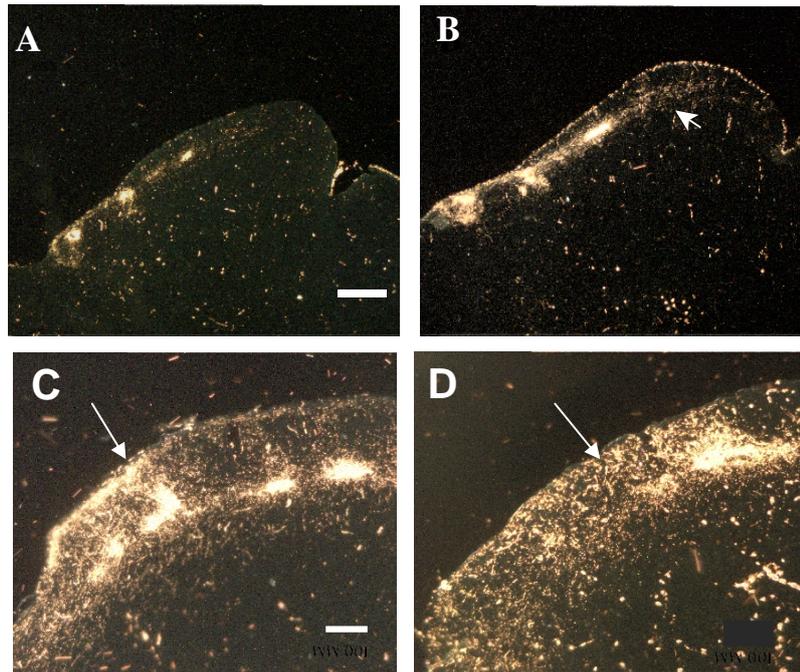


FIGURA 9. Fotomicrografia em campo escuro ilustrando as projeções retinotectais ipsolaterais no colículo superior. A) corte parassagital de animais tratados com dieta CT em DPN10; B) corte parassagital de animais tratados com dieta RT em DPN10; Seta: projeções de fibras na região caudal em animais RT; C) corte coronal de animais tratados com dieta CT até DPN14 e que receberam lesão de retina temporal em DPN 10; D) corte coronal de animais tratados com dieta RT até DPN14 com lesão de retina em DPN 10. Setas: reorganização dos axônios ipsolaterais no colículo superior Escala 300 μm (González *et al.*, 2003, artigo em preparação).

Em continuidade a este trabalho, nosso grupo estudou a questão da reversibilidade dos efeitos plásticos induzido por lesão de retina apresentados por animais tratados com dieta RT. Para tanto, foram utilizados protocolos de realimentação com teor normal de triptofano para roedores durante e após o período crítico. Primeiramente, os animais foram tratados com ração RT até DPN 10 quando foram também submetidos à lesão de retina temporal. A partir do dia da lesão os mesmos foram realimentados com teores normais de triptofano para

roedores até completarem 21 dias. À análise, estes animais apresentaram um aumento da densidade de inervação terminal pós-lesão de retina quando comparados com os animais que receberam dieta RT pelo mesmo período. O padrão de marcação terminal dessas projeções mostrou-se compatível com o encontrado nos animais controles, alimentados com ração padrão nuvital a partir do nascimento, sugerindo que a re-alimentação com a dieta complementada durante o período crítico (antes da 3ª semana) restabelece o padrão de plasticidade retinotectal. Em um outro grupo experimental os animais submetidos à lesão em DPN 10 receberam a dieta RT até DPN 28, idade na qual já se considera ter sido encerrado o período crítico de desenvolvimento do SNC, e foram realimentados com teores normais de triptofano de DPN 28 até DPN 41. Esses animais apresentaram uma redução significativa na densidade óptica da marcação superficial quando confrontados com o grupo controle mostrando que a re-alimentação com triptofano após a 4ª semana (fora do período crítico) não foi capaz de restaurar a plasticidade destas projeções no modelo de lesão de retina (Fig. 10).

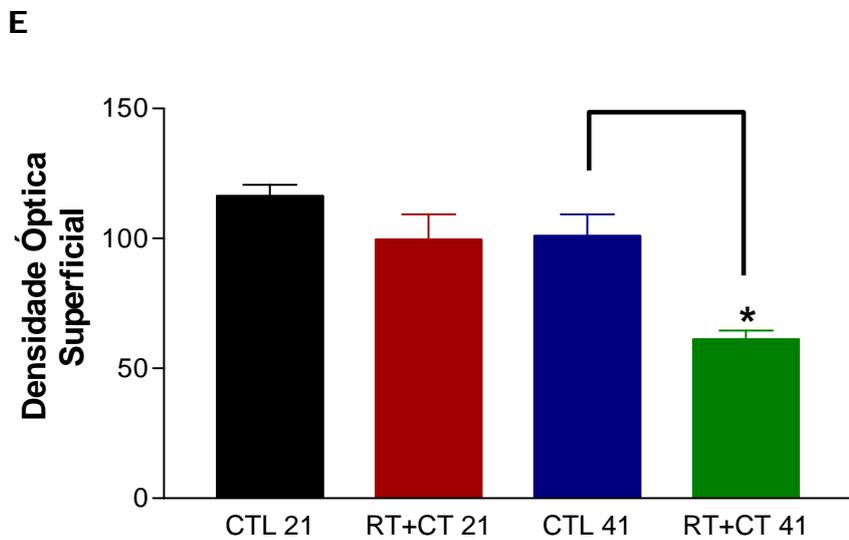
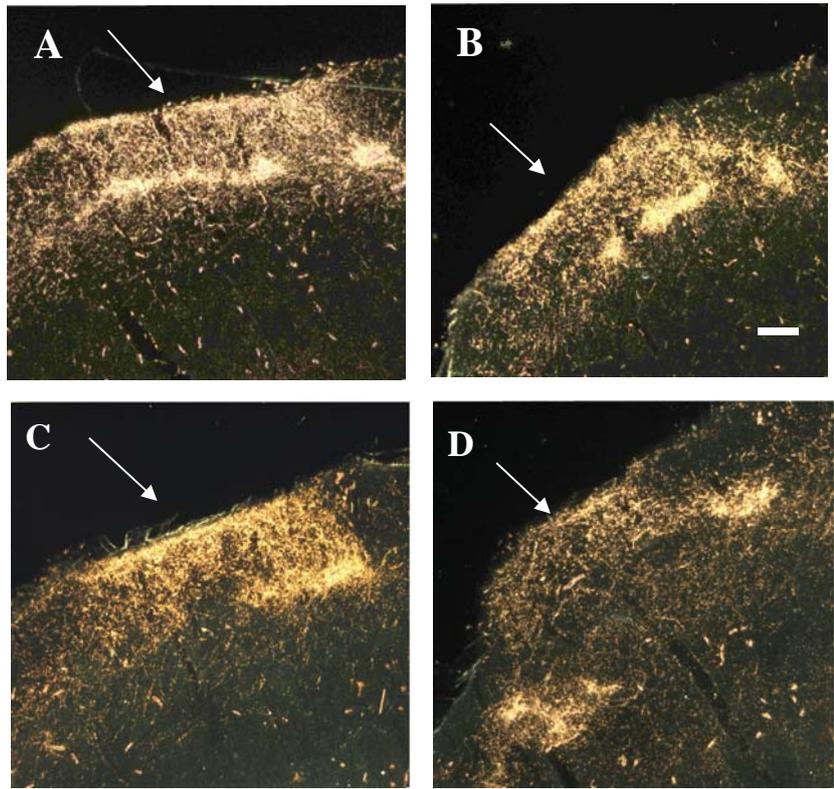


FIGURA 10. Fotomicrografia de campo escuro de cortes coronais do colículo superior ilustrando a reorganização dos axônios ipsolaterais após lesão de retina temporal em DPN 10. A) Animais tratados com dieta nuvital até DPN 21; B) animais tratados com dieta RT até DPN 10 e CT até DPN 21; C) Animais tratados com dieta nuvital até DPN41; D) animais tratados com dieta RT até DPN 21 e CT até DPN 41; Setas indicam a reorganização dos axônios ipsolaterais no sítio da lesão. E) Análise quantitativa. * $P < 0,001$. Escala: 300 μm

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este estudo tem por objetivo avaliar o efeito do tratamento agudo e crônico com PCPA sobre o desenvolvimento e plasticidade das projeções retinotectais de roedores.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a imunorreatividade para serotonina nos núcleos da rafe de roedores após tratamento agudo, subcrônico e crônico com PCPA.
- Avaliar o padrão topográfico das projeções retinotectais de animais com tratamento subcrônico e crônico com PCPA durante e após o período crítico do desenvolvimento.
- Analisar a capacidade de reorganização plástica dos axônios retinotectais após lesão de retina temporal de animais com tratamento subcrônico e crônico com PCPA durante e após o período crítico do desenvolvimento.

- Analisar os efeitos do tratamento crônico com PCPA sobre os níveis de P-CREB no córtex superior.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados para este estudo ratos da linhagem Lister Hooded (pigmentados) entre os dias pós-natal 2 e 28 (DPN2 e DPN28) provenientes de ninhadas com 5 a 8 animais. Utilizamos técnicas imunohistoquímicas com o objetivo de analisarmos os efeitos do tratamento com PCPA sobre a expressão de populações de células imunorreativas para serotonina nos neurônios dos núcleos da rafe. Técnicas neuroanatômicas e histoquímicas foram utilizadas em experimentos que visavam estudar o efeito do tratamento com PCPA na formação topográfica retinotectal. A técnica de western blot foi utilizada no intuito de verificar o efeito do tratamento crônico com PCPA sobre a expressão de P-CREB no colículo superior. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão de acordo com as normas de experimentação animal da Sociedade Brasileira de Neurociências.

3.1 TRATAMENTO

Os animais foram divididos em dois grupos distintos, o grupo controle e o grupo tratado. Os animais controle receberam injeções diárias de solução salina (NaCl 0,9%) por via intraperitoneal por 14 ou 28 dias. Os animais do grupo tratado receberam injeções diárias de

PCPA (*4-Chloro-DL-Phenylalanine*, Sigma-Aldrich) por via intraperitoneal na concentração 100 mg/kg diluído em solução salina. Os animais pertencentes a este grupo foram ainda divididos em diversos subgrupos de acordo com os objetivos propostos. O primeiro grupo de animais recebeu injeções de PCPA por 2 dias a partir do nascimento. Outro grupo recebeu injeções diárias de PCPA de DNP0 até DPN 14 ou até DPN 28. E mais um grupo recebeu ainda, injeções por 4 dias consecutivos iniciando o tratamento em DNP10. Todos os animais foram processados um dia após a interrupção dos tratamentos.

3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA SEROTONINA

Os animais foram sacrificados pela inalação de clorofórmio e perfundidos transcardiacamente com solução salina (NaCl 0,9%) por 5 minutos, seguido de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 por 20 minutos. Os cérebros foram removidos e estocados overnight em tampão sacarose 20% a 4°C. No dia seguinte os cérebros foram congelados em gelo seco e secções parassagitais de 20µm foram obtidas através de um criostato. Tais cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas (Gelatina 1%) e armazenados em freezer a -20°C.

Os cortes foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS 0,1M pH 7,6 e transferidos para uma solução contendo metanol e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% por 10 minutos para inativação da peroxidase endógena. Após 3 lavagens de 5 minutos com PBS 0,1M pH 7,6, os cortes foram incubados com soro normal de cabra, NGS 1:10 em PBS contendo triton a 0,25% durante 30 minutos, para o bloqueio dos sítios inespecíficos. Passado esse tempo os cortes foram incubados com anticorpo primário específico para serotonina (SIGMA), na diluição 1:10.000 em PBS/Triton, e armazenados em câmara úmida à 4° C durante 24 horas, os cortes do controle de reação imunohistoquímica foram incubados com PBS/Triton somente.

No dia seguinte à incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS e tratados com anticorpo secundário biotilado anti-coelho diluído em PBS e triton 1:200 por 90 minutos. Seguiram-se 3 lavagens de 5 minutos com PBS, ao fim das quais os cortes foram então incubados com complexo avidina-biotina (Vector-Elite) 1:50 durante 60 minutos, sendo lavados novamente 3 x por 5 minutos com PBS após esse tempo. A revelação da atividade enzimática da peroxidase do complexo ABC era realizado pela incubação com diaminobenzidina (DAB-Sigma) diluída em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,6 na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 0,015%). Essa reação foi realizada em câmara escura, num período de tempo que

variava de 3 a 7 minutos. Os cortes foram lavados com PBS 4 vezes por 10 minutos. No dia seguinte seguiu-se a desidratação das lâminas em álcool 70%, 80%, 90% e álcool absoluto por 1 minuto cada etapa. Ao final, as lâminas foram incubadas em xilol durante 5 minutos (2 trocas) e montados com lamínulas em Entelan (Merck) para análise.

3.2.1 Análise de resultados

Cortes adjacentes à linha média do cérebro, e que continham neurônios positivos para serotonina nos núcleos medianos da rafe foram selecionados e fotografados utilizando o microscópio óptico Zeiss Axioskop e uma câmera digital Sound Vision. Os arquivos obtidos através da câmera foram transferidos e armazenados em um computador em formato TIFF para posterior análise. Nos animais em DPN 2, as células imunorreativas para serotonina localizadas próximo ao IV ventrículo e adjacências foram contadas em cada corte, e para cada animal foi obtida uma média, representando, portanto o número médio de neurônios serotoninérgicos por corte. Nos animais em DPN 14 as células imunorreativas localizadas em aglomerados próximos ao ventrículo foram classificadas como células serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe, sendo equivalente ao núcleo B7 demonstrado na figura 7.

Os demais núcleos adjacentes ao B7 e os localizados ao longo do tronco cerebral foram considerados núcleos ventrais da rafe. Tanto em animais em DPN 2 como em animais em DPN 14, as células reativas em cada corte foram contadas e depois foi obtida uma média de acordo com a localização desses neurônios. Os animais tratados e controles eram comparados de acordo com a idade e a localização dos neurônios serotoninérgicos.

3.3 TÉCNICAS NEUROANATÔMICAS

3.3.1 Utilização de Traçadores

Esta técnica permite a visualização, ao microscópico óptico, de axônios do sistema visual e suas conexões com núcleos visuais centrais. Para tanto, foi utilizado a peroxidase (HRP - Sigma type VI) como traçador neuroanatômico anterógrado. Este traçador permite a análise do padrão de distribuição dos axônios que emergem da retina durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Após injeção intraocular essa enzima é transportada de forma anterógrada pelo nervo óptico até o colículo superior.

Ratos com idades entre DPN 13 e DPN 27 foram anestesiados com uma mistura de água e éter na proporção de 1:1 e após anestesia

foi feita uma incisão no limbo com auxílio de um microbisturi. Através desta incisão, foi introduzida a ponta de uma microseringa Hamilton® contendo de 3 a 5 ul de uma solução de HRP a 30% diluída em Dimetilsulfóxido 2% em NaCl 0,9% (DMSO 2%).

3.3.2 Lesões de Retina

Quando os animais alcançaram o dia pós-natal 10 (DPN 10) ou DPN 21 receberam lesões em setores restritos da retina temporal do olho esquerdo. Os animais foram anestesiados com éter. As pálpebras foram abertas por meio de uma incisão ao longo do sulco que define as bordas palpebrais. A seguir, com auxílio de um microbisturi foi feita uma penetração através da esclera na retina temporal a meio caminho entre o limbo e o disco óptico. Esta lesão secciona os axônios de células ganglionares de um setor periférico da retina (Serfaty *et al.*, 1991). As pálpebras foram então seladas com um gel de cianoacrilato e os animais retornaram ao biotério após a recuperação da anestesia.

3.3.3 Processamento Histológico

Animais submetidos a injeções de HRP tiveram sobrevivência de 24h. Os animais foram sacrificados após inalação de clorofórmio e perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%) e solução de Karnowski (paraformaldeído 1% + glutaraldeído 2%) para a histoquímica de HRP. Após a fixação, os cérebros foram removidos e mantidos overnight em uma solução de sacarose a 20 % em tampão fosfato 0.1M pH7.4. Nos grupos de animais submetidos à lesão de retina temporal removemos o globo ocular lesionado após salina, fixamos em paraformaldeído 1% e realizamos a montagem plana da retina para inspecionarmos o tamanho e a correta posição anatômica da lesão. Após a crioproteção os cérebros foram congelados em gelo seco e cortados no plano coronal ou parasagital em um micrótomo de congelação com espessura de 40 *um*.

3.3.4 Histoquímica para HRP

Cortes histológicos foram reagidos "*free-floating*" e processada segundo o protocolo de Mesulam (Mesulam, 1978). Resumidamente, os cortes histológicos foram recolhidos em tampão fosfato 0.1M pH 7,4 e logo após transferidos para tampão acetato 0.1M pH 3.3 e incubados na presença de nitroprussiato de sódio, o cromógeno TMB e H₂O₂ por 40 minutos. A seguir os cortes foram lavados por 1h em 6 trocas de tampão acetato 0.1M, pH 3.3, montados em lâminas gelatinizadas e

secos ao ar "overnight". No dia seguinte as lâminas foram desidratadas por 5 segundos em álcool etílico absoluto, clarificadas duas vezes em xilol por 5 minutos, montadas com lamínulas em Entelan (Merk). Os cortes foram analisados e fotografados em microscopia óptica de campo escuro para posterior análise quantitativa das projeções retinianas no colículo superior.

3.3.5 Análise de resultados

A análise dos resultados foi feita após observação da marcação histoquímica ao microscópio óptico. Após digitalização das imagens obtidas ao microscópio os dados foram quantificados através do programa Scion Image. Este programa considera um valor de densidade óptica máxima (255) para o branco absoluto e valores mínimos em torno de zero para o preto. Analisamos o padrão de distribuição de axônios retinotectais durante o desenvolvimento normal ou após o rearranjo plástico das projeções retinotectais ipsolaterais induzido por lesão na retina temporal contralateral.

Para estudar o desenvolvimento das projeções retinotectais foi analisado a densidade óptica de cortes parassagitais ipsolaterais do CS. Os primeiros 5 cortes após a linha média não foram incluídos na amostra quantitativa por conterem inúmeros axônios retinianos que

cruzam em direção a região caudal (Serfaty & Linden, 1994). A partir do 6º corte, cada fotografia das camadas superficiais do colículo superior foi dividida em rostral, intermediário, caudal além de dorsal e ventral, formando assim seis quadrantes distintos (fig. 11). Para a análise quantitativa foi verificada a densidade óptica da área total desses quadrantes além da densidade óptica dos aglomerados de marcação (*clusters*) de animais tratados com PCPA de DPN 0 até DPN 14 ou 28 ou ainda, tratados de DPN 10 até DPN 14. Cada grupo tratado foi comparado com seus respectivos controles, que receberam apenas o veículo.

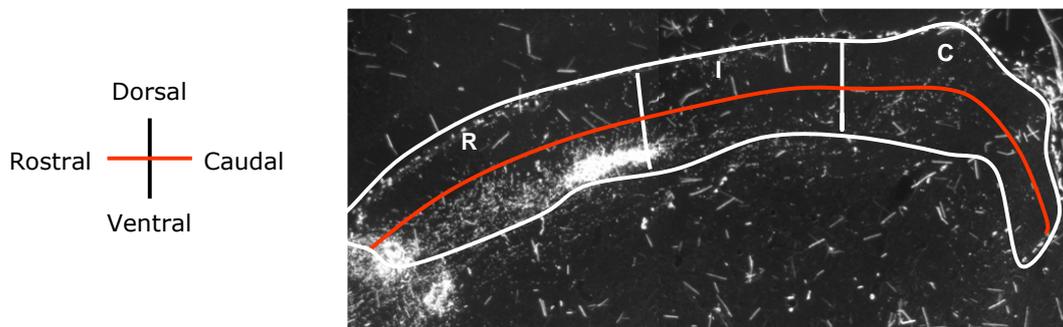


FIGURA 11. Esquema de secção do colículo superior mostrando a divisão em quadrantes das camadas visuais do colículo superior para análise quantitativa. A linha vermelha divide o CS em dorsal e ventral e as linhas verticais dividem o CS em rostral (R), intermediário (I) e caudal (C).

A análise da plasticidade retinotectal ipsolateral induzida por lesão de retina foi realizada a partir de cortes coronais do colículo superior de

animais tratados com o PCPA ou solução salina. Nessas amostras, foi analisada a densidade óptica da marcação superficial do colículo superior na área da lesão de cinco cortes seqüenciais. Este estudo teve como objetivo avaliar o padrão de distribuição de axônios retinotectais após rearranjo plástico dessas projeções estimuladas por lesão na retina temporal nos diferentes grupos experimentais.

3.4 ELETROFORESE E ANÁLISE DE WESTERN BLOT

3.4.1. Obtenção de amostras para corrida de eletroforese

Ratos tratados com PCPA e salina foram sacrificados pela inalação de clorofórmio e tiveram seus colículos superiores retirados cirurgicamente. Ao tecido fresco foi adicionado 200 μ l de tampão de amostra contendo SDS, glicerol, β -mercaptoetanol e Tris-HCl, pH 6,8. A solução foi agitada com auxílio de um vórtex até desnaturação completa do tecido. A amostra foi fervida a 100° C por 5-8 min e centrifugada a 4° C na velocidade de 15.000 RPM por 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -70° C até a dosagem de proteína.

3.4.2. Dosagem de proteína pelo método de Bradford

A dosagem de proteínas das amostras foi realizada de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976). Foram adicionados 2 μ l das amostras em tubos de vidro e acrescentados 3 ml de reagente de Bradford. Para a realização da curva padrão, foram colocados nos tubos de vidro 5, 10, 15 ou 20 μ l de BSA (1mg/ml). Em seguida, foram adicionados 2 μ l de tampão de amostra (o mesmo utilizado no preparo das amostras) e ainda 3 ml de reagente de Bradford. Posteriormente, as misturas foram agitadas em vórtex e a leitura de absorbância foi realizada em filtro de 595 nm. Ao final da dosagem foi adicionado 0,1 μ l do volume da amostra de Azul de Bromofenol às amostras.

3.4.3. Eletroforese e Western blot

Posteriormente, foi aplicado no topo do gel de poliacrilamida-SDS a 10% um volume de amostra equivalente a 45 μ g de proteína. O procedimento para eletroforese em gel de poliacrilamida foi baseado na técnica descrita por Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado para um volume de 9 ml e uma concentração final de acrilamida de 10%. O gel de concentração foi preparado para um volume de 3 ml e

uma concentração final de acrilamida de 4,5%. O tampão de corrida utilizado tinha em sua composição tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1%). Durante a corrida, a amperagem foi mantida constante em 10 mA por aproximadamente 4 horas. As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF (Hybond-p, Amersham) de acordo com a técnica descrita por Towbin *et al.* (1979) . O sistema de transferência foi montado de acordo com as instruções do fabricante. A montagem do "sanduíche" obedeceu a seguinte ordem sobre a grade do aparelho: 1 esponja, 1 folha de papel filtro, o gel, a membrana PVDF, 1 folha de papel filtro, 1 esponja. Todos os componentes foram previamente tratados com tampão de transferência. Durante a montagem tinha-se o cuidado de remover todas as bolhas entre os componentes do sistema. A transferência foi realizada a 4° C durante 1 hora em voltagem de 40-60 volts. Após a transferência, as membranas foram mantidas a 4° C em TBS (Tris, 50 mM; NaCl, 150 mM) até a incubação com anticorpo específico.

A membrana de PVDF foi incubada inicialmente em solução tampão TBS-T (TBS contendo 0,1% de Tween 20) contendo leite em pó desnatado 5% durante 1 hora e 30 min à temperatura ambiente, com agitação suave. Com este procedimento foi prevenida a ligação de anticorpos a sítios não específicos na membrana de PVDF. Após esse período, a membrana foi lavada uma vez em tampão TBS-T por 5 min e

em seguida foi encubada com anticorpo primário anti P-CREB (Cell Signaling_anticorpo monoclonal produzido em camundongo) diluído na proporção de 1:2.000 por pelo menos 12 horas. O anticorpo foi diluído em solução tampão TBS-T contendo leite em pó desnatado, 5%.

A membrana, previamente incubada com anticorpo primário foi lavada em TBS-T 3 vezes por 10 min e então incubada com anticorpo secundário anti-camundongo, diluído na proporção 1:5.000 em solução TBS-T contendo leite em pó desnatado, 5% por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com tampão TBS-T e acondicionada em TBS até a revelação.

A imunodeteção foi promovida pela reação quimioluminescente do sistema ECL para Western Blotting (Amersham-Pharmacia). Após a incubação da membrana com uma mistura de soluções de detecção por 5 minutos a temperatura ambiente, o excesso do reagente foi retirado com cuidado e a membrana foi, então, envolvida em filme PVC e exposta imediatamente a filme Kodak X, por curtos intervalos de tempo, o qual foi revelado para obtenção de uma imagem autorradiográfica adequada com soluções reveladora e fixadora padrões.

3.4.4 Análise de resultados

A análise quantitativa foi feita com auxílio do programa Scion Image. Após a revelação o filme contendo as bandas autorradiográficas foi scaneado e os arquivos foram transferidos para um computador em formato TIFF. As amostras dos animais tratados com PCPA foram comparados com amostras controles processados no mesmo dia, sendo considerado a percentagem do animal tratado a partir do seu controle.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os dados de densidade óptica dos aferentes retinotectais bem como dos aglomerados de marcação terminal durante o desenvolvimento e após a lesão de retina foi utilizada a análise de variância (ANOVA), e posteriormente o pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos. Nos histogramas estão representados a média e o erro padrão da média. Para analisar a quantificação da imunorreatividade para serotonina nos núcleos da rafe e a expressão de P-CREB no CS, a partir da técnica de Western blot, foi usado o teste T de Student. Utilizamos o programa *Graph Pad Prism* para a avaliação quantitativa e aplicação dos respectivos testes. Para todos os testes

estatísticos foram considerados como significativos os valores com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 IMUNORREATIVIDADE DE CÉLULAS SEROTONINA-POSITIVAS NOS NÚCLEOS DA RAFE EM ANIMAIS TRATADOS COM PCPA

Como mencionado anteriormente, os neurônios serotoninérgicos estão localizados nos núcleos da rafe, que consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios situados na ponte e parte superior do tronco cerebral. O núcleo B7 possui a maior concentração de neurônios serotoninérgicos cujos axônios se projetam para o colículo superior (Beitz *et al.*, 1986). A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano pela ação da enzima triptofano hidroxilase. A ativação dessa enzima pode ser bloqueada pela p-clorofenilalanina (PCPA) que compete com o triptofano ligando-se irreversivelmente à enzima (Barnes, 1999).

Para a realização deste estudo os animais foram divididos em grupo controle, os quais foram submetidos a injeções intraperitoneais de salina 0,9%, e grupo tratado, que receberam injeções intraperitoneais diárias de PCPA (100 mg/kg) em diversas idades.

Inicialmente, investigamos a imunorreatividade para serotonina nos núcleos da rafe após tratamento agudo com injeções diárias de PCPA a partir do nascimento até DPN 2. Nesses animais foi estudada a imunorreatividade de corpos celulares localizados nos núcleos dorsais da

rafe correspondendo ao grupo B7 e adjacentes. Em ambos os grupos foram encontradas células imunorreativas para serotonina, no entanto foi observado redução significativa na imunorreatividade para serotonina no grupo tratado em relação ao seu controle (fig 12 A e B). A análise quantitativa mostrou uma redução de 81,69 % no número de células imunorreativas por cortes recolhidos nos animais tratados com PCPA por 2 dias. (Fig. 13)

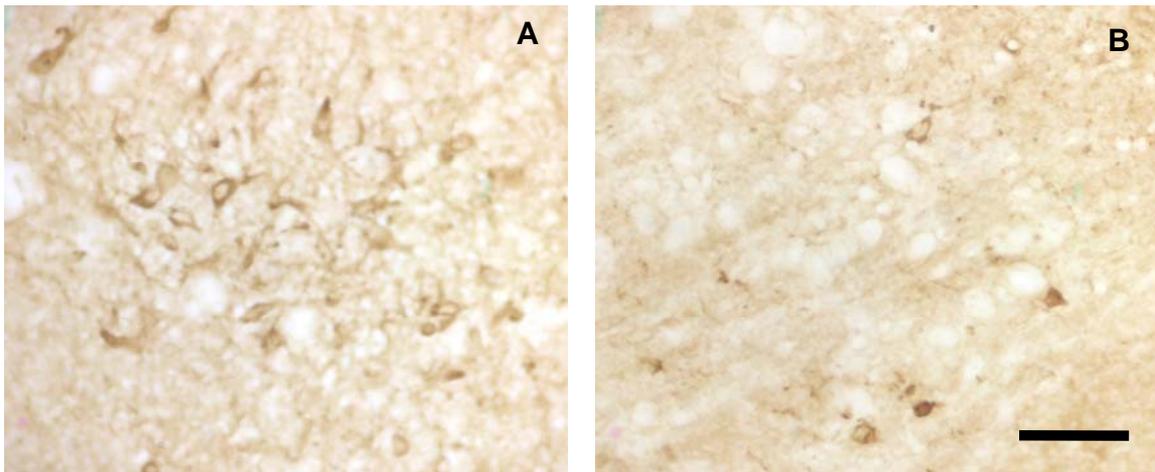


FIGURA 12. Imunorreatividade para serotonina após tratamento agudo com PCPA em cortes parassagitais do núcleo dorsal da rafe em ratos no dia pós natal 2 (DPN 2). A) Células serotoninérgicas no núcleo dorsal da rafe de animais controles- aumento de 400X. B) Células serotoninérgicas no núcleo dorsal da rafe de animais tratados com PCPA - aumento de 400X. Escala: 50 μ m

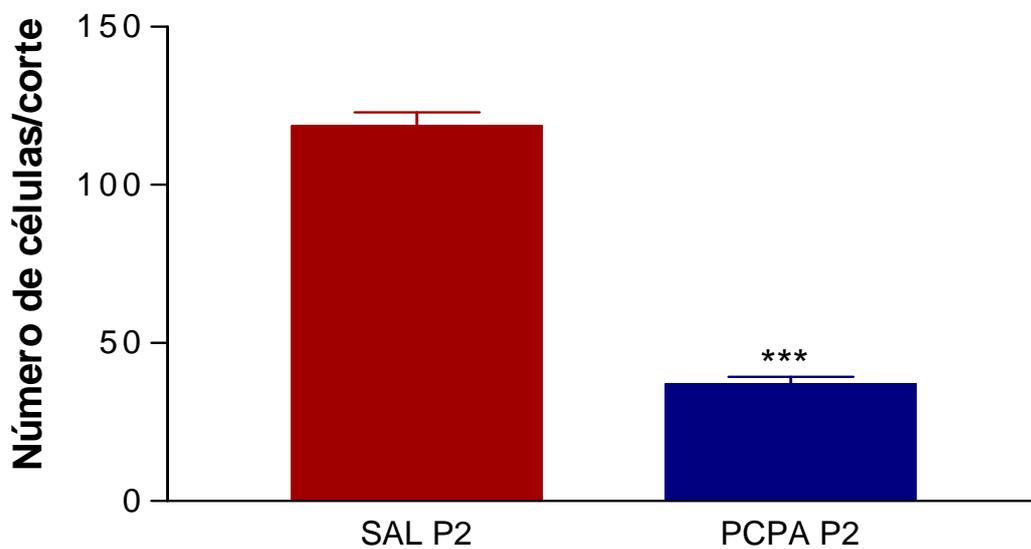


Figura 13. Histograma mostrando a média do número de células marcadas para serotonina pela imunorreatividade nos núcleos dorsais de animais após tratamento agudo com PCPA até DPN 2. SAL N= 4, PCPA N= 4. Barra representa SEM. ***p<0,0001

Um segundo grupo de animais recebeu tratamento subcrônico com injeções diárias de PCPA (100 mg/kg) a partir do décimo dia pós-natal até DPN 14. Para análise, separamos cada corte em núcleos dorsais da rafe correspondente ao núcleo B7, o qual projeta os axônios dos neurônios serotoninérgicos para o colículo superior, e núcleos ventrais da rafe, onde encontramos os demais núcleos. Estes animais não apresentaram mudanças significativas em relação ao controle em nenhuma das regiões analisadas, sugerindo uma recuperação da imunorreatividade para serotonina a partir do que foi observado no tratamento agudo com PCPA (Fig.14).

Os animais que receberam tratamento crônico com injeções diárias de PCPA por 14 dias (de DPN 0 até DPN 14) apresentaram um aumento na imunorreatividade em comparação ao controle, que recebeu apenas veículo por 14 dias (fig 15). Nos animais tratados com PCPA encontramos fibras imunorreativas para serotonina e uma marcação mais intensa em corpos celulares além de um aumento no número de células serotonina-positivas nos núcleos dorsais (fig 15 B e D) e ventrais da rafe (fig 15 F e G). A análise quantitativa desses animais confirma os resultados descritos anteriormente (fig 16).

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que, o tratamento agudo com PCPA, na concentração de 100 mg/kg, é capaz de reduzir significativamente as concentrações de serotonina nos

núcleos da rafe. O tratamento com PCPA por 4 dias recupera parcialmente a imunorreatividade para serotonina enquanto que o tratamento crônico por 14 dias aumenta significativamente a concentração de serotonina em comparação ao controle.

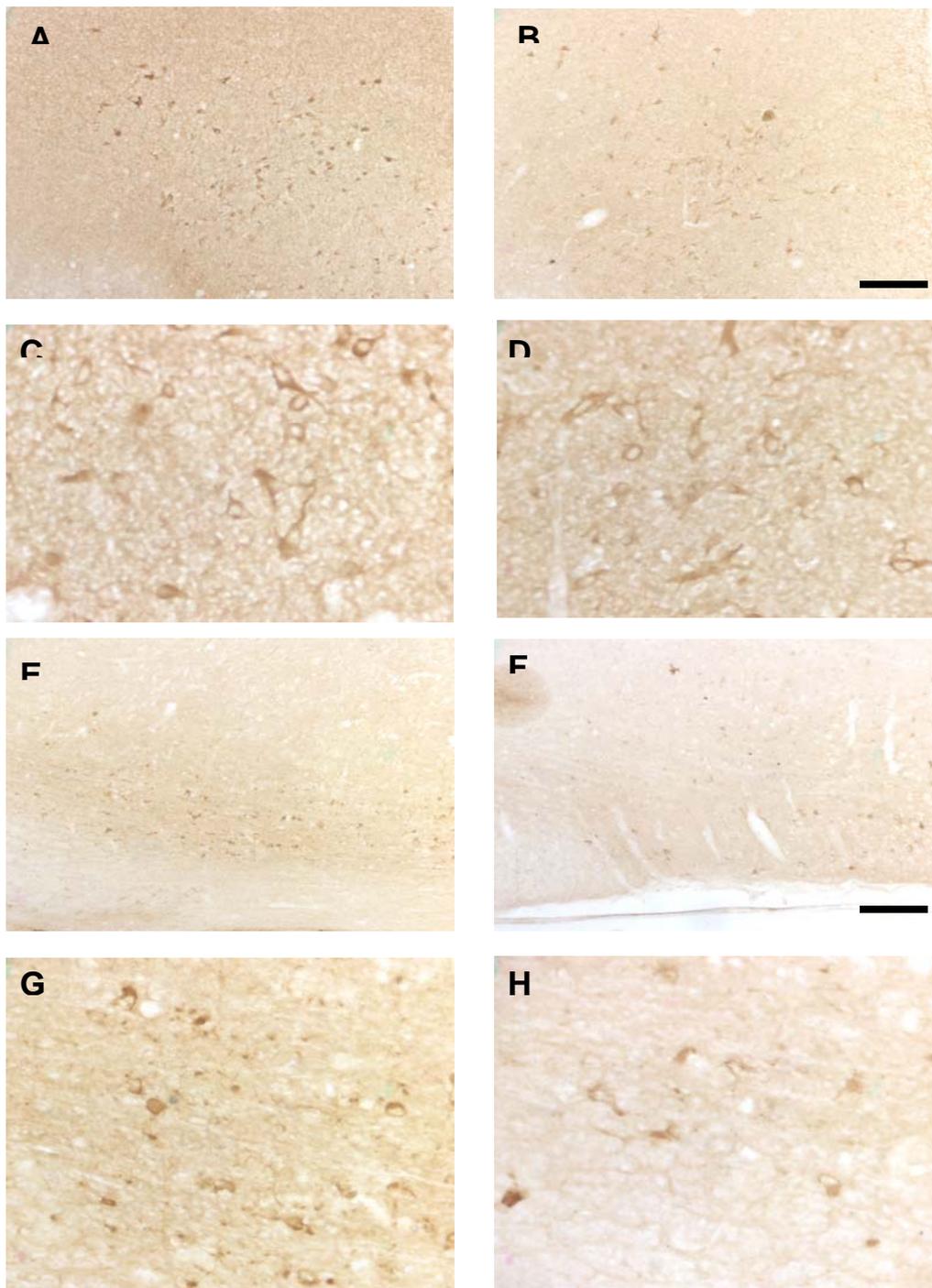


FIGURA 14. Imunorreatividade para serotonina após tratamento subcrônico com PCPA (DNP 10-14). Cortes parassagitais do núcleo dorsal (NDR) e ventrais da rafe (NVR) em ratos em DPN14. A) Controle - (NDR) -100X; B) PCPA - (NDR) -100X; C) Controle - (NDR) -400X; D) PCPA - (NDR) - 400X; E) Controle- (NVR) -100X; F) PCPA - (NVR) - 100X; G) Controle - (NVR) -400X; H) PCPA - (NVR) - 400X. Escala 300 μ m para fotos em aumento de 100X e 50 μ m para fotos em 400X

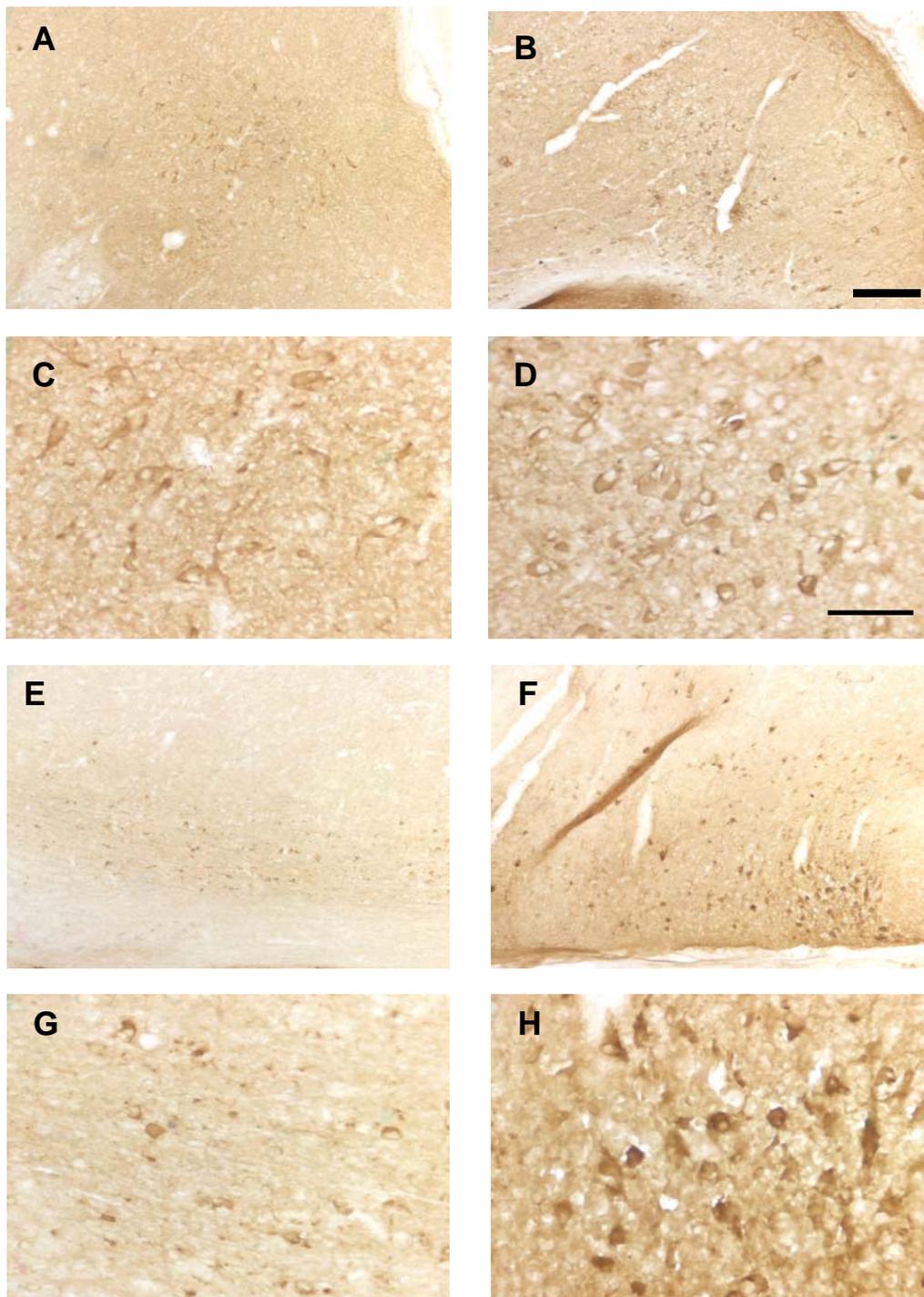


FIGURA 15. Imunorreatividade para serotonina após tratamento crônico com PCPA (DNP 0-14). Cortes parasagittais do núcleo dorsal (NDR) e ventrais da rafe (NVR) em ratos em DPN14. A) Controle - (NDR) -100X; B) PCPA - (NDR) -100X; C) Controle - (NDR) -400X; D) PCPA - (NDR) - 400X; E) Controle- (NVR) -100X; F) PCPA - (NVR) - 100X; G) Controle - (NVR) -400X; H) PCPA - (NVR) - 400X. Escala 300 μ m para fotos em aumento de 100X e 50 μ m para fotos em 400X

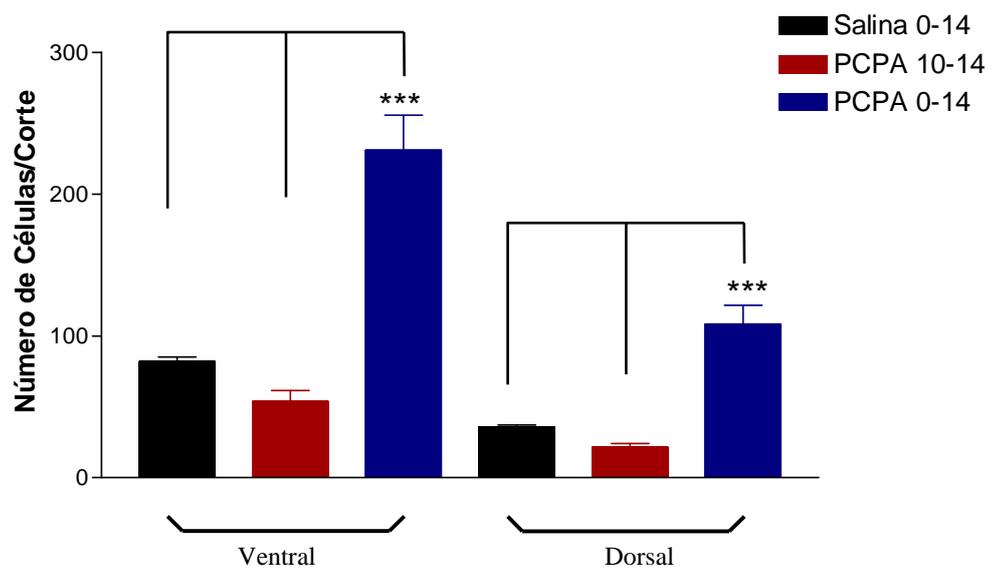


FIGURA 16. Histograma mostrando a média do número de células por corte marcadas para serotonina pela imunorreatividade nos núcleos dorsais e ventrais da rafe de animais tratados com salina e com PCPA. Barra representa SEM. *** $p < 0,0001$

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PCPA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PROJEÇÕES RETINOTECTAIS EM DPN 14

Em fases precoces do desenvolvimento normal da via retinotectal de roedores, axônios retinianos de ambos os olhos estão expandidos inespecificamente sobre o colículo superior. Em torno de DPN 10 esses aferentes apresentam um padrão de distribuição laminar e topográfico mais próximo ao de animais adultos. Nestes, a maior parte dos axônios ipsolaterais está localizada em aglomerados de marcação terminal no limite ventral, restritos ao terço anterior do stratum griseum superficiale (SGS) (Serfaty & Linden, 1994).

A formação de um mapa topográfico que represente a superfície receptora da retina requer, ainda, uma fase de refinamento topográfico. Refinamento este que se mostra dependente de atividade elétrica espontânea e evocada e se dá a partir da segunda semana do desenvolvimento pós-natal (Debski & Cline, 2002). O mesmo período em que ocorre a abertura dos olhos do animal (entre DPN12-14).

Tendo em vista que as projeções retinotectais sofrem um refinamento topográfico dependente de atividade elétrica nas duas primeiras semanas pós-natal, investigamos os efeitos do tratamento diário com PCPA sobre as projeções retinotectais ipsolaterais de animais em DPN 14 .

Conforme esperado, os animais que receberam injeções diárias de veículo (salina 0,9%, i.p.) apresentaram aglomerados densos de marcação terminal no SGS e virtual ausência de marcação de terminais e fibras na região caudal do colículo superior (fig. 17 A). Os animais que receberam tratamento subcrônico com injeções diárias de PCPA por 4 dias a partir de DPN 10 até DPN 14 apresentaram além de aglomerados de marcação (*clusters*) na região dorso-rostral, fibras ectópicas que se estendem para as regiões superficiais e caudais do colículo superior (fig 17 B). A análise quantitativa da densidade óptica não mostrou diferença significativa na região ventral da parte rostral do colículo, local onde predominam os aglomerados de marcação terminal. Nas demais regiões foram observados aumentos significativos da densidade óptica entre os grupos tratados e os controles (fig 18 A e B).

Após o tratamento crônico com injeções de PCPA a partir de DPN 0 até DPN 14 as projeções ipsolaterais apresentaram-se distribuídas preferencialmente na região ventral do terço anterior do colículo superior. No entanto essas projeções encontram-se difusas, não sendo observados aglomerados de marcação (*clusters*) nesses animais (fig. 17 C). As fibras se estendem para as regiões dorso-rostral e intermediária do CS e mostram diferenças significativas da densidade óptica dos animais tratados com PCPA quando confrontados com o grupo controle.

Não foram encontradas diferenças significativas da densidade óptica na região ventro-rostral e caudal do CS entre os dois grupos (fig 18 A e B).

Como mencionado anteriormente, no decorrer do desenvolvimento normal as projeções retinotectais ipsolaterais tendem a formar aglomerados de marcação terminal (*clusters*) na região rostro-ventral do colículo superior. Como observado na análise qualitativa esses aglomerados se encontram difusos por toda essa região nos animais tratados com PCPA de DPN 0 até DPN 14. A análise quantitativa da densidade óptica dos *clusters* nesses animais mostrou-se reduzida em relação aos demais grupos. Não foi observado diferenças significativas entre os animais tratados com PCPA de DPN 10 a DPN 14 e o controle (Fig. 19).

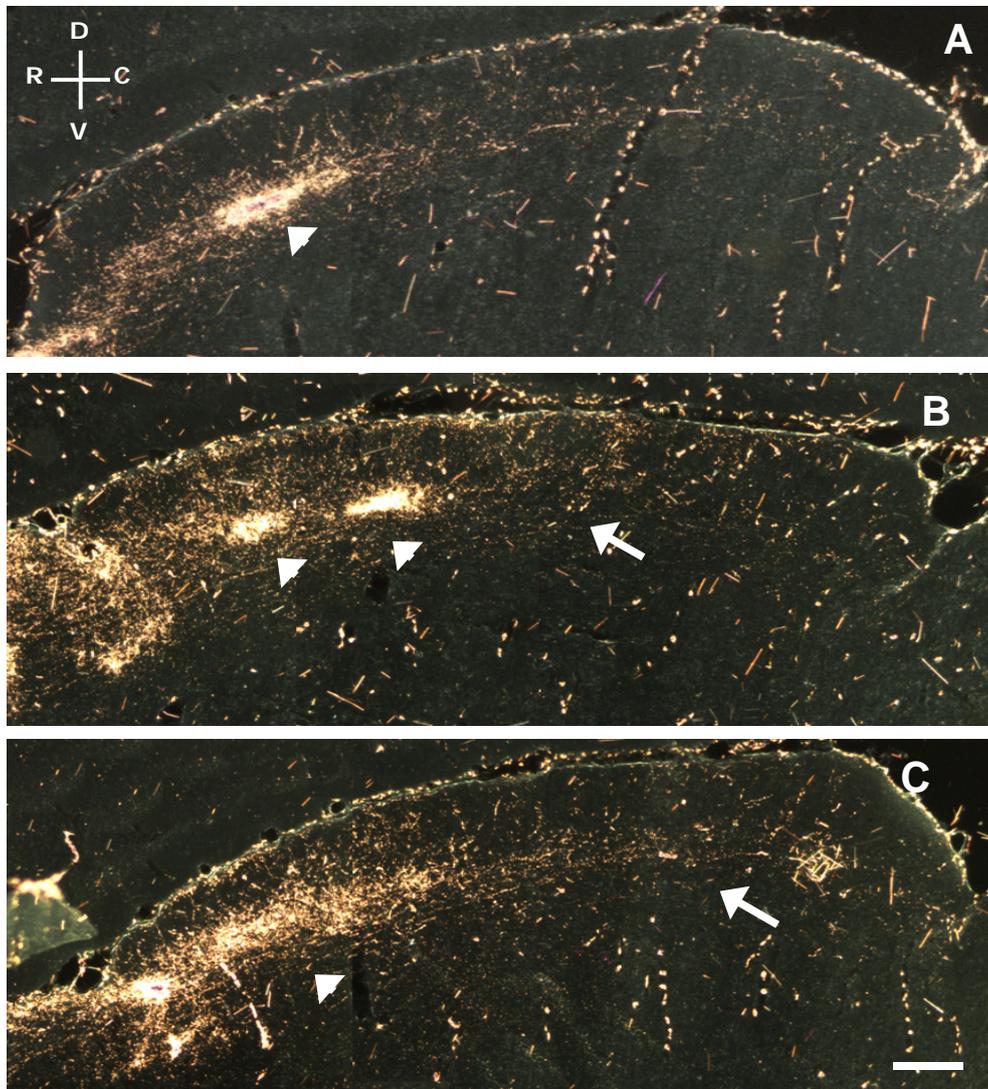
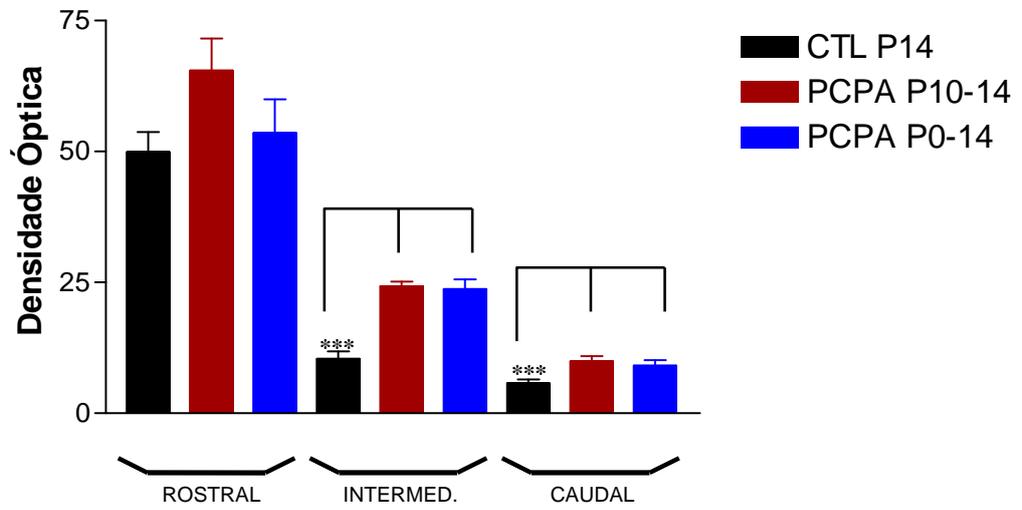


FIGURA 17. Fotografias de campo escuro de cortes parasagittais do colículo superior aumento de 100X mostrando a topografia retinotectal de animais a 'pos tratamento crônico com Salina de DPN 0-14 (A); tratamento crônico com PCPA de DPN 0-14 (B) e tratamento subcrônico com PCPA de DPN 10-14 (C). Cabeças de setas indicam aglomerados de marcação terminal e setas indicam projeções de fibras em direção a região caudal do colículo superior. Escala: 300 *um*

A



B

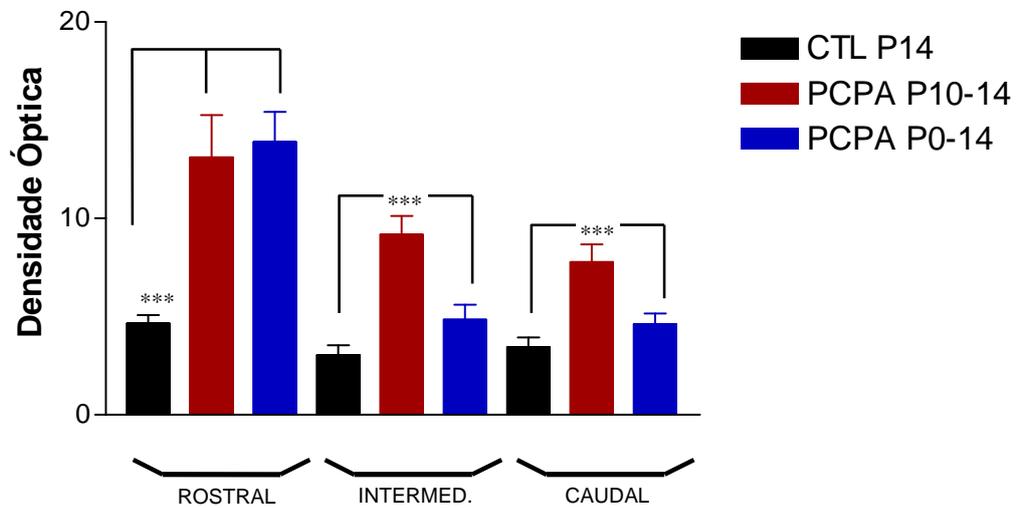


FIGURA 18. Histograma mostrando a densidade óptica de região ventral (A) e dorsal (B) das camadas visuais do colículo superior durante o desenvolvimento da topografia retinotectal em DPN 14. CTL N= 5, PCPA DPN 10-14 N=3, PCPA DPN 0-14 N=5.

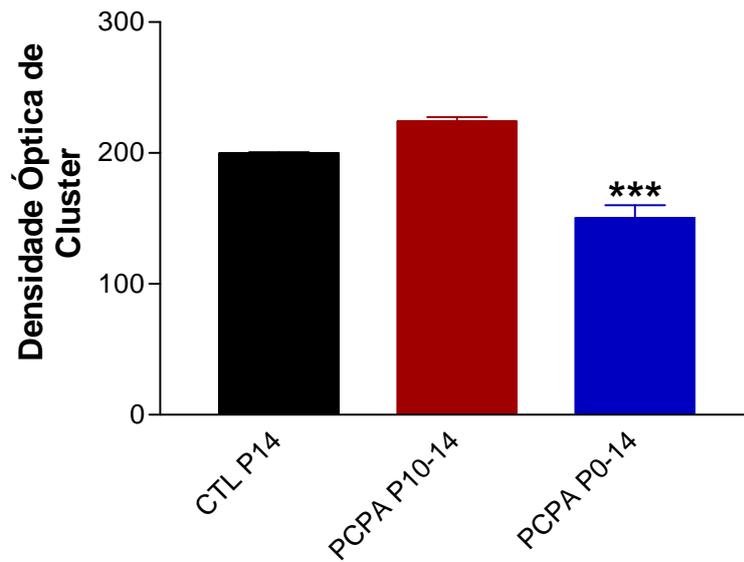


FIGURA 19. Histograma mostrando densidade óptica de marcação terminal de aglomerados na região rostro-ventral do colículo superior de animais DPN 14 tratados com Salina , PCPA de DPN 0-14 e PCPA de DPN 10-14. *** $P < 0,001$

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA COM PCPA SOBRE AS PROJEÇÕES RETINOTECTAIS EM DPN 28

Animais em DPN 28 já encontram-se fora do período crítico, que chega ao fim a partir da segunda/terceira semana pós-natal. Esta fase é caracterizada pelo término do desenvolvimento do sistema retinotectal, onde os axônios de células ganglionares da retina, após refinamento topográfico, formam campos terminais na região ventral do terço anterior das camadas visuais do colículo superior (Serfaty *et al.*, 1990).

Como os experimentos com PCPA entre DPN 0-14 mostraram uma alteração na topografia retinotectal, realizamos experimentos com tratamento crônico desde DPN 0 até DPN 28 com o objetivo de avaliarmos se a alteração topográfica seria de caráter permanente.

Como podemos observar na figura 20 A, os animais tratados com veículo por 28 dias apresentam um padrão de organização topográfica semelhante aos descritos por Serfaty após o período crítico do desenvolvimento. Nesses animais encontramos aglomerados de marcação terminal (*clusters*) na região dorso-rostral do colículo superior. Os animais que foram tratados com injeções diárias de PCPA de DPN 0 a DPN 28 apresentaram marcação difusa que ocupa toda a extensão da região dorso-ventral, não sendo observado *clusters* nesses animais. (fig 20 B) Apesar das diferenças observadas na análise qualitativa na região rostro-ventral, não foram observadas diferenças

significativas na análise quantitativa entre o grupo tratado e o controle. Nas demais regiões do colículo superior não foram encontradas diferenças tanto na análise qualitativa (fig. 20) quanto na análise quantitativa (fig. 21 A e B).

A análise quantitativa dos aglomerados de marcação dos animais tratados com PCPA demonstrou uma significativa redução em sua densidade óptica em relação ao controle. Os animais tratados não apresentavam clusters de marcação delimitados como os encontrados controle, sendo assim foi calculada uma área de *cluster* em μm^2 correspondente a área calculada nos controles (fig. 22).

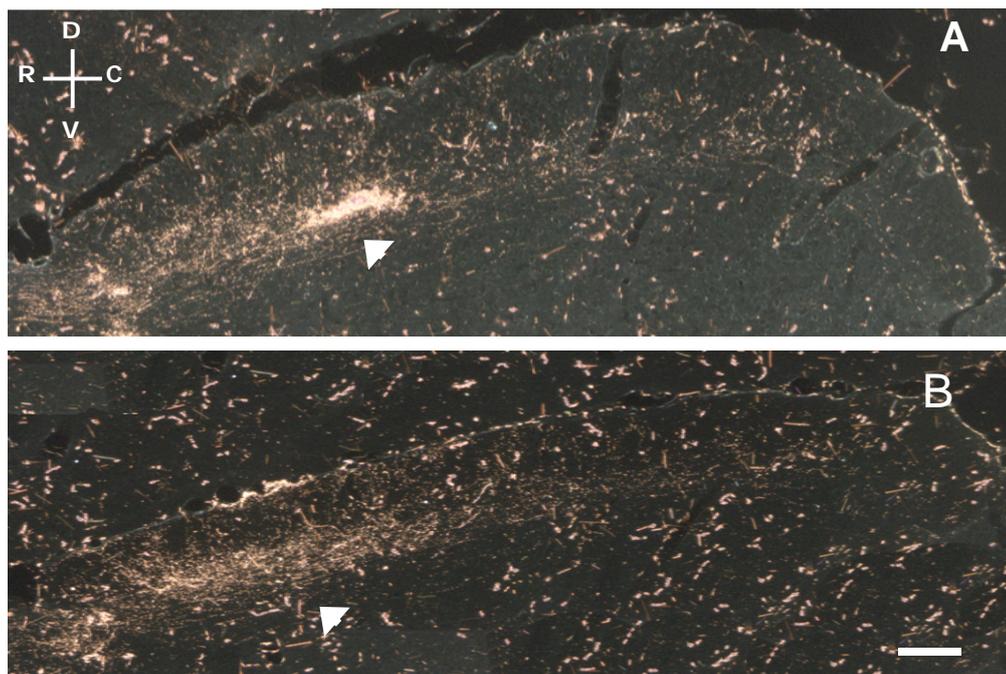
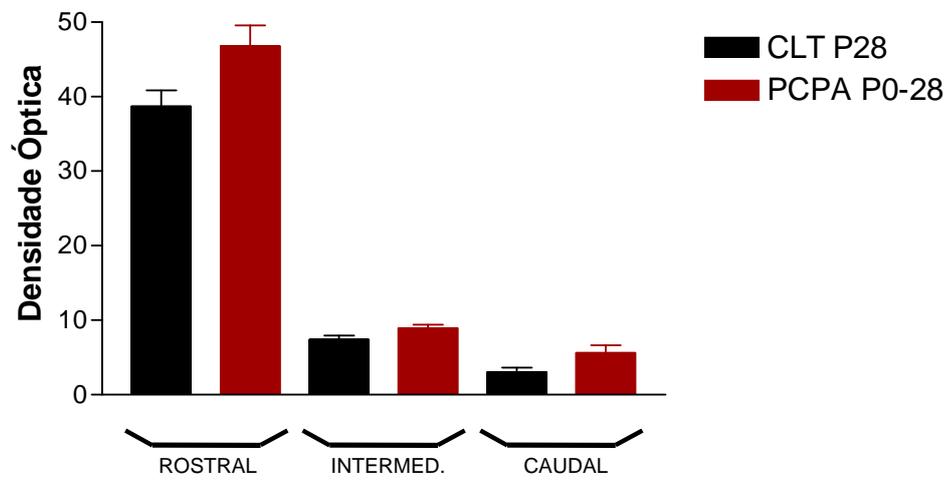


FIGURA 20. Fotografias de campo escuro de cortes parassagitais do colículo superior aumento de 100X mostrando a topografia retinotectal ipsolateral de animais tratados com Salina DPN 0-28 (A) e tratados com PCPA de DPN 0-28 (B) Cabeça de setas indicam aglomerados de marcação terminal. Escala: 300 μ m

A



B

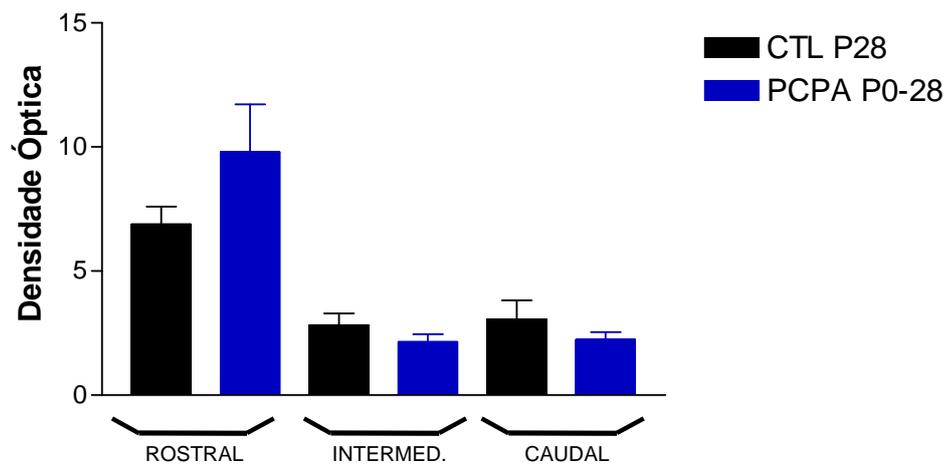


FIGURA 21. Histograma mostrando a densidade óptica de região ventral (A) e dorsal (B) das camadas visuais do colículo superior durante o desenvolvimento da topografia retinotectal em DPN 28. CTL N=4, PCPA N=4.

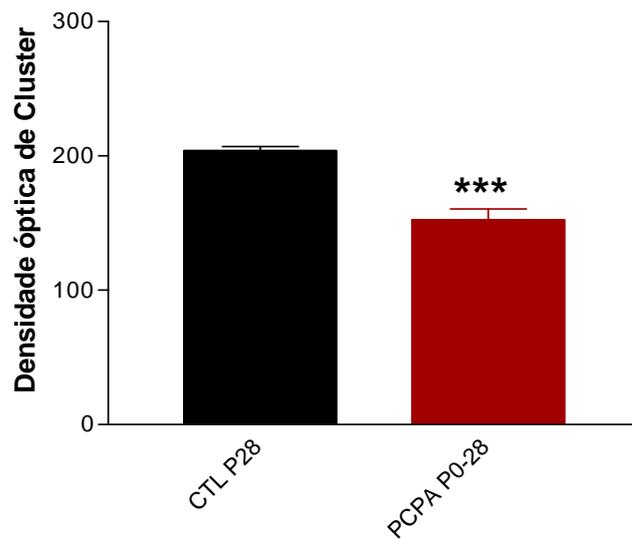


FIGURA 22. Histograma mostrando densidade óptica de aglomerados de marcação terminal (clusters) na região rostro-ventral do colículo superior de animais DPN 28 tratados com Salina e PCPA. *** P<0,001

4.4 ANÁLISE DA RESPOSTA PLÁSTICA DE AXÔNIOS IPSOLATERAIS APÓS LESÃO DE RETINA TEMPORAL EM DPN 10

Para analisarmos as respostas plásticas induzidas no CS todos os animais experimentais foram submetidos à lesão de retina temporal esquerda quando completaram 10 dias pós-natal. Essas lesões induzem denervação na região ântero-lateral do colículo superior contralateral à lesão. Projeções ipsolaterais oriundas do olho intacto apresentam respostas plásticas caracterizadas pela inervação das regiões mais superficiais das camadas visuais do colículo superior (Frost & Schneider, 1979; Serfaty *et al.*, 1990; 2005; Campello-Costa *et al.*, 2006). Sendo assim, a camada mais superficial na área que apresenta o efeito da lesão exibe abundante marcação terminal.

A análise qualitativa e quantitativa da marcação anterógrada dos axônios ipsolaterais foi realizada em cortes coronais do colículo superior de animais que receberam lesão de retina esquerda em DPN 10 e tiveram 4 dias de sobrevida. Estudos anteriores utilizando ratos demonstraram que após lesão de retina temporal em DNP 10, grande parte das projeções ipsolaterais migra em direção a região dorsal do colículo superior após 2 dias de sobrevida (Serfaty *et al.*, 2005)

Os animais do grupo controle, que foram submetidos a injeções diárias de veículo (salina 0,9%, i.p.) até DPN 14, apresentaram um padrão bi-laminar de marcação terminal, semelhante ao padrão

demonstrado por Serfaty e colaboradores em 2005. Foi observada densa inervação terminal na região superficial ântero-lateral do colículo superior. Na região intermediária do colículo observa-se um padrão difuso de fibras e terminações, enquanto a região mais profunda das camadas visuais, os axônios ipsolaterais arborizaram-se em pequenos aglomerados de marcação terminal. (fig. 23 A)

Não encontramos diferenças significativas entre os animais tratados com PCPA de DPN 10 a DPN 14 e o grupo controle (fig. 23 B). Ao comparar o grupo controle com o grupo que recebeu tratamento crônico com PCPA de DPN 0 a DPN 14, foi possível observar diferenças significativas no padrão de respostas plásticas dos axônios ipsolaterais após lesão de retina. Este grupo apresentou uma acentuada elevação da densidade de marcação superficial do CS e um padrão difuso de fibras e terminais na região intermediária do colículo, como podemos observar na figura 17 C. A análise quantitativa da densidade óptica no grupo PCPA DPN 10 - DPN 14 e PCPA DPN 0 - DPN 14 confirmou os resultados qualitativos (fig. 24).

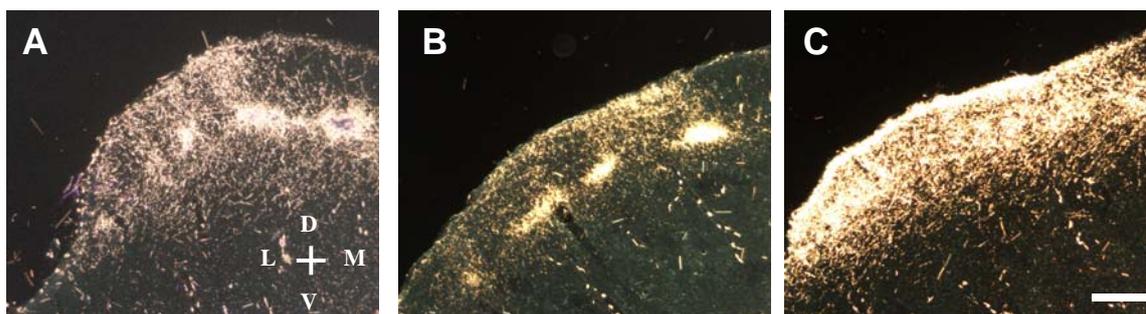


FIGURA 23. Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais do colículo superior em aumento de 100x evidenciando a reorganização dos axônios ipsolaterais após lesão de retina em DPN10 de animais tratados com salina até DPN 14 (A), PCPA de DPN 0 até 14 (B) e PCPA DPN 10 até 14 (C).

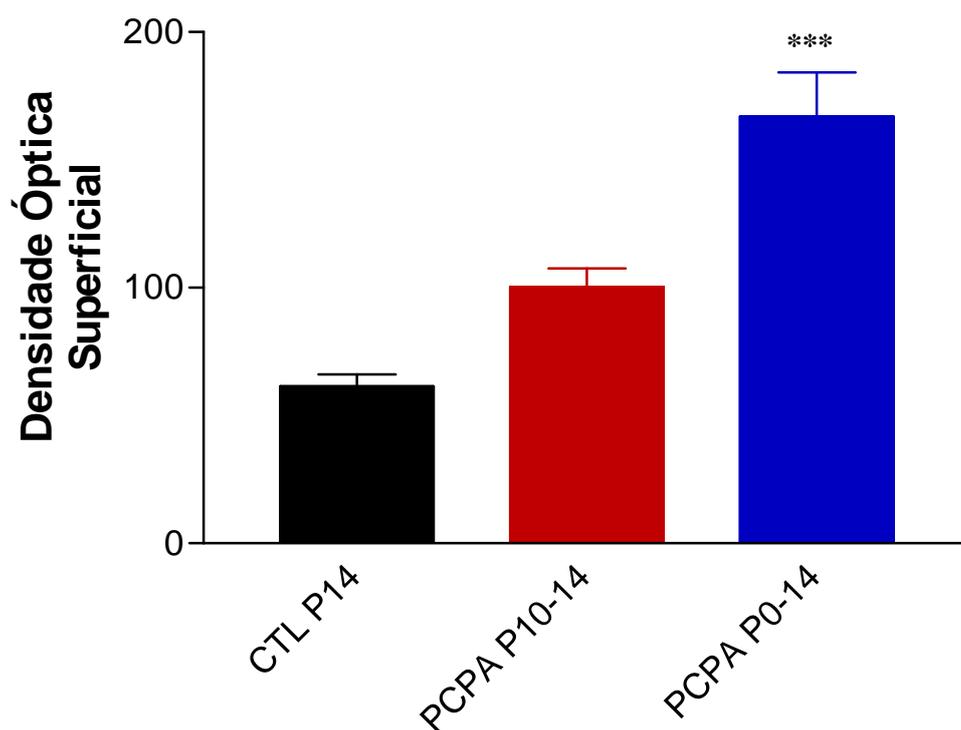


FIGURA 24. Análise de densidade óptica de marcação superficial na área de lesão do colículo superior. Os animais tratados com PCPA de DPN 0 até DPN 14 mostram diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,001$. CTL $n=5$, PCPA 10-14 $n=3$, PCPA 0-14 $n=5$.

4.5 Análise da Resposta Plástica de Axônios Ipsolaterais após Lesão de Retina Temporal em DPN 21

Sabendo-se que o período crítico do desenvolvimento retinotectal do rato se estende até a 3ª semana pós-natal e que lesões de retina no final do período crítico induzem respostas lentas (Serfaty *et al.*, 2005), que podem ser antecipadas com tratamento farmacológico com Fluoxetina (Bastos *et al.*, 1999) fomos avaliar o efeito do tratamento crônico com PCPA sobre a resposta plástica dos axônios retinotctal ipsolaterais após lesão de retina em DPN 21 com 1 semana sobrevida. Os animais controle, tratados apenas com veículo, mostraram um pequeno aumento da densidade de inervação terminal na superfície do colículo superior, semelhante ao encontrado por Serfaty e colaboradores (2005) (Fig. 25 A). Por outro lado, os animais que receberam injeções diárias de PCPA de DPN 0 a DPN 28 apresentaram um aumento significativo na reorganização plástica induzida por lesão quando comparado com o controle. (Fig. 25 B) A análise da densidade óptica superficial confirmou os resultados qualitativos. (Fig. 26)

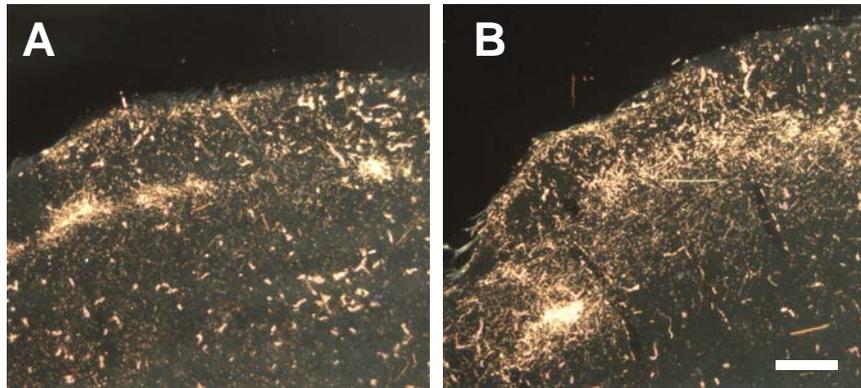


FIGURA 25. Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais do colículo superior em aumento de 100x evidenciando a reorganização dos axônios ipsolaterais após lesão de retina em DPN 21 de animais tratados com salina até DPN 28 (A) e PCPA de DPN 0 até DPN 28 (B). Escala: 300 μ m

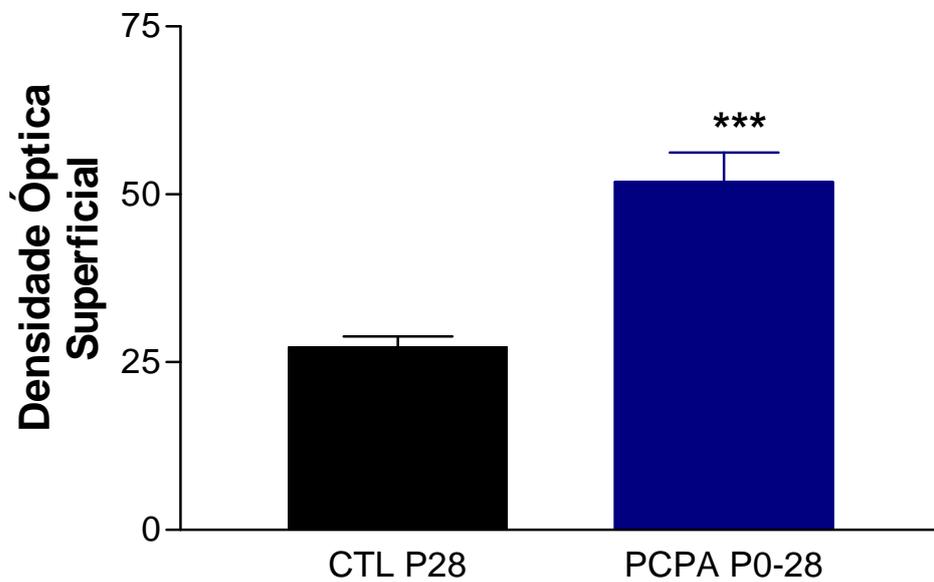


FIGURA 26. Análise de densidade óptica de marcação superficial na área de lesão do colículo superior. Os animais tratados com PCPA de DPN 0 até DPN 28 mostram diferenças significativas em relação ao controle para $P < 0,001$ CTL n=4, PCPA n=5.

4.6 EFEITOS DO TRATAMENTO COM PCPA SOBRE A EXPRESSÃO DE P-CREB NO COLÍCULO SUPERIOR.

Vários estudos mostram que os receptores 5-HT1A e 5-HT1B, amplamente distribuídos nas camadas visuais do colículo superior, são acoplados negativamente a enzima adenilil ciclase que produz AMPc a partir de ATP. Sabe-se que alguns efeitos do AMPc são mediados pela ativação da PKA e fosforilação do fator de transcrição CREB (Mooney et al, 1996; Raymond *et al.*, 2001; Debski *et al.*, 2002). Assim, fomos avaliar se a manipulação da serotonina através do PCPA poderia interferir com o estado de fosforilação e consequentemente ativação deste fator. A Fig. 27 ilustra um western blot de amostras de colículo superior tratados com veículo ou PCPA entre DPN 0 até DPN 14. É possível notar que o PCPA reduziu de forma significativa os níveis de P-CREB no colículo superior nesses animais (41%) quando comparados ao grupo controle (fig. 27).

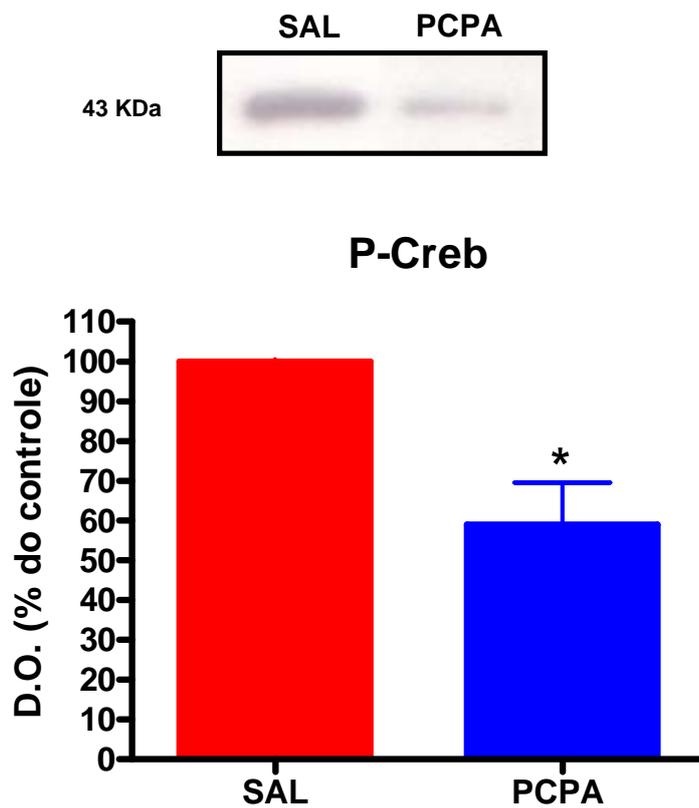


FIGURA 27. Expressão de P-CREB no colículo superior de animais tratados com salina ou PCPA entre DPN0- DPN 14. Notar a redução significativa da expressão de P-CREB em relação ao controle para $P < 0,05$. Sal $n=3$, PCPA $n=3$.

5. DISCUSSÃO

A serotonina é um neurotransmissor amplamente distribuído no sistema nervoso central. Ele é expresso precocemente no sistema nervoso estando diretamente envolvido em processos do desenvolvimento neural como neurogênese, migração celular, apoptose, sinaptogênese, refinamento sináptico (Lesch, 1997). A serotonina atua na plasticidade de circuitos neurais através da liberação do fator trófico derivado do cérebro (BDNF) (Djalali *et al.*, 2005), do fator trófico glial S-100B (Ramos *et al.*, 2000) além de outros mensageiros químicos. A deficiência deste neurotransmissor pode alterar diversos processos do desenvolvimento neural e plasticidade sináptica e está associada a várias doenças de comportamento como esquizofrenia, ansiedade, estresse, distúrbios alimentares, alcoolismo, depressão, doença de Alzheimer, entre outras (Galter *et al.*, 2000).

Este estudo demonstrou os efeitos induzidos pelo tratamento subcrônico e crônico com PCPA sobre o desenvolvimento normal da topografia retinotectal e as respostas plásticas induzidas por lesão de retina de roedores, tanto em estágios iniciais como em fases mais tardias do desenvolvimento. Em roedores, assim como em diversos mamíferos, as estruturas cerebrais têm seu desenvolvimento afetado durante o período crítico tanto por alterações no ambiente microcelular

como pela influencia do meio ambiente. Nesta fase, fenômenos relacionados a plasticidade uso-dependente visual tendem a ser mais evidentes (Berardi et al, 2000).

5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM PCPA SOBRE A EXPRESSÃO DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA SEROTONINA NOS NÚCLEOS DA RAPE.

A análise da imunorreatividade para serotonina nos neurônios localizados nos núcleos mesencefálicos da rafe se constitui em um método útil para avaliar os níveis de serotonina no sistema nervoso central (Ramos *et al.*, 2000).

Apesar de ter uma ação farmacológica como bloqueador da triptofano hidroxilase, enzima da via de síntese da serotonina, o tratamento com PCPA resultou em diferentes padrões de expressão de serotonina no núcleos da rafe. A imunorreatividade para serotonina em ambos os núcleos foi significativamente reduzida após o tratamento agudo com PCPA, do nascimento até DPN 2. O tratamento por quatro dias (DPN10 -DPN14), a imunorreatividade nesses neurônios apresentou níveis semelhantes ao controle, provavelmente refletindo uma normalização induzida pelo aumento de transcrição gênica. No tratamento crônico, de DPN 0 até DPN 14, a imunorreatividade foi

significativamente maior quando comparado com o controle, provavelmente refletindo a *up-regulation* da transcrição do gene do triptofano hidroxilase (Park *et al.*, 1994).

A triptofano hidroxilase é uma enzima importante na biossíntese da serotonina. No sistema nervoso central a triptofano hidroxilase é inicialmente sintetizada nos núcleos da rafe. A atividade da triptofano hidroxilase no cérebro é inibida irreversivelmente pela administração de PCPA, resultando em uma rápida depressão dos níveis de serotonina. A recuperação da atividade da enzima e da concentração de serotonina requer a síntese de novas enzimas.

Cortés e colaboradores em 1992 mostraram através da hibridização *in situ* que uma única dose de PCPA (300mg/kg) aumentou significativamente os níveis de RNAm da triptofano hidroxilase no núcleo dorsal da rafe. Cinco dias após o tratamento, esses níveis retornaram aos níveis controles. O aumento nos níveis de RNAm da triptofano hidroxilase foram simultâneos à inibição da atividade da enzima (Cortés *et al.*, 1992). Este dado corrobora o encontrado por Richard em 1990 que observou significativa redução dos níveis da enzima triptofano hidroxilase dois dias após a administração de única dose de PCPA, seguida por um aumento em relação ao controle sete dias após o tratamento (Richard *et al.*, 1990). Estes estudos sugerem que haja uma *up-regulation* da transcrição do gene triptofano hidroxilase seguido da

síntese de novas enzimas o que explicaria a recuperação dos níveis de serotonina observados em nosso resultado.

Outro limitante da síntese e liberação de serotonina é a ativação de auto-receptores, 5-HT1A e 5-HT1B nos terminais serotoninérgicos (Hoyer *et al.*, 2002). É possível que a depressão inicial dos níveis extracelulares de serotonina induzida pelo tratamento agudo com PCPA nos núcleos da rafe tenha contribuído para o aumento da síntese de serotonina através da redução da ativação destes autoreceptores.

O tratamento com PCPA também pode afetar a expressão do transportador serotoninérgico (SERT). O SERT é um carreador de membrana plasmática que transporta a serotonina da fenda sináptica para dentro do terminal serotoninérgico (Siegel *et al.*, 1999). O PCPA produz *up-regulation* do RNAm do transportador de serotonina nos corpos celulares serotoninérgicos sete dias após o tratamento (Ratteay *et al.*, 1996). O aumento na expressão do transportador de serotonina nas células serotoninérgicas pode contribuir para o aumento da concentração intracelular de serotonina nos núcleos da rafe.

5.2 SEROTONINA E A PLASTICIDADE DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Neste estudo, ao analisar o desenvolvimento da topografia retinotectal foi observado que os animais com tratamento crônico com PCPA durante e após o período crítico apresentaram projeções difusas no sentido rostro-caudal com ausência de aglomerados de marcação na borda ventral do SGS. No tratamento subcrônico, também foi observada uma reorganização das projeções retinotectais que apresentavam aglomerados de marcação na borda ventral do colículo superior e, ao mesmo tempo, um espalhamento de fibras no sentido caudal. Os dados de lesão de retina em animais com tratamento crônico com PCPA durante e após o período crítico evidenciaram uma amplificação da resposta plástica dos axônios visuais em áreas correspondentes à denervação.

Bastos (1999) mostrou que o aumento da serotonina pelo tratamento crônico com fluoxetina afeta o desenvolvimento topográfico de ratos durante o período crítico e produz uma reorganização dos axônios retinotectais, além de amplificar a resposta plástica após lesão de retina nos mesmos (Bastos *et al.*, 1999; Forestiere, 2003). Por outro lado, a diminuição deste neurotransmissor no sistema retinotectal leva à alterações compatíveis com atraso no desenvolvimento. Esta hipótese

foi sugerida por González (2003) através da utilização de dieta com restrição de triptofano – aminoácido precursor da serotonina- onde se observou um padrão de organização semelhante a estágios mais precoces do desenvolvimento com fibras ectópicas na região caudal do colículo superior em DPN 10 e DPN 21. O tratamento crônico com esta dieta diminuiu a reorganização plástica dos axônios retinotectais após lesão de retina, não sendo revertida com o aumento da sobrevivência, sugerindo déficit permanente (Gonzalez *et al.*, 2003, artigo em preparação).

De forma geral, esses resultados sugerem um papel modulatório da serotonina sobre o desenvolvimento e maturação da topografia retinotectal. Um estudo anterior mostrou que a serotonina exerce forte ação inibitória pré-sináptica no tecto óptico e que o aumento extracelular da mesma está associado à redução da LTP no córtex visual primário de roedores (Malayev & Debski, 1998). Este efeito é possivelmente mediado pela ativação de receptores pré-sinápticos do tipo 5-HT_{1B} localizados nos terminais de axônios retinotectais e que medeiam uma inibição pré-sináptica (Boulengez *et al.*, 1996). Recentemente, foi demonstrado em camundongos *knock-out* para o receptor 5-HT_{1B} que a ausência deste receptor também pode prejudicar o refinamento topográfico das projeções retinotectais. Este grupo apresentou projeções ipsolaterais difusas com perda dos aglomerados

de marcação após tratamento com PCPA entre DPN10 e DPN12 (Upon *et al.*, 2002).

Acredita-se que os efeitos da serotonina sobre a plasticidade sináptica sejam obtidos em grande parte por sua habilidade em alterar os níveis intracelulares de cálcio, ativar sistemas de segundo mensageiros, além de antagonizar a ativação do receptor NMDA (Shutoh *et al.*, 2000; Adagawa *et al.*, 2001). A ativação de receptores NMDA está fortemente envolvida na estabilização de sinapses ao induzir a LTP (Artola & Singer, 1990). Dados da literatura sugerem que a serotonina exerce uma ação modulatória sobre a transmissão glutamatérgica ao inibir a ativação de receptores NMDA (Murase *et al.*, 1990), o que também promove o rompimento da topografia retinotectal (Constantine-Paton, 1994; Debski e Cline, 2002). Estudos mostram que a LTP gerada pelo receptor NMDA no córtex visual é inibida pela ativação de receptores 5-HT1A e 5-HT2 no final do período crítico (Kim *et al.*, 2006).

Esses dados sugerem que o bloqueio da sinalização sináptica, por inibição da transmissão retinotectal, facilita a desestabilização de sinapses e a conseqüente modificação plástica no colículo superior.

A serotonina possui um importante papel no desenvolvimento no sistema nervoso central. Durante o desenvolvimento neuroquímico do sistema nervoso de mamíferos, o sistema serotoninérgico é um dos primeiros a surgir. Em ratos, no período neonatal, os níveis de

serotonina são altos no cérebro imaturo assim como a expressão de seus receptores de alta afinidade. Ela exerce grande influência sobre diversos processos do desenvolvimento incluindo neurogênese, diferenciação neuronal e sinaptogênese. Alguns desses processos são mediados pelo fator trófico S-100 β , uma proteína derivada de células gliais que possui efeitos parácrinos e autócrinos em neurônios e glias. Este fator de crescimento pode atuar tanto como proteína mitogênica, estimulando a proliferação de células, como um fator neurotrófico, atuando na maturação e diferenciação de neurônios imaturos (Rothermundt, 2003). A serotonina regula a síntese do S-100 β pelo astrócito através da ativação do receptor 5-HT_{1A}. O efeito do receptor de serotonina na célula glial foi evidenciado pelo aumento da imunorreatividade intracelular em astrócitos e nos níveis totais de S-100 β no cérebro de rato após o tratamento com 8-OH-DPAT, um agonista do receptor 5-HT_{1A} (Ramos *et al.*, 2004). O S-100 β induz proliferação e crescimento de neuritos ao atuar no citoesqueleto interagindo e estabilizando proteínas associadas a microtúbulos como TAU e MAP2, possivelmente através da inibição da fosforilação. Ela também inibe a fosforilação da proteína associada ao crescimento GAP-43 levando ao prolongamento e plasticidade dos cones de crescimento. Em animais maduros, o S-100 β continua atuando sobre a plasticidade,

preservação dendrítica e consolidação da memória (Whitaker-Azmitia, 2001).

A diminuição de serotonina pode acarretar em redução dos níveis de BDNF, uma proteína endógena pertencente à família das neurotrofinas, que está envolvida em processos de sobrevivência, crescimento, diferenciação celular, além de atuar na plasticidade sináptica. Mark e colaboradores em recente revisão postulam a existência de uma co-relação entre a serotonina e BDNF, onde a serotonina estaria estimulando a expressão de BDNF enquanto o BDNF aumentaria o crescimento e a sobrevivência de neurônios serotoninérgicos (Mark *et al.*, 2004). O BDNF influencia o desenvolvimento do sistema serotoninérgico pela estimulação da expressão de S-100B em astrócitos (Djalali *et al.*, 2005)

Além de atuar como fator trófico durante a morfogênese, diferenciação e sinaptogênese de regiões inervadas pelos seus aferentes a serotonina tem forte influência na modulação da transmissão sináptica (Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1997; Kojic *et al.*, 1997; Edagawa *et al.*, 1998). As modificações na eficácia sináptica estão provavelmente relacionadas com mecanismos de plasticidade sináptica. A potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) são geradas a partir da eficácia da sinalização tanto do terminal pré-sináptico quanto da resposta pós-sináptica. Vários trabalhos

demonstraram que os mecanismos celulares de LTP e LTD ocorrem durante os estágios de refinamento topográfico dependente de atividade durante o início do desenvolvimento do sistema visual (Schmidt, 1990; Kirkwood & Bear, 1994; Volgushev *et al.*, 1994; Mize, 2000). Enquanto LTP, durante o desenvolvimento, fortalece e estabiliza as sinapses pela potenciação da transmissão sináptica (Crair & Malenka, 1995), a LTD leva a um enfraquecimento e eventual eliminação axonal (Konnerth & Eilers, 1994). A serotonina inibe a indução de LTP no córtex visual primário de ratos (Edagawa *et al.*, 1998). Estes autores mostraram *in vitro* o bloqueio da LTP pela serotonina no córtex visual de rato. O efeito foi revertido na falta de serotonina ou pelo bloqueio de seus receptores 5-HT1 e 5-HT2 (Edagawa *et al.*, 1998; Edagawa *et al.*, 2001). Estes receptores e seus subtipos são conhecidos por iniciar cascatas intracelulares que ativam enzimas e mensageiros secundários, como Ca^{++} e AMPc, responsáveis pelo fortalecimento e enfraquecimento de conexões (Malayev & Debski, 1998; Raymond *et al.*, 2001). Normann & Clark demonstraram também que altas concentrações de serotonina provocam inibição de LTP no hipocampo de ratos adultos (Normann & Clark, 2005).

5.3 REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DE P-CREB PELA SEROTONINA

A transcrição gênica representa um importante fator para o rearranjo axonal. Formas de plasticidade de longa duração, LTP e LTD, são conhecidas por requererem transcrição gênica. Esses processos são regulados pelo influxo de cálcio através de receptores de neurotransmissores, incluindo receptores NMDA, e canais de cálcio tipo-L (Debanne *et al.*, 2003). Inúmeros estudos mostraram que CREB, um membro da família de fatores de transcrição, regula a expressão de genes envolvidos na neuroplasticidade, sobrevivência celular e cognição (Mabuchi *et al.*, 2001; West *et al.*, 2002). O aumento nos níveis intracelulares de cálcio ou de AMPc levam a uma cascata de eventos que culminam na fosforilação de CREB, e este quando ativado, inicia a transcrição gênica.

A serotonina modula a ativação de CREB através da via de segundos mensageiros AMPc/PKA . Trabalhos utilizando a *Aplysia* como modelo mostraram que uma simples aplicação de serotonina aumenta a concentração intracelular de AMPc e PKA, estas por sua vez, ativam a transcrição gênica dependente de CREB levando a formação da facilitação de longa duração (Hegde *et al.*, 1997; Mohamed *et al.*, 2005). CREB possui importante papel na transcrição gênica necessária na plasticidade sináptica de vários sistemas de vertebrados. É observada

robusta fosforilação de CREB em neurônios corticais de roedores durante a plasticidade natural (Pham *et al.*, 1999). CREB também está envolvido em processos de aprendizado e memória, através da indução de LTP no hipocampo (Davis *et al.*, 2000).

Como descrito anteriormente, dois subtipos de receptores para serotonina foram isolados nas camadas visuais do colículo superior de roedores: o receptor 5-HT1A, localizado em terminais pós-sinápticos e o receptor 5-HT1B, encontrado em aferentes pré-sinápticos oriundos das células ganglionares da retina (Mooney *et al.*, 1996). Postula-se que receptores do subtipo 5-HT1B atuem inibindo a transmissão sináptica retinotectal em anfíbios (Debski & Malayev, 1998) e roedores (Mooney *et al.*, 1996; Salichon *et al.*, 2001) enquanto receptores do subtipo 5-HT1A ajam afetando a atividade de células coliculares. (Mooney *et al.*, 1996; Butt *et al.*, 2002). É conhecido que estes receptores modulam negativamente a atividade da adenilil ciclase, produtora de AMPc. (Hwang & Dun, 1999; Raymond *et al.*, 2001).

O presente estudo mostrou uma diminuição dos níveis de P-CREB no colículo superior após o tratamento crônico com PCPA. Esses resultados refletem um aumento da inibição serotoninérgica à produção de segundos mensageiros, AMPc, e posterior ativação de CREB no núcleo. Com a diminuição da fosforilação de CREB no colículo superior, acreditamos que esteja havendo uma diminuição da estabilidade dos

axônios retinotectais. Isto explicaria os resultados neuroanatômicos observados neste trabalho, onde o aumento de serotonina pelo tratamento crônico com PCPA estaria causando brotamento das projeções retinotectais no colículo superior pela diminuição da eficácia sináptica neste local pela ativação e receptores 5-HT1B.

6. CONCLUSÕES

- 1- O PCPA é capaz de induzir redução (tratamento agudo) seguida de aumento (tratamento crônico e subcrônico) da expressão de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe
- 2- Os tratamentos crônico e subcrônico com PCPA induzem aumento da inervação retinotectal ipsolateral caracterizando ruptura da topografia normal.
- 3- O tratamento crônico com PCPA induz aumento da plasticidade de axônios intactos no modelo de lesão
- 4- O tratamento crônico com PCPA induz redução dos níveis da P-CREB no CS

7. BIBLIOGRAFIA

ADELL A, CELADA P, ABELLAN MT, ARTIGAS F. (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev. Sep;39(2-3): 154-80.*

ALTMAN, J., & BAYER, S. A. Time of origin of neurons of the rat superior colliculus in relation to other components of the visual and visuomotor pathways. (1981). *Experimental Brain Research. 42: 424 - 434.*

ANTON, E. S; KREIDBERG, J. A., & RAKIC, P. (1999). Distinc function of alfa-3 and alfa-5 integrins receptors neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron.22: 277 - 289.*

ARANCIO O, KANDEL ER, HAWKINS RD. (1995). Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature. Jul 6;376(6535):74-80.*

ARCE EA, BENNETT-CLARKE CA, MOONEY RD, RHOADES RW. (1992). Synaptic organization of the serotonergic input to the superficial gray layer of the hamster's superior colliculus. *Synapse. May;11(1):67-75.*

ARTOLA A, SINGER W. (1990). The Involvement of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in Rat Visual Cortex. *Eur J Neurosci.;2(3):254-269.*

AZMITIA, E. C. (1999). Serotonin neurons, neuroplasticity and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology, 21(2s): 33S - 45S.*

AZMITIA, E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*, 56(5): 413 - 424.

AZMITIA, E. C., & WHITAKER-AZMITIA, P. M. (1997). Development and adult plasticity of serotonergic neurons and their target cells. (pp. 1 - 39).

BÄHR, M., & WIZENMANN, A. (1996). Retinal ganglion cell axons recognize specific guidance cues present in the deafferented adult rat superior colliculus. *The Journal of Neuroscience*, 16(16): 5106 - 5116.

BALLABRIGA, A. (1990). Malnutrition and the Central Nervous System. In: *The Malnourished Child*. Edited by RM Suskind. New York: Raven Press Ltd. 177-195.

BARNES, N. M., & Sharp, t. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38, 1083-1152.

BASTOS, E. F. J. L.; MARCELINO; AMARAL, A.R. AND SERFATY, C.A. (1999). "Fluoxetine-induced plasticity in the rodent visual system." *Brain Res* 824(1): 28-35.

BEITZ, A. J, CLEMENTS, J. R, MULLETT, M. A, ECKLUND, L. J. (1986). Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. *J. Comp. Neurol*, v.22, 250(4): 498-509.

BENES FM, TAYLOR JB, CUNNINGHAM MC. (2000). Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex

during the postnatal period: implications for the development of psychopathology. *Cereb Cortex*. Oct;10(10):1014-27. Review

BERARDI, N; PIZZORUSSO, T; & MAFFEI, L. (2000). Critical periods during sensory development. *Current Opinion in Neurobiology*, 10: 138 - 145.

BINNS KE.(1999). The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the superior colliculus. *Prog Neurobiol*. Oct;59(2):129-59. Review.

BLAKELY RD, DE FELICE LJ, HARTZELL HC. (1994). Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol*. Nov;196:263-81.Review.

BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361:31-39.

BLUNDELL JE. (1992). Serotonin and the biology of feeding. *Am J Clin Nutr*. Jan;55(1 Suppl):155S-159S. Review.

BOROWSKY, B. & HOFFMAN, B. J. N. (1995). Neurotransmitter transporters: Molecular biology, function and regulation. *Int. Rev. Neurobiol*, v. 38: 139-199.

BOULENGEZ, P. PINARD, R. E SEGU, L. (1996). Subcellular localisation of 5-HT_{1B} binding sites in the stratum griseum superficiale of the rat

superior colliculus: an electron microscopic quantitative autoradiographic study. *V. 24*: P203-212.

BRUSCO, A., VEDRA, J. P. S., SCICOLONE, G., & FLORES, V. (1995). Development of serotonergic innervation of the chick embryo tectum opticum. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 13: 835 - 843.

BUTT CM, ZHAO B, DUNCAN MJ, DEBSKI EA. (2002). Sculpting the visual map: the distribution and function of serotonin-1A and serotonin-1B receptors in the optic tectum of the frog. *Brain Res* 22;931(1):21-31.

CAMPELLO-COSTA P, FOSSE-JUNIOR AM, OLIVEIRA-SILVA P, SERFATY CA. (2006) Blockade of arachidonic acid pathway induces sprouting in the adult but not in the neonatal uncrossed retinotectal projection. *Neuroscience*. 139(3):979-89. Epub Feb 10.

CAMPELLO-COSTA, P, FOSSE, A. M. J. R., RIBEIRO, J.C., PAES-DE-CARVALHO, R, SERFATY, C.A. (2000). Acute blockade of nitric oxide synthesis induces disorganization and amplifies lesion-induced plasticity in the rat retinotectal projection. *J. Neurobiol*, v. 15;44(4): 371-381.

CYNADER, M. S., WANG, Y. & GU Q. (1997). Blockade of serotonin-2C receptors by mesulergine reduces ocular dominance plasticity in kitten visual cortex. *Exp. Brain res*, v.114: 321-328.

CLARKE PGH, OPPENHEIM RW. (1995). Neuron Death in Vertebrate Development: In Vivo Methods. In: *Methods in Cell Biology*. Anonymous Academic Press, Inc: 277-321.

CONSTANTINE-PATON, M.; CLINE, H.T. & DEBSKI, E.A. (1990). Patterned Activity, Synaptic Convergence and the NMDA Receptor in Developing Visual Pathways. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 13: 129-154.

CONSTANTINE-PATON, M. (1994). Effects of NMDA Receptor Antagonists on the Developing Brain. *Psychopharmacology Bulletin.* v. 30: 561-565.

CORTÉS R, MENGOD G, CELADA P, ARTIGAS F. (1993). P-chlorophenylalanine increases tryptophan-5-hydroxylase mRNA levels in the rat dorsal raphe: a time course study using in situ hybridization. [J Neurochem.](#) Feb;60(2):761-4.

CRAIR, M. C. & MALENKA, R. C. (1995). A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature*, v. 25;375(6529): P. 325-328.

CYNADER, M.; SHAW, C.; PRUSKY, G. & HUIZEN, F.V. (1990). Neural Mechanisms Underling Modifiability of Response Properties in Developing Cat Visual Cortex. *Vision and the Brain*: 85-108.

CYNADER, M. S., SHAW, A. C., PRUSKY, G., & HULSEN, F. V. (1990). Neural mechanisms underling modifiability of response properties in developing cat visual cortex. *Vision and the Brain*: 85 - 108.

DAVIS S, VANHOUTTE P, PAGES C, CABOCHE J, LAROCHE S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene

expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci.* Jun 15;20(12):4563-72.

DEBANNE D, DAOUDAL G, SOURDET V, RUSSIER M. (2003). Brain plasticity and ion channels. *J Physiol Paris.* Jul-Nov;97(4-6):403-14. Review.

DEBSKI, E. A., & CLINE, H. T. (2002). Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. *Current Opinion in Neurobiology*, 12: 93 - 99.

DEBSKI, E. A., & CLINE, H. T. (2002). Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. *Current Opinion in Neurobiology*, 12: 93 - 99.

DEBSKI, E. A., CLINE, H., & CONSTANTINE-PATON, M. (1990) Activity-dependent tuning and the NMDA receptor. *Journal of Neurobiology*, 21: 18 - 32.

DEL ANGEL-MEZA, A. R., FERIA-VELASCO, A ., ONTIVEROS-MARTÍNEZ, L., GALLARDO, L., GONZALEZ-BURGOS, I. , & BEAS-ZÁRETE, C. (2001) Protein- and tryptophan-restricted diets induces changes in rat gonadal hormone levels. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12: 192-199.

DEL ANGEL-MEZA, A. R., olvera-cortés, e., perez-vega, m. I & GONZALEZ-BURGOS, I. (2001). A tryptophan-deficient cornbased diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rar offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*, b, 19: 447-453.

DJALALI S, HOLTJE M, GROSSE G, ROTHE T, STROH T, GROSSE J, DENG DR, HELLWEG R, GRANTYN R, HORTNAGL H, AHNERT-HILGER G. (2005). Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J Neurochem.* Feb;92(3):616-27.

DORI, I. E., DINOPOULOS, A., & PARNAVELAS, J. G. (1998). The development of the synaptic organization of the serotonergic system differs in brain areas with different functions. *Experimental.*

DRESCHER, U . (1997). The Eph family in the patterning of neural development. *Curr Biol.* 7(12): R799-807.

DRESCHER U, BONHOEFFER F, MULLER BK. (1997). The Eph family in retinal axon guidance. *Curr Opin Neurobiol.* Feb;7(1):75-80. Review

DRESCHER U, KREMOSER C, HANDWERKER C, LOSCHINGER J, NODA M, BONHOEFFER F. (1995) In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell.* Aug 11;82(3):359-70.

EATON MJ, GUDEHITHLU KP, QUACH T, SILVIA CP, HADJICONSTANTINO M, NEFF NH. (1993). Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. *J Comp Neurol.* Nov 22;337(4):640-54.

EDAGAWA, Y., SAITO, H., ABE, K. (1998) 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of long-term potentiation in rat visual cortex. *E. J. Pharmacology*, v. 349: 221-224.

EDAGAWA, Y., SAITO, H., ABE, K. (1998). Serotonin inhibits the induction of long-term potentiation in rat primary visual cortex. *Prog. Neuro-Psychopharm. & Biol. Psychiat*, v.22: 982-997.

EDAGAWA, Y., SAITO, H., ABE, K. (2001). Endogenous serotonin contributes to a developmental decrease in long-term potentiation in the rat visual cortex. *J. Neurosci.* V. 21: 1532-1537.

FAWCET, J. W., & O`LEARY, D. M. (1985). Postnatal neurogenesis and changing connections. *Trends Neuroscience*, February, 53 - 56. *Neurology*, 154: 113 - 125.

FINLAY, B.L. & PALLAS, S.L. (1989). Control of cell number in the developing mammalian visual system. *Prog. Neurobiol.* v. 32: 207-234.

FROST, D. O., & SCHNEIDER, G. E. (1979). Plasticity of retinofugal projections after partial lesions of the retina in newborn Syrian hamsters. *Journal of Comparative Neurology*, 185: 517 - 567.

GALLI L, MAFFEI L. (1988). Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science*. Oct 7;242(4875):90-1.

GALTER D, UNSICKER K. (2000). Brain-derived neurotrophic factor and trkB are essential for cAMP-mediated induction of the serotonergic neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. Aug 1;61(3):295-301.

GU, Q. & SINGER, W. (1995). Involvement of Serotonin in Developmental Plasticity of Kitten Visual Cortex. *Curr. Op. Neurobiol.* v. 7: 1146-1153.

HEBB, D.O. (1949). *The Organization of Behavior*. New York: Wiley.

HEGDE AN, INOKUCHI K, PEI W, CASADIO A, GHIRARDI M, CHAIN DG, MARTIN KC, KANDEL ER, SCHWARTZ JH. Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. (1997). *Cell*. Apr 4;89(1):115-26.

HEINE, W. E. (1999) The significance of tryptophan in infant nutrition. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 467: 705 - 710.

HOFBAUER, A., & DRAGER, U. C. (1985). Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to the mouse superior colliculus. *Journal of Comparative Neurology*, 234: 465 - 474.

HOLT, C. E., & HARRIS, W. A. (1998). Target selection: invasion, mapping and cell choice. *Current Opinion in Neurobiology*, 8: 98 - 105.

HOYER D, HANNON JP, MARTIN GR. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. Apr;71(4):533-54. Review.

HUBEL, D.H. & WIESEL, T.N. (1974). Receptive Fields, Binocular Interaction and Functional Architecture in the Cat's Visual Cortex. *J. Physiol*. v.160: 106-154

HWANG LL, DUN NJ. (1999). Serotonin modulates synaptic transmission in immature rat ventrolateral medulla neurons in vitro. *Neuroscience*; 91(3):959-70.

ISA, T., & SAITO, Y. (2001). The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection. *Neuroscience Research*, 41: 107 - 113.

JACOBS BL, FORNAL CA. (1999). Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology*. Aug;21(2 Suppl):9S-15S. Review

JENSEN, G., SO, K. F., & WOO, H. H. (1999). Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology*. 21,9S-15S

JIANG ZG, TESHIMA K, YANG Y, YOSHIOKA T, ALLEN CN. (2000). Pre- and postsynaptic actions of serotonin on rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res*. Jun 2;866(1-2):247-56.

KIM HS, JANG HJ, CHO KH, HAHN SJ, KIM MJ, YOON SH, JO YH, KIM MS, RHIE DJ. (2006) Serotonin inhibits the induction of NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the rat primary visual cortex. *Brain Res*. Aug 4;1103(1):49-55..

KIRKWOOD A, BEAR MF. (1994). Hebbian synapses in visual cortex. *J Neurosci*. Mar;14(3 Pt 2):1634-45.

KNOLL B, DRESCHER U. (2002). Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci*. Mar;25(3):145-9. Review

KNÖLL, B., ISENMANN, S., KILIC, E., WALKENHORST, J., ENGEL, S., WEHINGER, J., BÄHR, M., & DRESCHER, U. (2001). Graded expression

patterns of ephrin-As in the superior colliculos after lesion of the adult mouse optic nerve. *Mechanisms of Development*, 106: 119 - 127.

KOE, B.K. Tryptophan hydroxylase inhibitors. (1971). *Federation Proceedings*, vol 30, no 3, (may-june): 886-896)

KOE, B.K., WEISSMAN, A. (1966), *J. Pharmacol.* Vol. 154, no 3: 499-516

KOJIC L, GU Q, DOUGLAS RM, CYNADER MS. (1997). Serotonin facilitates synaptic plasticity in kitten visual cortex: an in vitro study. *Brain Res Dev Brain Res.* Jul 18;101(1-2):299-304.

KONNERTH, A., & EILERS, J. (1994). Synaptic plasticity and calcium dynamics in cerebellar Purkinje neurons. *Biomedical Research*, 15(1): 73-77

LAND, P.W. & LUND, R.D. (1979). Development of the Rat's Uncrossed Retinotectal Pathway and Its Relation to Plasticity Studies. *Science.* v. 205: 698-700.

LAND, P. W., & LUND, R. D. (1979). Development of the rat`s uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies. *Science*, 205: 698 - 700.

LANFUMEY L, HAMON M. (2000). Central 5-HT(1A) receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol.* Jul;27(5):429-35. Review.

LAUTENSCHLAGER, M., HÖLTJE, M., VON JAGOW, B., VEH, R. W., HARMS, C., BERGK, A., DIRNAGL, U., AHNERT-HILGER, G., & HÖRTNAGL, H. (2000). Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences. *Neuroscience*, 99(3): 519 - 527.

LEONARD BE. (1996). Serotonin receptors and their function in sleep, anxiety disorders and depression. *Psychother Psychosom.* Mar-Apr;65(2):66-75. Review.

LESCH KP, HEILS A, RIEDERER P. (1996). The role of neurotransmitters in excitotoxicity, neuronal cell death, and other neurodegenerative processes. *J Mol Med.* Jul;74(7):365-78. Review

LESCH KP. (2005). Genetic alterations of the murine serotonergic gene pathway: the neurodevelopmental basis of anxiety. *Handb Exp Pharmacol.*;(169):71-112.

LETORNEAU, P. C., COMDIC, M. L., & SNOW, D. M. (1994). Interaction of developing neuron with the extracellular matrix. *The Journal of Neuroscience*, 14(3): 915 - 928.

LINDEN R, PERRY VH. (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain Res.* Aug 1;272(1):145-9.

LUND, R. D., LAND, P. W., & BOLES, J. (1980). Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in albino rats: an HRP study in adults. *Journal of Comparative Neurology*, 189: 711 - 720.

LUND, R. D., & LUND, J. S. (1976). Plasticity in the developing visual system: the effect of retinal lesions made in young rats. *Journal of Comparative Neurology*, 169: 133 - 154.

MABUCHI T, KITAGAWA K, KUWABARA K, TAKASAWA K, OHTSUKI T, XIA Z, STORM D, YANAGIHARA T, HORI M, MATSUMOTO M. (2001). Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo *J Neurosci*. Dec 1;21(23):9204-13.

MADRUGA, M. S., & CAMARA, F. S. (2000). The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement. *Food Chemistry*, 68: 41 - 44.

MALAYEV, A. A. & DEBSKI, E. A. (1998). Serotonin modulates induced synaptic activity in the optic tectum of the frog. *Brain Research*, v. 781: 167-181.

MATTSON MP, MAUDSLEY S, MARTIN B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. Oct;27(10):589-94.

McNAMARA, R. K. & SKELTON, R. W. (1993). The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the morris water maze. *Brain Res*, v. 18: 33-49

MEGUID MM, FETISSOV SO, VARMA M, SATO T, ZHANG L, LAVIANO A, ROSSI-FANELLI F. (2000). Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition*. Oct;16(10):843-57. Review.

MEY, J, & THANOS, S. (2000) Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* Apr;32(2-3):343-79.

MEYER RL. (1983). Tetrodotoxin inhibits the formation of refined retinotopography in goldfish. *Brain Res*Feb;282(3):293-8.

MEISTER, M., WONG, R. O. L., BAYLOR, D. A., & SHATZ, C. J. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the development mammalian retina. *Science*, 252: 939 - 943.

MIZE, R. R. & LO, F. (2000). Nitric oxide, impulse activity, and neurotrophins in visual system development (1). *Brain Res*, 886: 15-32.

MOLOTCHNIKOFF S, ITAYA SK. (1993). Functional development of the neonatal rat retinotectal pathway. *Brain Res Dev Brain Res.* Apr 16;72(2):300-4.

MOONEY, R. D., RHOADES, R. W., CRNKO-HOPPENJANS, T. A., KE, M., BENNETT-CLARKE, C. A., & LANE, R. D. C., N.L. (1998). Augmentation of serotonin in the developing superior colliculus alters the normal development of the uncrossed retinotectal projection. *Journal of Comparative Neurology*, 393(1): 84 - 92.

MOONEY, R. D., RHOADES, R. W., HUANG, X., SHI, M. Y., & BENNETT-CLARKE, C. A. (1996). Serotonin modulates retinotectal and corticotectal convergence in the superior colliculus. *Progress in Brain Research*, 112: 57 - 69.

MOHAMED HA, YAO W, FIORAVANTE D, SMOLEN PD, BYRNE JH. (2005). cAMP-response elements in *Aplysia* creb1, creb2, and Ap-uch promoters: implications for feedback loops modulating long term memory. *J Biol Chem*. Jul 22;280(29):27035-43. Epub 2005 May 11.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T. & GALLER, J.R. (1993). Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. *Neurosci. and Biobehavioral Reviews*. v. 17: 91-128.

MOSSNER R, LESCH KP. (1998). Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun*. Dec;12(4):249-71. Review.

MRSIC-FLOGEL TD, HOFER SB, CREUTZFELDT C, CLOEZ-TAYARANI I, CHANGEUX JP, BONHOEFFER T, HUBENER M. (2005.) Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves. *J Neurosci* Jul 20;25(29):6921-8

MU Y, POO MM. (2006) Spike timing-dependent LTP/LTD mediates visual experience-dependent plasticity in a developing retinotectal system. *Neuron*. Apr 6;50(1):115-25.

MULKEY RM, ENDO S, SHENOLIKAR S, MALENKA RC. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*. Jun 9;369(6480):486-8.

MÜLLER, A., HILBIG, H., BIDMON, H. J., & ETTRICH, P. (2000). Projection neurons in the superficial layers of the superior colliculus in

the rat: A topographic and quantitative morphometric analysis. *Neuroscience*, 96(1):109 - 119.

MURASE K, RANDIC M, SHIRASAKI T, NAKAGAWA T, AKAIKE N. (1990). Serotonin suppresses N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated spinal dorsal horn neurons of the rat. *Brain Res.* Aug 13;525(1):84-91.

NOGUEIRA, M. I; TAKASE, L. F; SOUZA, S. L. (2004) Serotonina: A trajetória evolutiva de uma molécula de ampla ação trófica e neurológica. *Ciência Hoje março* ,vol.34, no 202.

NORMANN C, CLARK K. (2005). Selective modulation of Ca(2+) influx pathways by 5-HT regulates synaptic long-term plasticity in the hippocampus. *Brain Res.* Mar 10;1037(1-2):187-93.

O'LEARY DD, MCLAUGHLIN T. (2005). Mechanisms of retinotopic map development: Ephs, ephrins, and spontaneous correlated retinal activity. *Prog Brain Res.*;147:43-65

PARK DH, STONE DM, BAKER H, KIM KS, JOH TH. (1994). Early induction of rat brain tryptophan hydroxylase (TPH) mRNA following parachlorophenylalanine (PCPA) treatment. *Brain Res Mol Brain Res.* Mar;22(1-4):20-8.

PARSONS MJ, BENCA RM, BROWNFIELD MS, BEHAN M. (2001). Age-associated changes in the serotonergic system in rat superior colliculus and pretectum. *Brain Res Bull.* Jun;55(3):435-44.

PHAM TA, IMPEY S, STORM DR, STRYKER MP. (1999). CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the

developmental critical period. *Neuron*. 1999 Jan;22(1):63-72. Erratum in: *Neuron* Mar;22(3):635.

PURVES, D., AUGUSTINE, G. J, FITZPATRICK, D., KATZ, L. C., LAMANTIA, A. S. (2004). *Neuroscience*, 2a ed, Mc Namarca.

RAMOS AJ, TAGLIAFERRO P, LOPEZ EM, PECCI SAAVEDRA J, BRUSCO A. (2000). Neuroglial interactions in a model of para-chlorophenylalanine-induced serotonin depletion. *Brain Res*. Nov 10;883(1):1-14.

RATTRAY M, BALDESSARI S, GOBBI M, MENNINI T, SAMANIN R, BENDOTTI C. (1996). P-Chlorophenylalanine changes serotonin transporter mRNA levels and expression of the gene product. *J Neurochem*. Aug;67(2):463-72.

RAYMOND, R. J., MUKHIN, Y. V., GELASCO, A., TURNER, J., COLLINSWORTH, G., GETTYS, T. W., GREWAL, J. S., & GARNOVSKAYA, M. N. (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics*, 92: 179 - 212.

REESE, B. E., & COLLELO, R. J. (1992). Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience*, 46: 419 - 429.

RÉTAUX, S & HARRIS, W. A. (1996). Engrailed and retinotectal topography. *Trends Neuroscince*, v.19: 542-546.

RICHARD F, SANNE JL, BOURDE O, WEISSMAN D, EHRET M, CASH C, MAITRE M, PUJOL JF. (1990). Variation of tryptophan-5-hydroxylase concentration in the rat raphe dorsalis nucleus after p-

chlorophenylalanine administration. I. A model to study the turnover of the enzymatic protein. *Brain Res.* Dec 17;536(1-2):41-5.

RIND, H. B., RUSSO, A. F., & WHITTEMORE, S. R. (2000). Developmental regulation of tryptophan hydroxylase messenger RNA expression and enzyme activity in the raphe and its target fields. *Neuroscience*, 101(3): 665 - 677.

RHOADES, R.W.; MOONEY, R.D.; CHIAIA, N.L. & BENNET-CLARKE, C.A. (1990). Development and Plasticity of the Serotonergic Projection to the Hamster's Superior Colliculus. *J. Comp. Neurol.* v. 299:151-166.

RHOADES, R. W., BENNETT-CLARKE, C. A., LANE, R. D., LESLIE, M. J., & MOONEY, R. D. (1993). Increased serotonergic innervation of the hamster`s superior colliculus alters retinotectal projections. *Journal of Comparative Neurology*, 334: 397 - 409.

ROTHERMUNDT M, PETERS M, PREHN JH, AROLT V. (2003). S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* Apr 15;60(6):614-32. Review.

SALICHON N, GASPAR P, UPTON AL, PICAUD S, HANOUN N, HAMON M, DE MAEYER E, MURPHY DL, MOSSNER R, LESCH KP, HEN R, SEIF I. (2001). Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. *J Neurosci.* Feb 1;21(3):884-96.

SARI Y. (2004). Serotonin1B receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* Oct;28(6):565-82. Review.

SCHMIDT JT. (1990). Long-term potentiation and activity-dependent retinotopic sharpening in the regenerating retinotectal projection of goldfish: common sensitive period and sensitivity to NMDA blockers. *J Neurosci.* Jan;10(1):233-46.

SCHMIDT JT. (2004). Activity-driven sharpening of the retinotectal projection: the search for retrograde synaptic signaling pathways. *J Neurobiol.* Apr;59(1):114-33. Review.

SCHMIDT JT, EDWARDS DL. (1983). Activity sharpens the map during the regeneration of the retinotectal projection in goldfish. *Brain Res.* Jun 13;269(1):29-39.

SCHMIDT, J. T., & TIEMAN, S. B. (1985). Eye-specific segregation of optic afferents in mammals, fish and frogs: the role of activity. *Cellular Molecular Biology*, 5: 5 - 34.

SHATZ, C. J. (1993). Emergence of order in visual system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 602 - 608.

SHATZ, C.J. *The Developing Brain. Scientific American.* . p. 35-41.

Shatz CJ. (1996). Emergence of order in visual system development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 23;93(2):602-8. Review.

SHUTOH F, HAMADA S, SHIBATA M, NARITA M, SHIGA T, AZMITIA EC, OKADO N. (2000). Long term depletion of serotonin leads to selective changes in glutamate receptor subunits. *Neurosci Res.* Dec;38(4):365-71

SERFATY, C. A., & LINDEN, R. (1991). Evidence that the relative densities of afferents from both eyes control laminar distribution and binocular segregation of retinotectal projections in rats. *Developmental Brain Research*, 60: 9 - 17.

SERFATY, C.A. & LINDEN, R. (1994). Development of Abnormal Lamination and Binocular Segregation in the Retinotectal Pathways of the Rat. *Developmental Brain Research*. v. 82:35-44.

SERFATY, C.A. & R. LINDEN (1994). Development of abnormal lamination and binocular segregation in the retinotectal pathways. *Dev. Brain Res.*, v 82:35-44.

----- & R. LINDEN. (1991) "Evidence that the relative densities of afferents from both eyes control laminar distribution and binocular segregation of retinotectal projections in rats." *Dev. Brain Res.* 60: 9-17,

----- B. E. REESE & R. LINDEN. (1990). "Cell death and interocular interactions among retinofugal axons: lack of binocularly matched specificity." *Dev. Brain Res.* 56: 198-204,

----- & R. LINDEN. (1990)."Development of abnormal lamination and binocular segregation of retinal afferents onto the rat superior colliculus." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 23: 663-666.

SERFATY, C. A., REESE, B. E., & LINDEN, R. (1990). Developmental of abnormal lamination and binocular segregation of retinal afferents into the rat superior.

SERFATY, C. A., & LINDEN, R. Development of abnormal lamination and binocular segregation in the retinotectal pathways of the rat. *Developmental Brain Research*, 82, 1994. P 35 - 44.

SERFATY CA, CAMPELLO-COSTA P, LINDEN R. (2005). Rapid and long-term plasticity in the neonatal and adult retinotectal pathways following a retinal lesion. *Brain Res Bull*. Jul 30;66(2):128-34.

SINGER W. (1990) Ontogenetic Self-Organization and Learning. In: *Brain Organization and Memory*. Edited by JL Mc Gaugh, NM Weinberfer, G Lynch. New York: 211-233.

SOBEIH MM, CORFAS G. (2002). Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. *Int J Dev Neurosci*. Jun-Aug;20(3-5):349-57. Review.

SRETAVAN D, SHATZ CJ. (1984). Prenatal development of individual retinogeniculate axons during the period of segregation. *Nature*. Apr 26-May 2;308(5962):845-8.

STENKAMP, D.L. & CAMERON, D. A. (2002). Cellular pattern formation in the retina: retinal regeneration as a model system. *Mol. Vis*. V. 8: 280-93

STUBBS RJ. (1999). Peripheral signals affecting food intake. *Nutrition*. Jul-Aug;15(7-8):614-25. Review

THANOS, S., & MEY, J. (2001). Development of the visual system of the chick II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Research Reviews*, 35: 205 - 245.

THASE ME. (2000). Treatment issues related to sleep and depression. *J Clin Psychiatry*.;61 Suppl 11:46-50. Review.

TOMASULO, R. A., RAMIREZ, J. J., & ATEWARD, O. (1993) Synaptic inhibition regulates associative interactions between afferents during the induction of long-term potentiation and depression. *PNAS* . , 90: 11578-11582.

TONI, N., BUCHS, P. A., NIKONENKO, I., BRON, C. R., & MULLER, D. (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and dendrite. *Nature*, 402: 421-425.

UDIN, S. B., & FAWCET, J. W. (1988). Formation of topographic maps. *Ann. Review of Neuroscience*, 11: 289 - 327.

UPTON, A. L., RAVARY, A., SALICHON, N., MOESSINER, R., LESC, K. P, HEN, R., SEIF, I., GASPAR, P. (2002) Lack of 5-HT1B receptor and of serotonin transporter have different effects on the segregation of retinal axons in the lateral geniculate nucleus compared to the superior colliculus. *Neuroscience*, v.111: 597-610.

VOLGUSHEV M, VORONIN LL, CHISTIAKOVA M, SINGER W. (1994). Induction of LTP and LTD in visual cortex neurones by intracellular tetanization. *Neuroreport*. Oct 27;5(16):2069-72.

WALTHER DJ, BADER M. (1999). Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Res Mol Brain Res*. May 7;68(1-2):55-63.

West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME. (2002). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 25;98(20):11024-31. Review.

Whitaker-Azmitia PM. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull*. Nov 15;56(5):479-85. Review.

WONG RO, MEISTER M, SHATZ CJ. (1993). Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron* Nov;11(5):923-38.

ZIGMOND, M.J., BLOOM, F.E., LANDIS, S.C., ROBERTS, J.L., SQUIRE, L.R.. (1999) *Fundamental Neuroscience*. Academic Press., P 1444.

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](#)