



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROIMUNOLOGIA

LETÍCIA ABEL PENEDO

**IMPACTO DA RESTRIÇÃO NUTRICIONAL DE TRIPTOFANO NA
MODULAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO E NA
PLASTICIDADE DE PROJEÇÕES RETINOTECTAIS**

NITERÓI
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LETÍCIA ABEL PENEDO

**IMPACTO DA RESTRIÇÃO NUTRICIONAL DE TRIPTOFANO NA
MODULAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO E NA
PLASTICIDADE DE PROJEÇÕES RETINOTECTAIS**

Dissertação submetida ao curso de pós-graduação em Neuroimunologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neuroimunologia. Área de concentração: Neurobiologia.

Orientador: Prof. Dr. CLAUDIO ALBERTO SERFATY

NITERÓI
2008

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Plasticidade Neural, do Programa de Neuroimunologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense sob a orientação do Prof^o Claudio 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 à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e PRONEX.

Mãe, essa é mais uma conquista dedicada a você, de muitas outras que com certeza virão, minha fortaleza e inspiradora, de quem a cada dia mais me orgulho de ser filha e tento retribuir com o melhor que consigo. Apesar de toda saudade, que a distância tem nos causado, aí está mais uma prova de que vale a pena.

TE AMO MUITO, e saiba que grande parte desse mérito é seu, que tanto me dá força e acredita no meu potencial. Com você, tudo para mim têm mais sentido, e o seu orgulho é a minha grande satisfação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado força e capacidade para eu chegar até aqui.

Ao meu pai por sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu irmão, e a minha tia Suzi por terem me acompanhado durante toda essa caminhada e me ajudado nos momentos difíceis; amo muito vocês.

A todos da minha família e aos que por alguns momentos fizeram ou ainda fazem parte dela...meus eternos amigos...Valeu por tudo!!!!

Ao meu orientador Cláudio Alberto Serfaty pela oportunidade de desenvolver esse trabalho que me apaixonei, pela paciência e por acreditar na minha capacidade. Ao orientador com o maior carisma e competência que eu já conheci, que me ensinou como é prazerosa a pesquisa científica. Vai ser sempre o meu "Boss" em um lugar muito especial no meu coração.

A Rafaela da Silva Maciel por ter desenvolvido comigo parte desses resultados durante nossa iniciação científica.

Em especial à Professora e minha amiga Priscilla que tanto me ajudou em grande parte dessa tese, tanto em técnicas como no meu conhecimento teórico, e ainda ajuda no que eu preciso com a maior satisfação do mundo, é um coração nota 10.

A minha amiga Aninha que muitas vezes me ajudou no Blot e que com sua amizade fez esses anos de trabalhos serem mais alegres e afetivos.

Àos Professores Ronald Marques dos Santos, Paula Campello Costa Lopes e Adriana da Cunha Faria Melibeu pela competência, carisma e alegria e por terem estado sempre dispostos a me ajudar no que fosse preciso.

Ao Pablo Trindade pela força no começo do meu estágio, por me ensinar técnicas laboratoriais e por estar sempre com muito boa vontade para me ajudar.

A todo o restante da equipe do laboratório que sempre me incentivou e com muita simpatia fazem esse laboratório ser um ambiente de trabalho espetacular: Wandilson, Carlos, Flávio, Henrique, Patrícias, Rachel, Sheila e Tita.

Ao Sr. Bernardino e Alexandro pelo cuidado com os animais do biotério.

As meninas que moram ou moraram comigo por muitas vezes me darem forças para lutar e por serem a minha família de Niterói nesses anos.

A todos os outros amigos que por ventura não foram citados. Muito obrigado!

RESUMO

Em roedores a especificação dos circuitos neurais ocorre durante o período pós-natal com marcante influencia de fatores ambientais. A serotonina (5-HT), cuja única fonte metabólica é o triptofano proveniente da alimentação, está envolvida diretamente nos processos de desenvolvimento neural uso-dependente e nos mecanismos de plasticidade sináptica. Estudamos o efeito da restrição nutricional de triptofano sobre a plasticidade do sistema visual de roedores, em um modelo de reorganização induzida de projeções retinotectais, após lesões unilaterais de retina temporal no décimo dia pós-natal (P10). O padrão de inervação da projeção retinotectal ipsolateral foi avaliado através da injeção intraocular de peroxidase (HRP) entre P14 e P41 em animais alimentados durante 10 a 41 dias com uma dieta escassa em triptofano baseada em milho e gelatina (ração RT), animais alimentados com a mesma dieta, acrescida de quantidades padrão de triptofano (ração CT), ou ração padrão para roedores Nuvital®. Os resultados mostram uma diminuição na capacidade de brotamento de axônios intactos para regiões denervadas do colículo superior após uma lesão na retina contralateral nos animais RT. A reintrodução de triptofano entre P10-21, mas não entre P10 e P14, foi capaz de restaurar a plasticidade retinotectal. A re-alimentação com triptofano, após o término do período crítico, entre P28-41, não restaurou a plasticidade retinotectal o que indica um efeito tempo-dependente para reversão do déficit de plasticidade. Após 14 dias pós-natal, os animais RT apresentaram uma redução na imunorreatividade para serotonina nos núcleos da raphe e uma maior expressão do transportador SERT no colículo superior. A redução da disponibilidade de triptofano resultou em uma maior expressão da pERK, e redução da atividade da metaloprotease-9 de matriz extracelular nas camadas visuais do colículo superior. Estes achados evidenciam a importância deste aminoácido essencial, como modulador da plasticidade durante o período crítico de desenvolvimento dos circuitos sinápticos centrais.

ABSTRACT

The specification of neural circuits in rodents occurs during postnatal periods and is influenced by environmental factors. Serotonin (5-HT) and its metabolic source, tryptophan, an essential aminoacid acquired exclusively through dietary intake, are involved in mechanisms of use-dependent development of the central nervous system. We studied the effects of the nutritional restriction of tryptophan in the plasticity of the rodent visual system in a biological model of induced plasticity of retinotectal projections following unilateral retinal lesions at postnatal day 10. The innervation pattern of the ipsilateral retinotectal projection was analyzed after intraocular injections of horseradish peroxidase (HRP) between P14 and P41 in animals fed through their mothers during 10 to 41 days after birth with a diet with low tryptophan content, based in corn and gelatin (RT diet), a diet complemented with standard tryptophan requirements for rodents (CT diet) or a standard rodent laboratory diet (Nuvital®). The results show a marked reduction in the sprouting of intact axons into denervated territories following a lesion to the contralateral retina in RT animals. The reintroduction of tryptophan between P10-21 and P10-28, but not between P10-14 completely restored retinotectal plasticity. However, the reintroduction of tryptophan after the end of the critical period (P28-P41) did not restore plasticity, suggesting a time-dependent effect to the reversion of the plasticity deficit. At P14, tryptophan restriction resulted in a marked decrease in 5-HT immunoreactivity in the raphe nuclei and in increased SERT immunoreactivity in the collicular visual layers. Tryptophan restriction was associated with an increase in pERK expression and with a decrease in metalloproteinase-9 activity in the superior colliculus. The present findings demonstrate the influence of this essential aminoacid as a modulator of neural plasticity through the reduction in brain serotonin content and matrix degradation during the critical period of development of central synaptic circuitry.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA, p.iv

AGRADEMINTOS, p.v

RESUMO, p.vi

ABSTRACT, p.vii

SUMÁRIO, p.viii

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.xi

LISTA DE ABREVIATURAS, p.xiv

1. INTRODUÇÃO, p.1

1.1 Ingestão Proteica e o Sistema Nervoso Central, p. 1

1.2 O Sistema Visual como Modelo de Estudo, p. 5

1.3 Período Crítico e Plasticidade no Desenvolvimento do Sistema Nervoso, p. 11

1.4 Metaloproteases de Matriz Extracelular e Plasticidade do SNC, p.14

1.5 Sistema Serotoninérgico, p. 18

1.5.1 Serotonina e o Desenvolvimento do SNC, p. 22

1.5.2 Transportador de Serotonina, p.23

1.5.3 Vias de Sinalização do Sistema Serotoninérgico, p.24

1.5.4 Papel da Serotonina na Maturação dos Sistemas Sensoriais e na Plasticidade Sináptica, p. 25

2 OBJETIVOS, p. 28

2.1 Objetivo Geral, p.28

2.2 Objetivos Específicos, p.29

3 MATERIAIS E MÉTODOS, p. 30

3.1 Modelos Experimentais, p. 30

3.2 Dietas, p. 30

3.3 Grupos Experimentais, p. 32

3.4 Técnicas Neuroanatômicas, p. 33

3.4.1 Lesões de Retina Temporal, p. 33

3.4.2 Enucleação Monocular, p.34

- 3.4.3 Injeção Intra-ocular de Peroxidase (HRP), p. 35
- 3.4.4 Perfusão, p. 36
- 3.4.5 Histoquímica para HRP, p. 36
- 3.4.6 Técnica Imunocitoquímica, p. 37
- 3.5 Western Blot, p.38
- 3.6 Zimografia, p. 39
- 3.7 Análise dos resultados, p.40
 - 3.7.1 Ganho Ponderal, p.40
 - 3.7.2 Análise dos Resultados da Imunohistoquímica para Serotonina, p. 40
 - 3.7.3 Análise dos Resultados da Imunohistoquímica para o Transportador de Serotonina (SERT), p.41
 - 3.7.4 Análise Histológica- Mesulan, p.41
 - 3.7.5 Análise dos Resultados: *Western blots* e Zimografia, p.42
- 4 RESULTADOS, p. 43**
 - 4.1 Imunodeteção de Serotonina nos Núcleos da Raphe: Relação com as Dietas CT E RT, p.44
 - 4.2 Imunodeteção do SERT nos Colículos Superiores: Relação com as Dietas CT e RT, p.47
 - 4.3 Avaliação da Expressão da pERK no Colículo Superior de Animais Alimentados com a Dieta CT ou RT, p. 49
 - 4.4 Efeito da Restrição Nutricional de Triptofano na Plasticidade Induzida por Lesão de Retina, p.51
 - 4.5 Análise da Atividade da Metaloprotease – 9 no Colículo Superior de Animais Alimentados com as Dietas CT ou RT, p.57
 - 4.6 Efeito da Enucleação Monocular na Atividade da Metaloprotease– 9 no Colículo Superior de Animais que Receberam Dieta CT ou RT, p.59

5 DISCUSSÃO, p. 63

5.1 Influência das Dietas no Ganho Ponderal, p. 64

5.2 Efeito da Restrição de Triptofano Sobre os Neurônios Serotoninérgicos dos Núcleos da Raphe, p. 65

5.3 Restrição Nutricional de Triptofano Modulando o Transportador de Serotonina (SERT), p.66

5.4 Serotonina e LTP, p. 67

5.5 Restrição Nutricional de Triptofano na Expressão de pERK, p.68

5.6 Papel da Serotonina no Refinamento Topográfico e Plasticidade: Modelo de Restrição Nutricional, p. 69

5.7 Atividade da Metaloptotese-9 na Restrição Nutricional de Triptofano, p.73

6 CONCLUSÃO, p. 76**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 78****8 ANEXO**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA I	Teor de triptofano em alimentos de origem animal e vegetal, p.4
FIGURA 1	Esquema mostrando as vias visuais, p. 6
FIGURA 2	Laminação no colículo superior, p. 7
FIGURA 3	Esquema representando a topografia retinotectal, p. 9
FIGURA 4	Estudo do desenvolvimento das projeções retinotectais, p.12
TABELA II	Períodos Críticos de Desenvolvimento do Sistema Visual, p. 13
FIGURA 5	Efeito da lesão de retina temporal no Colículo Superior, p.14
FIGURA 6	MMPs regulando eventos de desenvolvimento e regeneração no SNC, p.16
FIGURA 7	Esquema mostrando os núcleos da raphe e as suas projeções, p. 18
FIGURA 8	Esquema mostrando as vias de síntese e degradação da serotonina, p. 19
TABELA III	Composição centesimal da dieta com restrição de triptofano (RT), p.31
TABELA IV	Composição centesimal da dieta com complementação de triptofano (CT), p. 31
TABELA V	Dietas recebidas pelos diferentes grupos experimentais, p. 33
FIGURA 9	Esquema ilustrando o modelo de enucleação monocular, p. 34
FIGURA 10	Modelo de lesão parcial da retina temporal e plasticidade dos axônios do olho intacto, p.35
TABELA VI	Relação de anticorpos utilizados, suas respectivas concentrações e fonte de obtenção, p. 39
FIGURA 11	Análise quantitativa da variação ponderal dos animais controle e tratados, p. 44
FIGURA 12	Imunorreatividade para serotonina em cortes parassagitais dos núcleos ventrais da raphe em ratos no dia pós-natal 14, p. 45
FIGURA 13	Imunorreatividade para serotonina em cortes parassagitais dos núcleos da região dorsal da raphe em ratos P14, p. 46
FIGURA 14	Histograma da quantificação da média do número de células marcadas na imunorreatividade para serotonina, p. 46

- FIGURA 15** Imunorreatividade para SERT em cortes parassagitais de colículos superiores de ratos CT (A) e RT (B) no dia pós-natal 14, p.48
- FIGURA 16** Histograma mostrando a densidade óptica de fibras marcadas na imunorreatividade para SERT, p.49
- FIGURA 17** Imunodeteção da expressão das isoformas fosforiladas da proteína cinase ERK em animais CT e RT (A),P14. Controle de carregamento ERK-TOTAL (B). Histogramas mostrando a área da densidade óptica da banda relativa a quantidade de pERK nas amostras experimentais(C, D), p.50
- FIGURA 18** Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais do colículo superior de animais que receberam a dieta Nuvital® (A), ou a dieta CT (B) até P14, p.52
- FIGURA 19** Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais de colículos superiores ipsolaterais mostrando o efeito da restrição de triptofano frente à lesão de retina temporal, p. 53
- FIGURA 20** Análise de densidade óptica da marcação superficial na área de lesão do colículo superior dos animais experimentais em P14, p. 54
- FIGURA 21** Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais do colículo superior de animais que foram alimentados com a ração controle Nuvital® até P21 e que receberam a ração restrita de triptofano até P10 e a ração CT de P10 a P21, p.55
- FIGURA 22** Análise de densidade óptica da marcação superficial na área de lesão do colículo superior dos animais fotografados na figura 21, p. 55
- FIGURA 23** Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais do colículo superior de animais que foram alimentados com a ração controle Nuvital® até P41 e que receberam a ração restrita de triptofano até P28 e a ração CT até P41, p. 56

- FIGURA 24** Análise de densidade óptica da marcação superficial na área de lesão do colículo superior dos animais fotografados na figura 23, p. 57
- FIGURA 25** Detecção da atividade enzimática da metaloprotease-9 no colículo superior dos animais CT e RT em P14 (A).
Quantificação da zimografia pelo programa Scion Image (B), p.58
- FIGURA 26** Detecção da atividade enzimática da metaloprotease-9 no CS de animais alimentados com as dietas CT e RT, que receberam enucleação monocular em P10, p.60
- FIGURA 27** Quantificação, pelo programa Scion Image, das análises zimográficas referentes aos colículos enucleados de animais CT (A), e RT (B), p.61
- FIGURA 28** Comparação da atividade da MMP-9, nas diferentes horas após a lesão, nos colículos enucleados entre os grupos CT e RT, p.62
- FIGURA 29** Esquema demonstrativo da conclusão dos resultados, p. 77

LISTA DE ABREVIações

5-HT	Serotonina
5-HT1A/ 1B	Receptor serotoninérgico do tipo 1A/ 1B
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5,7 DHT	5,7 dihidroxitriptamina
5-HIAA	5-hidroxiindolacetaldeído
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT	Proteína cinase B
AMPA _r	Receptor glutamatérgico do tipo- ácido alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionico
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclica
Anti-SERT	Anticorpo contra o transportador de serotonina
BDNF	Fator de crescimento derivado do cérebro
BHE	Barreira hemato-encefálica
BVB	Baixo valor biológico
Cam	Calmodulina
CAM	Molécula de adesão celular
CaMKII	Proteína cinase II dependente calmodulina
CGRs	Células ganglionares da retina
CREB	Elemento de resposta ao AMP _c
CS	Colículo superior
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CT	Grupo ou dieta complementada com triptofano
DAB	Diaminobenzidina
DHA	Ácido docosahexaenóico
DPN	Dia pós-natal
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Dia (idade) embrionário
Eph	Efrina
ERK	Cinase ativada por mitógeno
FAO/WHO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
GABA	Ácido γ-aminobutírico

GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
GAP – 43 KDa	Proteína associada ao crescimento neurítico de 43 KDa
GH	Homônio do crescimento
GluR2	Subunidade do Receptor de glutamato do tipo AMPA
HRP	Peroxidase extraída do rabanete
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAO	Monoaminoxidase
MAPs	Proteína associada aos microtúbulos
MEC	Matriz extracelular
MHC	Molécula do complexo de histocompatibilidade principal
MMPs	Metaloproteases de matriz extracelular
MMP-9	Metaloprotease de matriz extracelular- isoforma 9
NGF	Fator de crescimento neural
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido)
NGL	Núcleo geniculado lateral
NGS	Soro normal de cabra
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
P	Idade pós-natal
pERK	Proteína cinase de resposta extracelular fosforilada
PBS	Tampão fosfato com salina
PEPSs	Potenciais excitatórios pró-sinápticos
PCPA	P-clorofenilalanina
PKA	Proteína cinase A (subtipo)
PKC	Proteína cinase C (subtipo)
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RT	Grupo ou dieta com restrição em triptofano
S-100β	Fator trófico secretado por astrócitos

SERT	Transportador de serotonina
SGS	<i>Stratum griseum superficiale</i>
SNC	Sistema nervoso central
SZ	<i>Stratum zonale</i>
SO	<i>Stratum opticum</i>
TBS	Salina tamponada de tris
TBS-T	Salina tamponada de tris acrescida com tween
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteases
TIMP 1, 2	Subtipos de TIMPs
TMB	Tetrametilbenzidina
TRKB	Receptor Tirosina Cinase tipo B
TTX	Tetrodotoxina
VET	Valor energético total
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas

1. INTRODUÇÃO

1.1 A INGESTÃO PROTEICA E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A nutrição é considerada um dos principais fatores ambientais que influenciam a maturação e o desenvolvimento funcional do sistema nervoso durante o período crítico (Ballabriga, 1990). Seus efeitos influenciam a proliferação e diferenciação do sistema nervoso central (SNC), até a formação dos circuitos no período pós-natal (Morgane *et al.*, 1993). O desenvolvimento do cérebro inclui síntese de componentes celulares, tais como ácidos nucleicos e proteínas, e em paralelo, fenômenos de neurogênese e gliogênese. A migração de neurônios, de células gliais e a diferenciação celular, são mais tardios, acompanhados de um aumento de tamanho das células.

Através do metabolismo dos alimentos ingeridos, é gerada energia para o desenvolvimento de inúmeras estruturas celulares e vários sistemas metabólicos essenciais. Os alimentos devem ser ingeridos em quantidades e qualidades variadas a fim de disponibilizar para o organismo os nutrientes em proporção adequada de carboidratos, lipídeos e proteínas, além dos micronutrientes – vitaminas e minerais (Krause, 1999).

As vitaminas, principalmente as pertencentes ao complexo B, são reguladoras da atividade neuronal atuando em vias fundamentais como glicólise, ciclo de Krebs, a cadeia respiratória e o metabolismo de aminoácidos. A piridoxina (vitamina B6) é necessária na biossíntese de neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), associado ao desenvolvimento cerebral pela sua atuação na síntese proteica, lipídica e de ácidos nucleicos (Gibson, 1999).

O ácido fólico (vitamina B9) é importante na formação e manutenção das membranas neuronais e gliais. Acredita-se que por sua participação na regulação dos níveis de tetrahidrobiopterina, fator chave na síntese de serotonina, o ácido fólico atue indiretamente na produção deste neurotransmissor (Ferstrom, 1974).

Mais de 200 enzimas são dependentes de zinco, e sua deficiência durante o período crítico do desenvolvimento cerebral tem efeitos similares aos observados pela desnutrição protéico-calórica (Gibson, 1999). A carência de ferro, durante os períodos pré-natais e de lactação, em roedores, diminui a atividade da enzima GAD (descarboxilase do ácido glutâmico) que é responsável pela síntese de GABA, além de diminuir a atividade da triptofano hidroxilase, enzima que participa da primeira etapa da síntese de serotonina a partir do triptofano (Yager & Hartfield, 2002).

A proteína foi o primeiro macronutriente a ser reconhecido como fundamental para o funcionamento do organismo (Krause *et al.*, 1999). No desenvolvimento das funções neurais, as proteínas fazem parte dos componentes mais importantes (Morgane *et al.*, 1993)

A desnutrição protéica tem sido extensamente relacionada aos déficits de ganho ponderal e de estatura, com implicações gerais sobre desenvolvimento de órgãos e sistemas, em humanos (Perry *et al.*, 1986). Os efeitos da carência de proteínas incluem desde diminuição do número de células, por alterações nas taxas de proliferação neural e glial durante o período pré-natal, até atrasos nos processos de diferenciação celular, sinaptogênese e deficiência de mielinização, no período pós-natal (Ballabriga, 1990; Almeida *et al.*, 2002). Estes efeitos, que são diretamente proporcionais à velocidade com que a organização cerebral está acontecendo, podem ser permanentes, e dependem do período do desenvolvimento em que a desnutrição se estabelece; além do grau de severidade e abrangência, em termos nutricionais, do déficit alimentar. Estudos já demonstraram, que em recém-nascidos, a má nutrição pode gerar diminuição da plasticidade no SNC, o que poderá ser prejudicial para toda a vida (Almeida *et al.*, 2002).

As proteínas de origem animal são consideradas de alto valor biológico por conterem todos os aminoácidos essenciais – arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, valina e triptofano (Moore *et al.*, 2000). Estes aminoácidos não são sintetizados pelo organismo, portanto, seu

requerimento nutricional deve ser preenchido pela dieta. As proteínas de origem vegetal, principalmente as oriundas de cereais leguminosas contêm aminoácidos essenciais; entretanto, nem todas contêm aminoácidos em proporções consideradas ideais comparadas à proteína *standart* – ovoalbumina (FAO/OMS, 1989).

No sistema nervoso, alguns aminoácidos atuam diretamente como neurotransmissores, como a glicina que age em respostas sinápticas inibitórias, na medula espinhal e também na modulação de respostas excitatórias mediadas pela ativação de receptores do tipo N-metil-aspartato NMDA. Além do glutamato e do aspartato, conhecidos como neurotransmissores excitatórios, outros aminoácidos são precursores de neurotransmissores como o GABA, derivado do glutamato; a norepinefrina e a dopamina, derivados da tirosina; e a serotonina sintetizada a partir do triptofano (Yokogoshi & Nomura, 1991; Morgane *et al.*, 1993). O triptofano, por ser um aminoácido essencial, torna a síntese de serotonina dependente da sua ingestão dietética (Venero *et al.*, 1992). Apesar da ampla distribuição do triptofano em proteínas de origem animal e vegetal, alguns alimentos, como o milho, possuem este aminoácido como limitante quando comparados a ovoalbumina (Tabela I).

Foi demonstrado que roedores alimentados basicamente com farinha de milho têm diminuídos níveis de serotonina no SNC, assim como o total de células serotoninérgicas nos núcleos da rafe, além de apresentarem alterações no sono e no humor (Del Angel-Meza *et al.*, 2001; Orozco–Suarez *et al.*, 2003). Outros estudos já apresentaram um déficit de inervação serotoninérgica durante a formação hipocampal de animais com restrição nutricional de triptofano. A dieta complementada com L-Triptofano é capaz de aumentar os níveis de serotonina no SNC de ratos alimentados previamente com fórmulas deficientes neste aminoácido (Sarwar & Botting, 1999).

De forma indireta, a ingestão de carboidratos pode favorecer a síntese de serotonina ao aumentar os níveis séricos de insulina, que conseqüentemente, favorece a captação de aminoácidos neutros como a fenilalanina, a treonina, a leucina, a isoleucina e a valina do plasma para os tecidos periféricos. Os aminoácidos neutros competem com o triptofano pelo transportador da barreira hematoencefálica (Dye *et al.*, 2000). Portanto, o triptofano, em uma dieta hiperglicídica, fica ligado à albumina (a insulina também aumenta a afinidade deste

com a albumina) o que resulta no aumento da proporção de triptofano disponível no sangue (Moore *et al.*, 2000). Dos 22 aminoácidos, sendo o triptofano o menos abundante, é importante uma dieta rica em carboidrato, para aumentar sua disponibilidade na barreira hematoencefálica afim de diminuir a competição com os aminoácidos neutros. Ao contrário, dietas com elevados níveis de aminoácidos neutros, aumentam a competição pela passagem para o SNC, diminuindo assim a taxa de captação do triptofano para serem usados (Rouch *et al.*, 1999).

Alterações no sistema serotoninérgico têm sido especuladas como causas de distúrbios de alimentação como anorexia nervosa e bulimia, que são muitas vezes tratados com êxito através do uso de inibidores da re-captção de serotonina (Leibowitz, 1990).

TABELA I: Teor de Triptofano em Diversos Alimentos de Origem Animal e Vegetal

Vegetais E	mg	Cereais E	mg	Frutas	mg
tubérculos (100g)		leguminosas (100g)		(100g)	
Abóbora	9	Arroz integral	0,98	Abacate	21
Agrião	30	Centeio	100	Abacaxi	5
Aipim	43	Cevada	136	Banana	12
Alface	9	Milho	23	Caqui	10
Alho	66	Trigo	43	Carambola	4
Batata inglesa	27	Feijão	107	Coco	81
Berinjela	8	Ervilha	37	Figo	6
Beterraba	12	Soja	74	Goiaba	7
Brócolis	31	Carnes (100g)	W (mg)	Laranja	9
Cebola	17	Frango	340	Maçã	1
Cenoura	11	Bovina	219	Mamão	8
Chuchu	25	Ovos	194	Manga	8
Champion	44	Laticínios (100g)	W (mg)	Melancia	7
Couve-flor	25	logurte	27	Morango	7
Espinafre	40	Leite	48	Pêra	2
Pepino	4	Manteiga	12	Pêssego	2

Pimentão	0,22	Queijo prato	320	Tâmara	50
Repolho	11	Provolone	345	Tamarindo	18
Tomate	7	Requeijão	67	Tangerina	6
Vagem	20	Ricota	125	Uva	3

Fonte: Manual de Nutrientes (Costa, 2002).

Estudo Nacional de Despesa Familiar – Tabelas de Composição de Alimentos – IBGE (IBGE, 1985).

1.2- O SISTEMA VISUAL COMO MODELO DE ESTUDO

O processamento visual inicia-se na retina muito antes que qualquer informação atinja o resto do encéfalo. Dessa forma, a retina é especializada na conversão de energia luminosa em atividade neural. As células responsáveis por direcionar os sinais retinianos aos centros encefálicos, são as células ganglionares da retina (CGRs) (Mey & Thanos, 2000; Klassen *et al.*, 2004).

A retina está organizada em camadas de corpos celulares e camadas de prolongamentos sinápticos que recebem, integram e traduzem a informação visual (Peters, 2002). A via direta de processamento intraretiniano da informação visual envolve a transdução do sinal luminoso pelos fotorreceptores, localizados na camada nuclear externa, que se conectam com as células bipolares, da camada nuclear interna, as quais realizam contatos sinápticos com as células ganglionares, na camada plexiforme interna. Os axônios das células ganglionares se dirigem ao disco óptico onde se tornam mielinizados e formam o nervo óptico (Mey & Thanos, 2000; Thanos & Mey, 2001; Stenkamp & Cameron, 2002).

Os nervos ópticos, de cada olho, juntam-se no quiasma óptico onde irão sofrer decussação parcial. Nos roedores, 95% dos axônios do nervo óptico cruzam o quiasma óptico para o trato óptico contralateral (Perry *et al.*, 1983). Os 5% restantes, que se encontram na periferia temporal da retina, se dirigem pelo trato óptico ipsilateral (Drager & Olsen, 1980). Aproximadamente 60 % dos axônios que trafegam pelo trato óptico emitem colaterais que se dirigem para o núcleo geniculado do tálamo (Perry *et al.*, 1983) (Fig. 1).

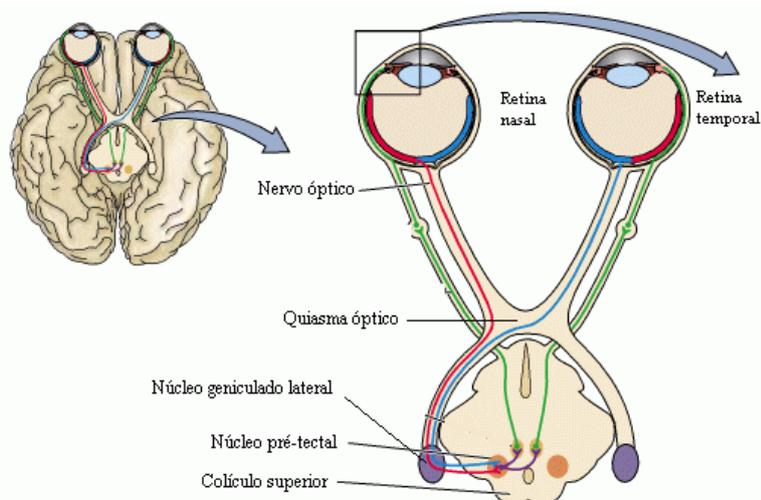


FIGURA 1. Esquema mostrando as vias visuais. Os axônios ipsolaterais (em vermelho) e contralaterais (em azul) de cada olho projetam-se para o Núcleo geniculado lateral, Núcleo pré-tectal e Colículo Superior (Purves et al, 2004).

No sistema visual de roedores as células ganglionares da retina são geradas entre os dias embrionários 14 e 22 (E14 – E22) (Reese & Colello, 1992). Em E15, surgem os primeiros cones de crescimento no quiasma óptico (Horsburgh & Sefton, 1986). Os axônios das células ganglionares alcançam a borda anterior do colículo superior em E16, e por volta de E17 podem ser observadas as primeiras sinapses (Lund & Bunt, 1976). Em E21 é evidenciada uma densa projeção formada pelas fibras retinianas nas camadas visuais do colículo superior (Bunt *et al.*, 1983).

O colículo superior é uma estrutura laminada e, como outros centros visuais no cérebro de mamíferos, contém um mapa retinotópico preciso que reproduz a superfície da retina. Suas principais funções são as integrações visuomotoras no reflexo orientado e controle dos movimentos sacádicos. Este núcleo visual é dividido em camadas denominadas *stratum zonale*, *stratum griseum superficiale*, *stratum opticum*, *stratum griseum intermediale*, *stratum album intermedium*, *stratum griseum profundum* e *stratum album profundum*. 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; Isa & Saito, 2001) (Fig. 2).

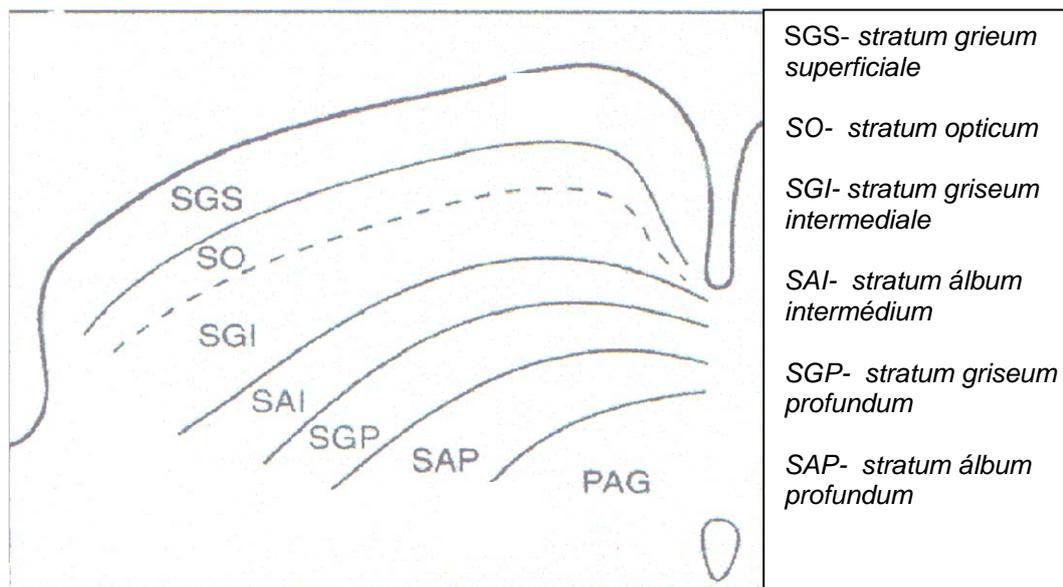


FIGURA 2. Esquema ilustrando a laminação no colículo superior. A linha pontilhada delimita as camadas de processamento visual na região dorsal e as camadas profundas de processamento auditivo, motor e integração de informações. O *stratum zonale* não está representado (Parsons et al., 2001).

O *stratum griseum superficiale* (SGS) constitui-se na principal camada que recebe aferentes pré-sinápticos da retina (Perry *et al.*, 1983). 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 os aferentes contralaterais ocupam toda a extensão radial das camadas visuais, superpondo-se consideravelmente às projeções ipsolaterais (Hofbauer & Drager, 1985).

Durante o desenvolvimento, os axônios ipsolaterais provenientes da retina atingem o colículo superior e arborizam-se de maneira imprecisa e difusa nas camadas visuais do colículo superior. Em mamíferos ocorre uma organização rudimentar do mapa retinotópico no início do desenvolvimento (Lund *et al.*, 1980). Por volta da segunda semana pós-natal, os axônios sofrem um processo de reorganização, que resulta em uma restrição topográfica, quando assumem um grau de desenvolvimento similar do animal adulto, no qual os campos terminais de fibras oriundas do olho ipsilateral correspondem a 5% dos aferentes do colículo superior.

Esses aferentes formam, então, pequenos aglomerados de marcação no limite ventral do SGS e limite dorsal do SO, no terço anterior do colículo. Esse processo é essencial para possibilitar a correta representação do campo visual nos núcleos visuais (Lund *et al.*, 1980; Hofbauer & Dräger, 1985).

Durante a fase de sinaptogênese, as células alvo são selecionadas para iniciar a formação de sinapses. Existem moléculas que orientam os axônios, como pistas químicas, nos caminhos rumo aos alvos. Os axônios são providos de estruturas chamadas cones de crescimento que permitem uma eficaz percepção do ambiente extracelular e responderam aos diversos estímulos-guia (Rodger *et al.*, 2000; Skaper *et al.*, 2001; Knoll & Drescher, 2002).

Desta forma, os axônios provenientes das CGRs são inicialmente distribuídos de forma difusa nas camadas visuais do CS de acordo com gradientes de pistas moleculares. Dentre essas moléculas, encontramos a família das efrinas e seus receptores, que são expressos diferencialmente ao longo da retina e do teto óptico, gerando um princípio de organização topográfica, onde axônios provenientes da retina nasal se projetam para a porção posterior/caudal do teto óptico e axônios da retina temporal se estabelecem na porção anterior/rostral. Além disso, axônios da retina dorsal e ventral se projetam para regiões laterais e mediais do teto óptico, respectivamente (Thanos & Mey, 2001; Mellitzer *et al.*, 2000; Knoll & Drescher, 2002) (Fig. 3).

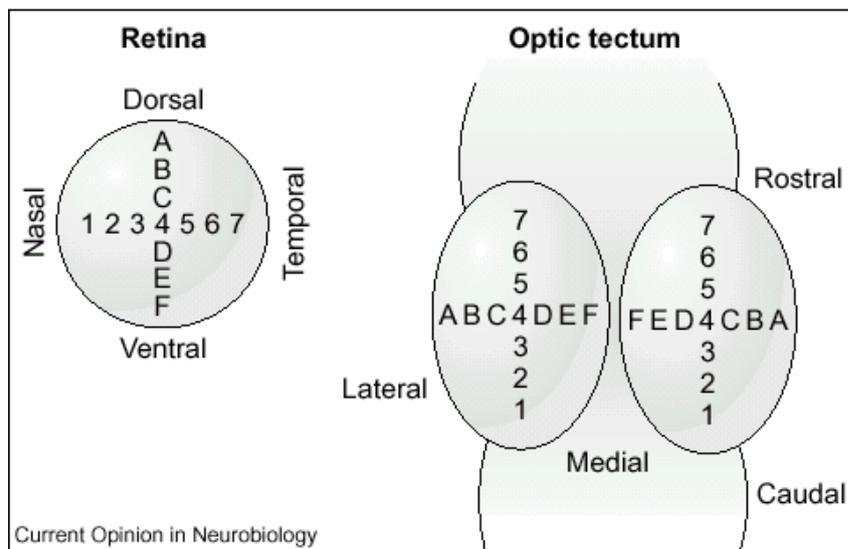


FIGURA 3. Esquema representando a topografia retinotectal. Na retina os números de 1-7 e as letras de A-F representam áreas específicas no eixo nasal-temporal e dorsal-ventral respectivamente, que se correlacionam aos eixos caudal-rostral e lateral-medial, respectivamente, no tecto óptico. (Debski e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

Outras classes de moléculas presentes também em superfícies celulares atuam, ao contrário das efrinas, como promotoras do crescimento axonal no desenvolvimento do sistema nervoso. Entre estas são conhecidas as moléculas pertencentes à família das caderinas, encontradas em neurônios, células gliais, cones de crescimento e as moléculas de adesão celular (CAMs) (Holt & Harris, 1998).

Após o início da formação do mapa retinotectal pelas interações de moléculas atrativas e repulsivas entre a retina e o colículo superior, o sistema passa por processos para alcançar um maior grau de refinamento, a partir de atividade elétrica entre aferentes e células-alvo (Debski *et al.*, 1990). A atividade elétrica espontânea das células ganglionares da retina pode ser observada em roedores antes do nascimento, em E18 (Galli & Maffei, 1988). A sincronização desta atividade espontânea em células vizinhas na retina contribui para o refinamento do mapa topográfico antes mesmo da abertura dos olhos, orientada entre células vizinhas na retina “simula” a estimulação ambiental e contribui para o refinamento dos mapas topográficos (Stellwagen & Shatz, 2002). Experimentos em peixes, anfíbios e mamíferos, demonstraram que é possível abolir o refinamento topográfico, através

do bloqueio da atividade elétrica espontânea com tetrodotoxina (TTX), droga que se liga irreversivelmente aos canais de sódio voltagem-dependente (Meyer, 1982; Sretavan & Shatz, 1984; Fawcett & O'Leary, 1985; Schmidt, 1990).

A experiência visual, que em roedores ocorre a partir da abertura dos olhos, entre os dias pós-natal 12 e 14 (P12-P14), influencia de maneira determinante o desenvolvimento topográfico e a plasticidade dos aferentes visuais (Stellwagen & Shatz, 2002)

Um alto grau de correlação de atividade elétrica pré e pós-sináptica é determinante para a estabilização uso-dependente de sinapses. Isto foi o que propôs como teoria, em 1940, Donald Hebb. Dessa forma, a plasticidade natural 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.

A atividade sincrônica das células ganglionares vizinhas na retina, as quais são estimuladas pela mesma região do campo visual, gera a somação de potenciais pós-sinápticos excitatórios nas células alvo, resultando na estabilização destas sinapses. Este é um dos mecanismos responsáveis pelo refinamento, e pelo ordenamento topográfico dos padrões iniciais da inervação. A ativação de receptores pós-sinápticos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) para o glutamato está relacionada aos processos nos quais a atividade elétrica induz o refinamento topográfico e a estabilização sináptica (Debski & Cline, 2002). O receptor de NMDA, apesar de ionotrópico, tem sua ativação dependente não apenas de ligante mas também de voltagem, no estado inativado, o íon magnésio bloqueia a condutância do canal iônico deste receptor. Para que ocorra a ativação deste receptor, faz-se necessário, além da ligação do agonista, o deslocamento do íon magnésio, que é dado por uma prévia alteração da voltagem de membrana (despolarização). A ativação dos receptores NMDA produz influxo de cálcio nas espículas dendríticas pós-sinápticas, consolidando e aumentando a eficácia dos aferentes com atividade temporal relacionada.

Este modelo de ativação do receptor NMDA é importante em vários fenômenos envolvendo plasticidade neural, como potenciação e a depressão de

longa duração da transmissão sináptica, essenciais aos processos de aprendizado e memória (Wheal *et al.*, 1998).

1.3- PERÍODO CRÍTICO E PLASTICIDADE NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

O desenvolvimento das conexões sinápticas evolui durante uma janela temporal – o período crítico. Assim, o período crítico é descrito como a fase do desenvolvimento na qual a experiência sensorial é capaz de levar a uma extensa reorganização estrutural das projeções centrais (Cynader *et al.*, 1990).

Os estágios tardios do refinamento das projeções retinotectais, observados durante o período crítico, são mediados principalmente por mecanismos celulares de potenciação e depressão sináptica, resultando respectivamente na formação de conexões precisas características do padrão adulto e na eliminação de sinapses transitórias (Puro *et al.*, 1977; Tomasulo *et al.*, 1993).

Durante o período crítico, os processos de desenvolvimento do SNC são altamente dinâmicos e envolvem alterações anatômicas, fisiológicas e neuroquímicas, sensíveis a estímulos ou insultos oriundos do meio-ambiente (Morgane *et al.*, 1993). Esse período varia de espécie para espécie, sendo que em humanos, não existem dados que delimitem com segurança os períodos críticos para maturação dos sistemas sensoriais, motores e cognitivos (Berardi *et al.*, 2000) (Tabela II).

No sistema visual de roedores, os processos plásticos de refinamento e reorganização das projeções retinofugais presentes durante o período crítico, ocorrem entre as duas ou três semanas após o nascimento (Serfaty & Linden, 1994).

Injeções intra-oculares de transportadores anterógrados na retina, como a peroxidase de raiz forte (HRP), são capazes de marcar os terminais sinápticos contra e ipso -laterais, possibilitando avaliar a densidade de marcação nos terminais que cruzam ou não (Serfaty & Linden, 1991). Esta técnica permitiu que Serfaty e Linden (1994) demonstrassem a segregação topográfica das projeções retinotectais ipsolaterais em ratos (Fig. 4).

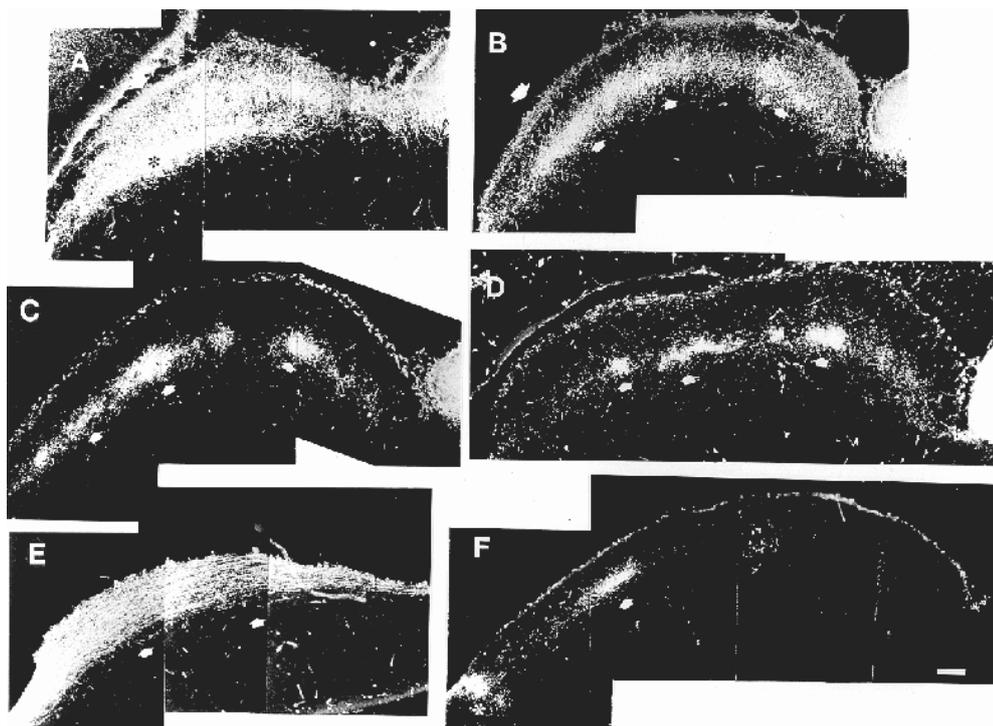


Figura 4 – Fotomicrografia de campo escuro mostrando, em cortes coronais (A-D) ou parassagitais (E-F), a progressiva restrição tótopográfica das projeções retinotectais ipsolaterais no terço anterior do colículo superior. Os ratos receberam injeção intraocular de peroxidase no dia pós-natal 0 (P 0) (A e E), P 3 (B), P5 (C e F), e P 10 (D). Notar que as projeções transitórias entre P 0–3 (A, B e E), se restringem entre P5-10 (C, D e F) e os aglomerados de marcação terminal em regiões profundas *Stratum Griseum Superficiale*(SERFATY & LINDEN, 1994).

TABELA II: Períodos Críticos de Desenvolvimento do Sistema Visual

ESPÉCIE	PERÍODO CRÍTICO	REFERÊNCIA
Roedores	2-3 semanas após o nascimento	(Land& Lund, 1979) (Serfaty, 1994)
Felinos	3ª à 9ª 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)

Alterações provocadas pelos padrões de estimulação, nessa janela temporal, apresentam uma significativa reorganização por manipulações experimentais, como bloqueio de atividade elétrica (Debski & Cline, 2002), alteração de neurotransmissores (Bastos *et al.*, 1999), bloqueio de mensageiros retrógrados (Campello-Costa *et al.*, 2000; Campello-Costa *et al.*, 2006) ou outros capazes de alterar a estabilização sináptica (Constantine-Paton *et al.*, 1990).

Nesta fase do desenvolvimento, lesões em setores restritos da retina temporal, que induzem denervação localizada em uma área correspondente no colículo superior contralateral, geram respostas plásticas caracterizadas pela presença de inervação anômala da projeção ipsilateral do olho intacto, na superfície do colículo superior (Serfaty *et al.*, 2005) (Fig. 5).

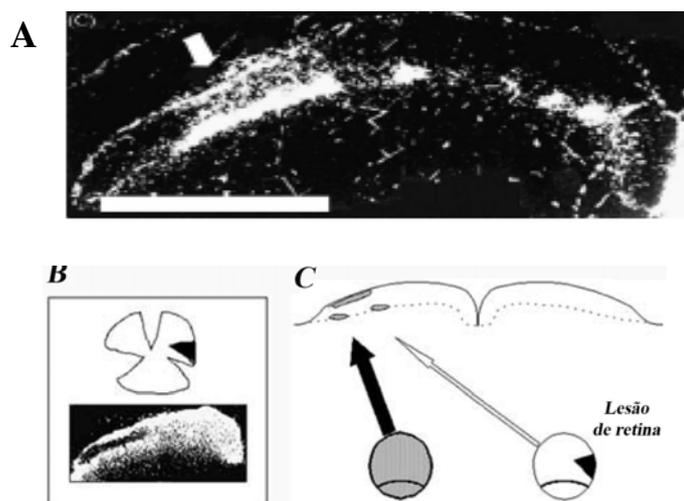


FIGURA 5– Efeito da lesão de retina temporal, realizada em P10, no colículo superior contralateral a lesão de retina. A) Notar a reorganização das projeções ipsolaterais orientada para a superfície (seta) e caracterizada por um padrão bilaminar de marcação. B) Mapeamento da área lesionada no CS (em baixo) através da injeção de traçador no olho submetido à lesão (em cima). C) Esquema da reorganização dos terminais ipsolaterais em resposta a lesão de retina (Serfaty et al, 2005).

A enucleação monocular, durante o período crítico, também provoca o aparecimento de projeções aberrantes da retina intacta em direção aos núcleos visuais ipsolaterais (Lund & Bunt, 1976; Jen *et al.*, 1984). Esta resposta plástica decresce em animais adultos, experimentos no córtex visual primário de gatos, uma sutura palpebral nas primeiras semanas do desenvolvimento apresentou alterações corticais permanentes, ao passo que, o mesmo procedimento em animais adultos, não é capaz de produzir modificações no córtex visual (Wiesel, 1971).

1.4 METALOPROTEASES DE MATRIZ EXTRACELULAR E PLASTICIDADE NO SNC

A matriz extracelular (MEC) é composta de uma mistura complexa de moléculas incluindo colágeno, laminina, fibronectina, proteoglicanos e receptores de superfície celular. A matriz extracelular, além de gerar suporte para as células, também age como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento. A

proteólise da matriz extracelular pode afetar a aderência das células, assim como liberar fragmentos bioativos (McCawley & Matrisian, 2001).

As metaloproteases (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam todos os componentes da MEC, por isso tem sido extensamente estudadas no contexto da modulação das funções da matriz, desde o desenvolvimento embrionário, até a regulação da diversidade biológica e em processos patológicos, como câncer e muitas doenças neurodegenerativas. Existem 28 isoformas de MMPs descritas em mamíferos, dentre as quais 24 têm seu substrato identificado, 23 destas já foram descritas em ratos. No cérebro, as MMPs podem ser encontradas em diversas regiões, estando presentes predominantemente no corpo e nos dendritos de neurônios (Vaillant *et al.*, 1999). As isoformas mais abundantes no cérebro são a MMP-2, MMP-3 e a MMP-9 (Yong, 2005 para revisão).

A atividade das MMPs é controlada por três fatores: primeiro, a transcrição gênica, já que muitas são expressas apenas após ativação celular ou estimulação; segundo, ativação da pró-enzima, uma vez que as MMPs são expressas inicialmente em forma de zimógenos; e em terceiro, pela inibição por seus inibidores fisiológicos teciduais (TIMPs). Já foram descritos quatro tipos de inibidores de metaloproteinases de matriz (TIMP-1, 2, 3 e 4) e ainda a α -2 macroglobulina sérica, responsável pela inibição das MMPs no sangue e sistema linfático (Crocker *et al.*, 2004; Parks *et al.*, 2004). O equilíbrio entre a ativação das MMPs e sua inibição pelas TIMPs controla o ambiente pericelular, incluindo a movimentação de proteínas da matriz extracelular, a viabilidade dos fatores de crescimento e citocinas. Também organizam receptores de membrana, além de regularem o crescimento celular, proliferação, migração e apoptose celular (Sternlicht & Werb, 2001, para revisão).

Trabalhos têm evidenciado a importância das metaloproteases na formação do mapa topográfico no SNC através da regulação de fenômenos cruciais como neurogênese, diferenciação e migração celular, crescimento axonal, mielinização e sinaptogênese, além de interferir em interações de efrinas e seus receptores (Sternlicht MD & Werb Z, 2001 para revisão; Webber *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2003; Yong V.Wet *et al.*, 2005; Ethell & Ethell, 2007) (Fig. 6). Já foi demonstrado, que em neurônios a atividade das metaloproteases está localizada nos cones de crescimento, portanto, a inibição da atividade das MMPs reduz a motilidade dos

cones (Sheffield *et al.*, 1994). MMPs também estão envolvidas na regulação da apoptose, sobrevivência de alguns tipos celulares, além de influenciarem na sinalização celular (Egeblad & Werb, 2002; Parks *et al.*, 2004). Oliveira-Silva e colaboradores (2007) caracterizaram a expressão e atividade da MMP-9 no colículo superior de roedores durante o desenvolvimento, bem como na plasticidade induzida por lesão na via retinotectal. Neste estudo, foi demonstrado que a inibição da atividade metaloprotease induz a uma ruptura do mapa topográfico retinotectal dentro do período crítico do desenvolvimento (Oliveira-Silva *et al.*, 2007).

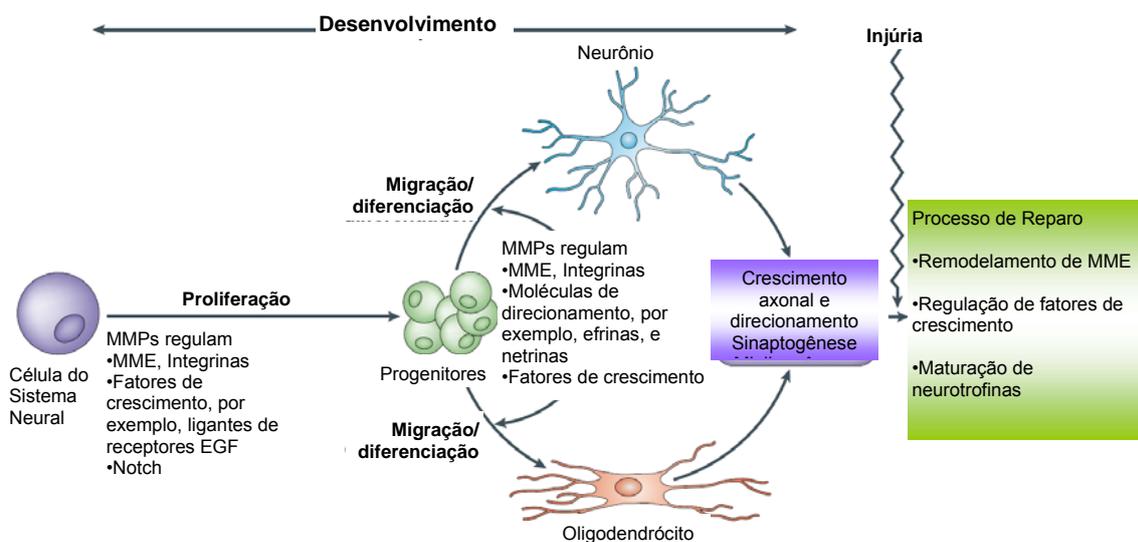


FIGURA 6: MMPs regulam eventos de desenvolvimento e regenerativos no SNC. A célula representada em lilás mimetiza uma célula-tronco do sistema nervoso, que prolifera (em verde) e migra e em seguida se diferencia em neurônios ou em oligodendrócitos. MMPs regulam esses processos agindo sobre diversas moléculas, que incluem fatores de crescimento, moléculas de matriz extracelular, entre outros. Abreviaturas: receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), matriz extracelular (MEC) (Traduzido de Yong, 2005).

As MMPs têm sido identificadas como moléculas reguladoras da atividade sináptica no hipocampo, interferindo no desenvolvimento de espículas dendríticas, assim como na estabilização sináptica, em processos de potenciação de longa duração (LTP), podendo então estar modulando processos de aprendizado e memória (Reeves *et al.*, 2003; Bilousova *et al.*, 2006).

Conexão direta entre MMP-9 e o aprendizado foi proposta por Wright e pesquisadores em 2002, ao mostrar que a atividade enzimática da MMP-9 é aumentada em hipocampo de ratos submetidos ao aprendizado espacial (Wright *et al.*, 2002).

MMPs degradam as moléculas da matriz extracelular que inibem o crescimento axonal. Desta forma, a atividade das MMPs aumenta a extensão e a mobilidade do axônio, contribuindo para processos de plasticidade cerebral. MMP-9 têm sua função proteolítica aumentada numa situação de peri-infarto cortical a fim de facilitar a remodelagem axonal. Em um estudo com ratos adultos que tiveram lesão cortical unilateral e posteriormente receberam injeção de um veículo, observou-se a sinaptogênese normal com aparecimento de LTP, enquanto em ratos lesionados que receberam um inibidor de MMPs observaram-se falhas na capacidade de gerar LTP (Reeves *et al.*, 2003). Em animais nocauteados para MMP-9 foi exibido um enfraquecimento da memória de longa duração, o que realça a importância da MMP-9 na modulação da plasticidade sináptica (Nagy *et al.*, 2006).

A atividade das metaloproteases também está relacionada à ativação de receptores do tipo NMDA, o que é de particular interesse pelo seu envolvimento direto na regulação da plasticidade.

A plasticidade sináptica está associada à MMPs. Essas gelatinases regulam um complexo coordenado incluindo as moléculas de matriz extracelular, as moléculas de adesão celular (CAM) e os elementos do citoesqueleto contribuindo, portanto, nas mudanças dependentes de atividade, e na morfologia e função das sinapses (Meighan *et al.*, 2006). Baixos níveis de MMP-9 estão associados com baixa capacidade de regeneração de axônios do sistema nervoso central (Chernoff *et al.*, 2000). O papel desta metaloprotease na regeneração, envolve um controle sobre a migração de macrófagos e mielinização, que são essenciais na regeneração de injúrias nervosas (Kiefer *et al.*, 2003).

Em condições fisiológicas, TIMP-1 é expressa essencialmente por neurônios, e essa distribuição espaço-temporal é consistente com sua função na ontogênese do hipocampo e do cerebelo (Rivera *et al.*, 1997). Seu perfil de expressão, durante o desenvolvimento assim como em várias desordens do SNC, tem sugerido que TIMP-1 poderia contribuir para a fisiopatologia cerebral e diferentes formas de plasticidade, como plasticidade sináptica e processos de aprendizado e memória (Rivera & Khrestchatisky, 1999). Animais nocauteados para TIMP-1 e TIMP-2 apresentaram problemas com aprendizado e memória, o que possibilitou a associação entre a modulação da plasticidade neural com a razão MMP/TIMP (Chaillan *et al.*, 2006).

1.5- SISTEMA SEROTONINÉRGICO

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é considerada um neurotransmissor modulatório encontrado no sistema nervoso, desde o início da formação do SNC, por volta do décimo segundo dia gestacional (E12) em ratos. Por isso, a serotonina parece ser essencial para a formação dos circuitos neurais. Em mamíferos, como roedores e primatas, os níveis de serotonina e a expressão de seus receptores de alta afinidade são altos no cérebro imaturo (Azmitia *et al.*, 1996)

Os neurônios serotoninérgicos, localizados próximos à linha média nos núcleos da rafe do tronco cerebral, são divididos em grupos denominados B1-B9 e emitem projeções para as regiões ascendentes e descendentes do cérebro (Fig. 7). O núcleo B7 é o que tem a maior concentração de neurônios serotoninérgicos, cujos axônios se projetam para a região dorsal do mesencéfalo, onde se localiza o colículo superior (Beitz *et al.*, 1986). Axônios da rafe fazem diversos contatos sinápticos no SGS (Arce *et al.*, 1992).

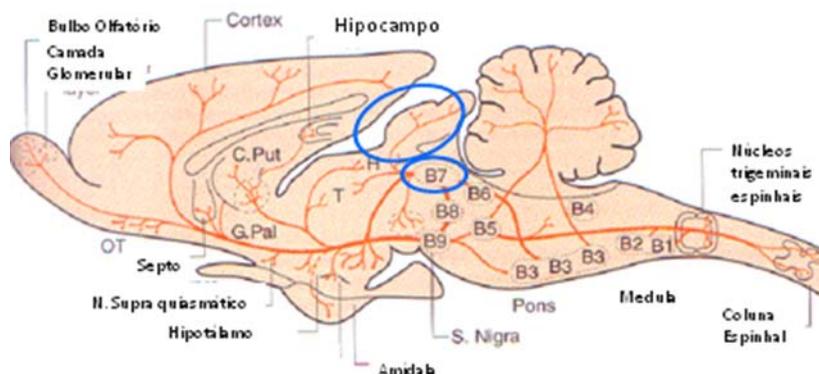


FIGURA 7. Esquema mostrando os núcleos da rafe e as suas projeções. O núcleo B7 emite projeções para o colículo superior (Traduzido de Siegel *et al.* , 1999).

Por suas características hidrofílicas, a serotonina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), desta forma, é necessário que sua síntese ocorra dentro do próprio SNC.

A serotonina é sintetizada nos núcleos da rafe, a partir do aminoácido essencial triptofano, que é captado de forma ativa do plasma por carreadores de aminoácidos neutros da BHE. Dessa forma, a variação desse aminoácido no plasma influencia bastante a síntese de serotonina na rafe (Blundell, 1992). Após ser captado, o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano pela enzima triptofano hidroxilase a partir de uma hidroxilação na posição cinco do anel aromático formando 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Esta enzima é sintetizada principalmente nos núcleos da rafe, e só é encontrada em células que sintetizam serotonina, portanto, sua distribuição no cérebro é semelhante a da serotonina (Whitaker-Azmitia, 1999) (Fig. 8).

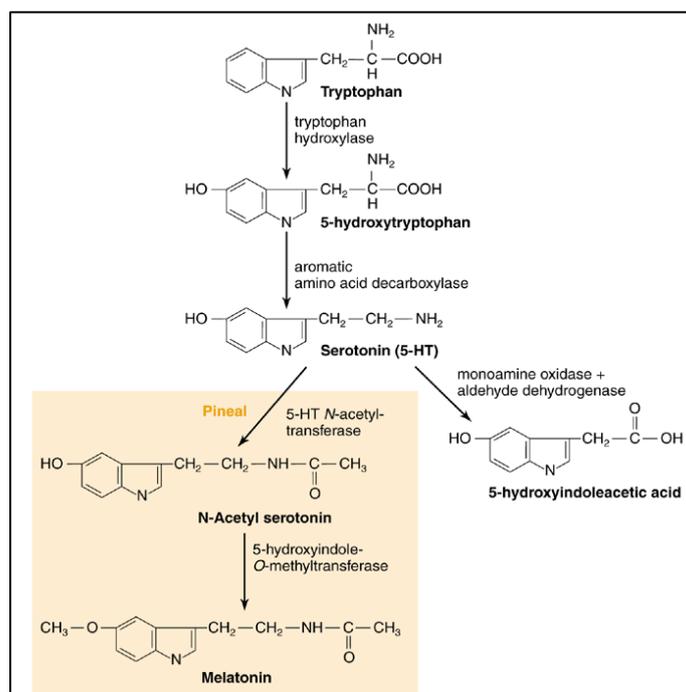


FIGURA 8. Esquema demonstrativo das vias de síntese e degradação da serotonina. (Siegel *et al*, 1999).

A ativação dessa enzima pode ser bloqueada pela p-clorofenilalanina (PCPA) que compete com o triptofano ligando-se irreversivelmente à enzima (Barnes & Sharp, 1999). Após esse processo, o neurotransmissor é armazenado em vesículas através de um mecanismo mediado por bomba de prótons (Erickson *et al.*, 1992). Estando então armazenada em vesículas, uma despolarização no neurônio serotoninérgico induz a liberação vesicular deste neurotransmissor através de um

mecanismo dependente de cálcio. O influxo de cálcio, com ou sem despolarização de membrana, pode aumentar a liberação de serotonina (Rotondo *et al.*, 1997).

O controle da liberação de serotonina também é feito por auto-receptores que podem ser de diferentes subtipos dependendo da espécie, os tipos 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} são amplamente distribuídos nas camadas visuais do colículo superior. O aumento da concentração extracelular de serotonina ativa os auto-receptores pré-sinápticos, diminuindo a liberação do neurotransmissor (Raymond *et al.*, 2001).

A diversidade da sinalização serotoninérgica está relacionada com sua ampla distribuição de receptores. Em mamíferos os receptores serotoninérgicos foram divididos em sete classes: os receptores ionotrópicos pertencentes à classe 5-HT₃ seletivamente permeáveis a sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cálcio (Ca⁺⁺) e os pertencentes à grande família de receptores acoplados à proteína G (metabotrópicos), 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, E 5-HT₇ (Barnes & Sharp, 1999).

A função da serotonina no desenvolvimento do sistema nervoso central é mediada principalmente pelos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (Azmitia, 2001). O receptor 5-HT_{1A}, localizado tanto em sítios pré-sinápticos como em pós-sinápticos, possui alta afinidade para serotonina, além de desempenhar importantes funções na regulação neuroendócrina e térmica, em comportamentos como o sexual e alimentar, na função imune, estabelecimento de memória, controle da depressão e ansiedade (Barnes & Sharp, 1999; Debski & Cline, 2002; Adell *et al.*, 2002).

Dentre as cascatas intracelulares da serotonina estão a ativação ou inibição da adenil ciclase e a ativação de várias cinases como a proteína cinase A (PKA), entre outras. O receptor 5-HT_{2A} é amplamente distribuído no SNC, ele atua ativando fosfolipases, aumentando os níveis de Ca⁺⁺, ativando proteínas cinases como a ERK, a cálcio/calmodulina (CaM), e regula os fenômenos apoptóticos em células glutamatérgicas corticais (Barnes & Sharp, 1999; Raymond *et al.*, 2001).

Uma vez no espaço extracelular, a serotonina pode ser degradada por uma monoaminoxidase (MAO) que a converte em 5-hidroxiindolacetaldeído (5-HIAA), este produto é oxidado por uma NAD⁺-desidrogenase aldeído-dependente, formando ácido 5-hidroxi indoacético. A 5-hidroxiindoleacetaldeído também pode sofrer ação

de uma NADH-aldeído redutase dependente, formando um álcool. O produto final da serotonina na via de degradação irá depender da razão de $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ no tecido.

O sistema serotoninérgico é um dos primeiros a surgir durante o desenvolvimento neuroquímico do SNC de mamíferos. Estudos de imunoreatividade para serotonina demonstraram que em E14 ela já pode ser detectada, e neste estágio ocorre a segregação bilateral dos neurônios serotoninérgicos em grupos rostrais e caudais e o início do desenvolvimento das conexões com os alvos pós-sinápticos (Azmitia, 1999; Rhoades *et al.*, 1990). Esta fase pode ser dividida em três etapas principais: início do prolongamento axonal entre E13 e E16, seleção das vias de crescimento ascendentes e descendentes entre E15 e E19, e por último, o desenvolvimento das conexões terminais, que tem início em E19, período em que a maturação dos neurônios serotoninérgicos é considerada completa, e se estende até o final do período crítico em P21 (Lautenschlager *et al.*, 2000).

Neurônios da rafe inervam praticamente todas as regiões do encéfalo, enviando axônios colaterais a áreas do cérebro com funções relacionadas. Foram identificados nesses núcleos terminais conteúdo além de serotonina, norepinefrina, dopamina, acetilcolina, ácido gama-amino-butírico (GABA), substância P e neurotensina (Azmitia, 1999).

A capacidade de responder plasticamente a modificações no microambiente constitui uma importante característica do sistema serotoninérgico. Estes neurônios podem alterar em até quatro vezes o volume celular em resposta a variação principalmente de hormônios esteróides e concentração de neuropeptídeos (Azmitia *et al.*, 1996).

1.5.1 - SEROTONINA E O DESENVOLVIMENTO DO SNC

A serotonina tem sido implicada na regulação de atividades que regem o comportamento (Jacobs & Fornal, 1999) incluindo o ritmo circadiano (Morin, 1999), sono/vigília (Leonard, 1996) e fenômenos cognitivos, como aprendizado e memória (McNamara & Skelton, 1993). Manipulações experimentais dos níveis de serotonina causam alterações na frequência alimentar (Blundell, 1992), ao modular negativamente no hipotálamo, a ação de mensageiros reguladores do apetite como as leptinas e neuropeptídeo Y (Meguid *et al.*, 2000)..

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

Em células corticais, a serotonina promove a diferenciação e sobrevivência de neurônios glutamatérgicos envolvidos nos processos de estabilização seletiva de sinapses (Lavdas *et al.*, 1997). As células ganglionares da retina possivelmente captam e armazenam serotonina durante as duas primeiras semanas pós-natal, pois foi observada a expressão de transportadores para serotonina (SERT) bem como para monoaminas vesiculares (VMAT2) (Upton *et al.*, 1999). Em astrócitos, a serotonina é um estímulo para a liberação de S-100 β , fator permissivo da sobrevivência neural (Whitaker-Azmitia, 2001). Estes achados sugerem que antes de assumir seu papel como neurotransmissor, a serotonina atue direta e indiretamente como fator trófico para as células em desenvolvimento (Mazer *et al.*, 1997).

A serotonina também regula a síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no sistema nervoso central. A ativação de seus receptores pode levar à produção de AMPc e ativação de CREB induzindo a transcrição do gene BDNF, que é uma proteína pertencente à família das neurotrofinas. Esta proteína atua no

sistema nervoso promovendo neurogênese, sobrevivência celular e plasticidade sináptica, 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, atua aumentando a potenciação de longa duração (LTP). Indiretamente o BDNF pode estimular o crescimento e sobrevivência de neurônios serotoninérgicos (Mattson *et al.*, 2004).

1.5.2 TRANSPORTADOR DE SEROTONINA

Na fenda sináptica, a ação da serotonina é finalizada pela re-captação para o terminal pré-sináptico por proteínas transportadoras específicas (SERT), pertencentes à família de transportadores de neurotransmissores dependentes de Na^+/Cl^- , que estão localizadas nos axônios, dendritos e terminais de neurônios serotoninérgicos. Portanto, SERT controla a concentração de 5-HT na fenda sináptica e então suas ações nos receptores específicos mantendo a homeostasia do sistema (Cases *et al.*, 1998).

Inibidores do SERT, como a fluoxetina e a paroxetina, têm sido muito utilizadas como antidepressivos, para tratamento de distúrbios psiquiátricos. Essas drogas aumentam a concentração de 5-HT extracelular e diminuem o conteúdo de serotonina dentro das células (Li, 2006). Em camundongos nocaute para SERT, a atividade e a quantidade da triptofano hidroxilase no cérebro não foi alterada (Kim *et al.*, 2005), mostrando que o SERT não influencia nas vias de síntese de serotonina.

Em ratos $\text{SERT}^{-/-}$ foi observada uma forte redução da recaptação e liberação de 5-HT, assim como baixos níveis de serotonina nos tecidos, o que foi associado a uma atenuação da reciclagem de 5-HT, indicando que o sistema serotoninérgico pode ter perdido sua flexibilidade e dinamismo (Bengel *et al.*, 1998). Variações genéticas na expressão de SERT, podem levar ao desenvolvimento de alterações de personalidade, o que pode contribuir para potencializar um gatilho de distúrbios afetivos (Barr *et al.*, 2004).

Tratamentos crônicos com inibidores do SERT têm sido relacionados não só com aumento da ação da 5-HT, mas também com mudanças celulares que têm

ações protetoras em doenças como o estresse e com o fenômeno de neurogênese hipocampal (Jacobs & Fornal, 1999).

1.5.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO

Monoaminas, incluindo a serotonina, têm sido tradicionalmente associadas a vias de sinalização em neurônios, tais como modulação de AMPc e níveis de Ca^{+2} . Estudos vêm apresentando uma hipótese de que as ações da 5-HT podem modular indiretamente a ativação da cinase ativada por mitógenos (ERK) e da proteína cinase B (AKT) (Cowen, 2007).

Ativação do receptor 5-HT_{1A} é relacionada com a inibição da adenilil ciclase, aumento da condutância ao K^+ e, em alguns tipos celulares, aumento na concentração de Ca^{+2} intracelular (Clarke *et al.*, 1987; Araneda & Andrade, 1991).

Ratos tratados com agonistas do receptor 5-HT_{1A} exibiram diminuição nos níveis de pERK ativada no hipocampo (Chen *et al.*, 2002). Inibidores da triptofano hidroxilase geraram um aumento da atividade da Proteína cinase A (PKA) dependente de AMPc em neurônios hipocampais, o que pode influenciar na estabilidade sináptica (Elgersma & Silva, 1999).

A plasticidade cortical pode ser regulada por atividade elétrica assim como por outros fatores tais como neurotrofinas, que são os mais fortes ativadores de ERK, sugerindo que a ERK possa agir como uma molécula integrante desses dois mecanismos (Pizzorusso *et al.*, 2000). A ativação, ou seja, a fosforilação da ERK (pERK) também é muito importante nos fenômenos de aprendizado e memória, assim como para plasticidade do córtex visual (Di Cristo *et al.*, 2001).

Muitos estudos têm apresentado inibidores do transportador de re-captção da serotonina (SERT) induzindo neuroplasticidade pela influência do aumento da expressão de fatores de crescimento. Essa hipótese é consistente com idéias tradicionais de que os fatores de crescimento ativam a via das MAPK, enquanto a serotonina é responsável pela modulação através de segundos mensageiros como Ca^{+2} e AMPc (Cowen, 2007).

Os papéis funcionais da ERK dependem não apenas da sua ativação (pERK), mas também da intensidade e duração dessa ativação. Em precursores neuronais, a sinalização transitória da pERK estimula proliferação enquanto uma sinalização constante induz diferenciação. Em fibroblastos, sinalização via ERK é essencial para proliferação, mas sinais de alta intensidade induzem parada ou até finalização do ciclo celular. Portanto, a pERK é considerada uma reguladora indispensável no comportamento celular (Dumaz & Marais, 2005). Corroborando com esta idéia, já foi demonstrado que problemas na sinalização das Map-kinases são identificados em aproximadamente 30% dos casos de câncer (Pouyssegur & Lenormand, 2003; Sebolt-Leopold & Herrera, 2004).

A sinalização via pERK também é associada a um grande número de disfunções no SNC incluindo depressão e suicídio, esquizofrenia e Alzheimer; entretanto, a relação direta dos receptores para serotonina e as vias que desenvolvem essas doenças ainda não é conhecida por completo (Dwivedi *et al.*, 2001; Kyosseva, 2004; Arjona *et al.*, 2002).

1.5.4- PAPEL DA SEROTONINA NA MATURAÇÃO DOS SISTEMAS SENSORIAIS E NA PLASTICIDADE SINÁPTICA

A distribuição topográfica de receptores para neurotransmissores excitatórios e inibitórios, que podem modular a estabilização seletiva de sinapses, exerce uma função marcante nos fenômenos plásticos observados durante o período crítico. Dependendo do subtipo de receptor envolvido, a serotonina pode exercer funções excitatórias ou inibitórias durante os processos de desenvolvimento neural, uso-dependente (Debski & Cline, 2002).

O maior *status* funcional do sistema serotoninérgico é atingido precocemente durante o desenvolvimento em todas as espécies estudadas até o momento (Whitaker-Azmitia, 2001). Rind e colaboradores em 2000, através da técnica de hibridização *in situ* e ensaios radioenzimáticos mostraram que, em roedores, a atividade da triptofano hidroxilase no núcleo da rafe dorsal aumenta dez vezes entre E18 e P8, diminuindo progressivamente entre P9 e P22 e apresentando um

decréscimo de 40% entre P23 e P61 (Rind *et al.*, 2000). Em humanos também foi observada essa característica de alteração de concentração de serotonina ao longo do desenvolvimento.

A serotonina é capaz de influenciar a excitabilidade celular e sistemas de segundos mensageiros intracelulares como cálcio e o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), aumentando a despolarização pós-sináptica e facilitando a ativação de receptores NMDA (Gu & Singer, 1995; Kojic *et al.*, 1997; Raymond *et al.*, 2001).

Em processos de aprendizado e memória a serotonina exerce uma função facilitatória sobre a LTP no hipocampo. Foi demonstrado que a infusão de mesulergine, um bloqueador do receptor 5-HT_{2C} no córtex visual de gatos, reduz a plasticidade das colunas de dominância ocular após a privação monocular (Kojic *et al.*, 1997). O bloqueio de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ gera uma marcante redução na redistribuição dos circuitos corticais (Gu & Singer, 1995), sugerindo assim, um papel permissivo da serotonina na organização do córtex visual.

No sistema retinotectal, fortes evidências apontam para a idéia de que a serotonina atua inibindo a estabilização dos aferentes retinianos tanto em fases precoces do desenvolvimento, quanto em animais adultos, provavelmente por antagonizar a ativação de receptores NMDA (Murase *et al.*, 1990). Ao contrario do descrito no hipocampo, no córtex visual primário de roedores, a LTP é inibida via receptor 5-HT_{1A} (Edagawa *et al.*, 2001).

Foi demonstrado que a ativação de receptores 5-HT_{1B} localizados em terminais pré-sinápticos no sistema retinotectal de hamsters adultos, gera 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). Experimentos utilizando fluoxetina, um inibidor da recaptação de serotonina, mostraram que este tratamento induziu a 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).

No colículo superior de ratos existe uma redução percentual de sinapses que foi observada principalmente no final da terceira semana pós-natal. Esta diminuição progressiva dos aferentes serotoninérgicos no colículo superior é mais uma

evidência de que esse neurotransmissor está relacionado com o desenvolvimento dos axônios visuais retinotectais (Dori *et al.*, 1998).

Dados publicados recentemente pelo nosso laboratório demonstraram que a redução de serotonina endógena, obtida através da restrição dietética de triptofano, gerou um atraso no desenvolvimento topográfico das projeções retinotectais de animais em P10 e P21 (González *et al.*, 2008).

As inúmeras evidências da importância do sistema serotoninérgico, tanto para o desenvolvimento quanto para os processos plásticos do SNC, despertaram nosso interesse em estudar as possíveis modulações no sistema serotoninérgico e na plasticidade retinotectal, induzidas pela restrição nutricional de triptofano.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a serotonina um neurotransmissor modulatório, presente desde o início da formação do SNC, e sua participação em processos plásticos, objetivamos neste trabalho a investigação dos possíveis efeitos de uma restrição nutricional do aminoácido precursor da serotonina, o triptofano, no modelo de plasticidade retinotectal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar o padrão de plasticidade das projeções retinotectais após uma lesão de retina no décimo dia pós-natal em condições de restrição nutricional de triptofano (dieta RT), e nos grupos controle, Nuvital® (controle comercial) e CT (dieta complementada com triptofano).

- ❖ Analisar a influência do período crítico do SNC no efeito da restrição nutricional de triptofano, através da re-introdução desse aminoácido na dieta.

- ❖ Quantificar o número de células serotoninérgicas, dos núcleos da rafe, em animais alimentados até P14 com a dieta CT e RT.

- ❖ Avaliar possíveis alterações na expressão do transportador de serotonina (SERT), em animais restritos de triptofano até P14, quando comparados com a expressão em alimentados com a dieta complementada até a mesma idade.

- ❖ Comparar a expressão da cinase ativada por mitógeno (pERK), nos colículos superiores de animais que receberam a dieta CT e RT até P14.

- ❖ Investigar o perfil de atividade da metaloprotease de matriz extracelular 9 (MMP-9), nos animais restritos e complementados com triptofano até P14. Analisar a atividade da MMP-9, em resposta a enucleação monocular, nos grupos CT e RT no dia pós-natal 10, com diferentes tempos pós-denervação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MODELOS EXPERIMENTAIS

Ratos pigmentados da linhagem *Lister Hooded* com idades pós-natal entre zero e 41 dias {P0 (dia do nascimento) – P41}, foram utilizados em todos experimentos. Os experimentos foram realizados segundo as normas para experimentação animal da Sociedade Brasileira de Neurociências.

3.2 DIETAS

Foram empregados três tipos de dietas normocalóricas; a dieta controle (Nuvital®), a complementada com triptofano (Sigma®) (CT 357.08 Kcal – Tabela III), e a com restrição de triptofano (RT 363.45 Kcal – Tabela IV). Estas duas últimas dietas foram preparadas tendo como base farinha de milho e gelatina (Tabelas III e IV). Os valores para macronutrientes, vitaminas e minerais foram calculados de acordo com o requerimento AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993) para roedores durante o período de lactação, sendo os *pellets* elaborados pela Rhoster® Indústria e Comércio Ltda.

TABELA III: Composição centesimal da dieta com restrição de triptofano

Ração RT (100g)	Porção (g)	Proteínas	Glicídeos	Lipídeos	Fibra	Triptofano
Fubá	76.00	7.28	58.65	1.51	4.59	0.045
Óleo de soja	3.50	-	-	3.50	-	-
Mix de minerais	3.50	-	-	-	-	-
Mix de vitaminas	1.00	-	-	-	-	-
Gelatina	16.00	13.66	-	-	-	-
Total	100g	20.94	58.65	5.01	4.59	0.045
VET (Kcal)	363.45	83.76	228.40	45.00	-	-

TABELA IV: Composição centesimal da dieta complementada com triptofano

Ração CT (100g)	Porção (g)	Proteínas	Glicídeos	Lipídeos	Fibra	Triptofano
Fubá	75.75	7.26	57.10	1.50	4.59	0.045
Óleo de soja	4.50	-	-	3.50	-	-
Mix de minerais	3.50	-	-	-	-	-
Mix de vitaminas	1.00	-	-	-	-	-
Gelatina	16.00	13.66	-	-	-	-
L-triptofano	0.25	-	-	-	-	0.250
Total	100g	20.92	57.10	5.00	4.59	0.300
VET (Kcal)	357.08	83.68	228.40	45.00	-	-

A dieta com restrição de triptofano contém 23 % do seu valor energético total (VET) constituído por proteínas de baixo valor biológico (BVB), 63% por glicídios e 14% de lipídios, e contém um mix balanceado de vitaminas e minerais. Entretanto sua base proteica é desprovida de triptofano, contendo apenas 0,06% deste aminoácido, o que não é significativo. A dieta complementada com triptofano possui uma composição idêntica à dieta RT diferindo apenas na concentração deste aminoácido, complementado com 0,25% de L-triptofano (Sigma®) o que é

equivalente a recomendação para roedores em período de lactação (Benevenga *et al.*, 1994).

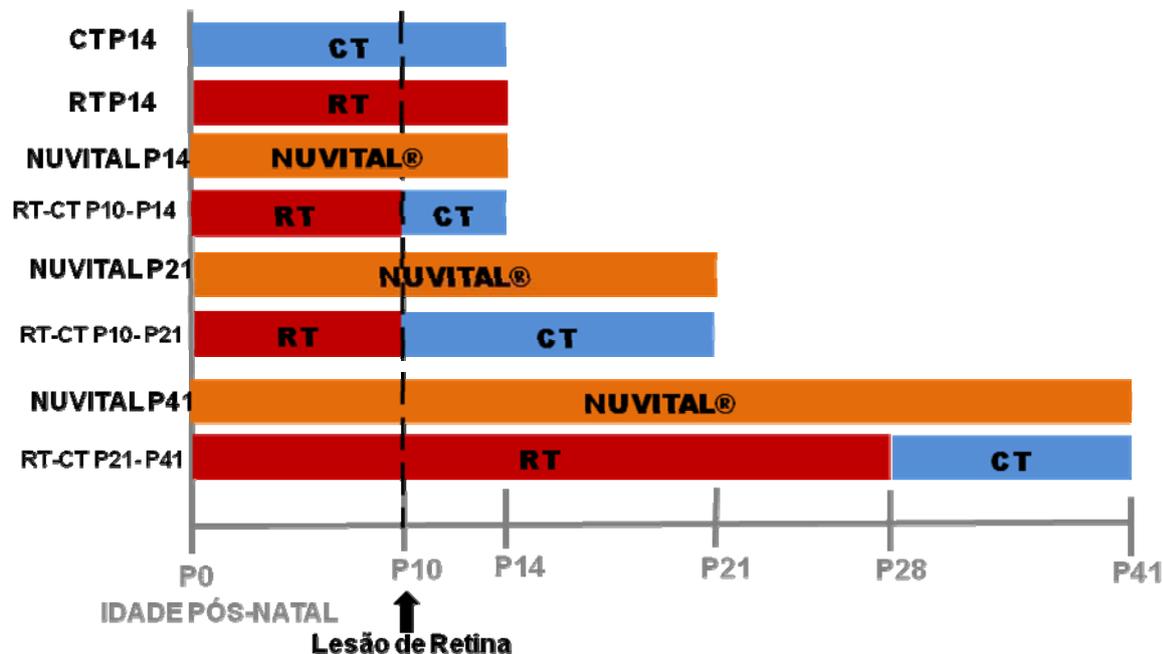
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As mães foram alimentadas a partir do nascimento da prole, com ração RT, CT, ou a dieta controle comercial Nuvital® até diferentes idades.

Os animais destinados aos estudos de imunohistoquímica (serotonina e SERT), zimografia (MMP-9) e Western Blotting (pERK), receberam a dieta CT ou RT, através da amamentação, até o décimo quarto dia pós-natal (P14), quando foram sacrificados.

Todos os animais, destinados ao estudo da plasticidade induzida receberam uma lesão de retina temporal no olho esquerdo no décimo dia pós-natal (P10). Alguns grupos ingeriram somente as rações RT ou CT até a idade que foram analisados, P14 e P21. Um grupo (RT P10 – CT P10-14) foi constituído por animais que receberam a dieta restrita de triptofano (RT) até P10 e que foram complementados com esse aminoácido (dieta CT) durante os quatro dias restantes de sobrevivência (de P10 até P14). Outro grupo (RT P10-CT P21) era formado de animais restritos de triptofano (RT) até P10, e que receberam a ração complementada (CT) de P10 até P21. Foram ainda estudados os animais alimentados com a dieta RT até P28 e, posteriormente com a CT até P41, quando então foram estudados. Os últimos grupos controles analisados, foram os ratos que receberam somente a ração comercial Nuvital® até P14, P21 ou P41 (Tabela V).

TABELA V: Dietas recebidas pelos diferentes grupos experimentais para o estudo da Plasticidade



3.4 TÉCNICAS NEUROANATÔMICAS

Essas técnicas permitem a visualização, ao microscópio óptico, de axônios do sistema visual e suas conexões com núcleos visuais centrais, e de células no SNC.

3.4.1 LESÃO DE RETINA TEMPORAL

Animais dos diferentes grupos experimentais descritos acima, foram submetidos em P10 à lesões unilaterais na retina temporal esquerda (contralateral) sob anestesia com éter/água (1:1) (Fig. 10). As pálpebras foram abertas por meio de uma incisão com bisturi sobre a fenda palpebral. Em seguida foi feita uma pequena incisão através da esclera entre o limbo e o disco óptico. Este procedimento secciona os axônios das células ganglionares da retina e leva a denervação da região anterior/lateral correspondente no colículo superior (Serfaty *et al.*, 1990).

3.4.2 ENUCLEAÇÃO MONOCULAR

Lund e colaboradores mostraram que a enucleação monocular em ratos neonatos induz plasticidade dos axônios referente ao olho intacto, onde a via ipsilateral expande seus campos terminais nas camadas visuais do CS contralateral a enucleação monocular. Para análises de zimografia, os animais, alimentados com a dieta RT ou CT, no 10º dia pós-natal foram submetidos à retirada do globo ocular esquerdo, conforme descrito anteriormente (Fig. 9) (LUND *et al.*, 1980). Os animais foram anestesiados pela inalação de uma mistura éter/água na proporção 1:1 e os olhos abertos por meio de uma incisão ao nível do sulco que define as bordas palpebrais. Em seguida, com o auxílio de uma tesoura a musculatura intrínseca do olho foi seccionada e o olho removido. Após a remoção do globo ocular, foi inserido um pedaço de gel foam na cavidade ocular e por fim as pálpebras foram seladas com gel de cianoacrilato. Após a recuperação da anestesia os animais foram devolvidos ao biotério. Estes animais em P10 tiveram uma sobrevivência de 3, 6, 12, 24, 48, 72 horas pós-lesão.

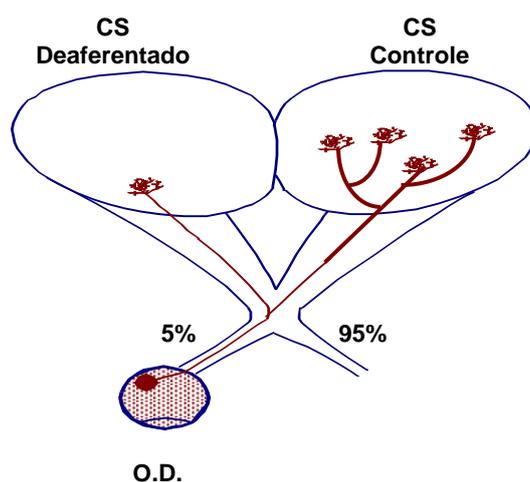


FIGURA 9 – Esquema ilustrando o modelo de enucleação monocular. O CS deaferentado perde aproximadamente 95% das aferências enquanto o CS controle perde apenas 5% , o que possibilita este ser o controle interno da lesão. O.D. = Olho direito.

3.4.3 INJEÇÃO INTRA-OCULAR DE PEROXIDASE (HRP)

Os traçadores neuroanatômicos injetados diretamente no humor vítreo, permitem a análise do padrão de distribuição dos axônios que emergem da retina durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Com este instrumental pode-se determinar o tempo de desenvolvimento e grau de maturação dos axônios visuais

A peroxidase da raiz forte (HRP tipo VI – Sigma®) é uma enzima que, após injeção intraocular, é captada pelas células ganglionares da retina, e transportada de forma anterógrada, pelo nervo óptico até o colículo superior.

Os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico para injeção intraocular de peroxidase (HRP) na câmara vítrea do olho direito após uma pequena incisão na região dorsal entre o limbo e a câmara anterior. Estas injeções foram realizadas com uma micro seringa Hamilton® contendo 4 μ L de uma solução que continha, HRP 30% dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) 2% em NaCl 0,9% sempre no último dia do tratamento (Fig. 10). Após a injeção, os animais tiveram uma sobrevida de 24 horas, quando então foram perfundidos.

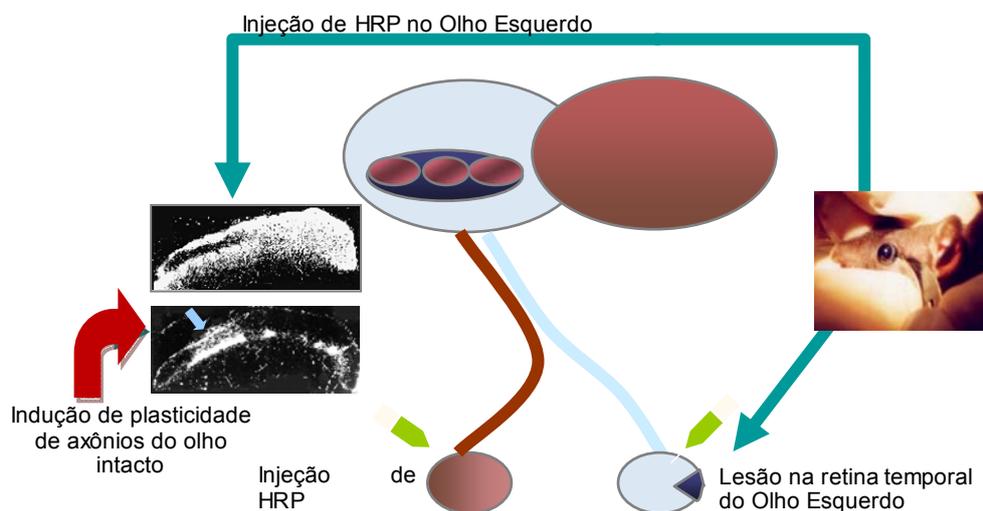


FIGURA 10. Esquema mostrando a plasticidade retinotectal induzida por lesão de retina. A lesão no olho esquerdo induz uma denervação nos axônios no CS contralateral, visualizada pela injeção de HRP no mesmo olho (seta azul). Reorganização dos axônios ipsolaterais no CS, observada pela injeção de HRP no olho direito (não-lesado), em resposta a lesão de retina do olho esquerdo (seta vermelha) (Modificado de Serfaty & Linden, 1994).

3.4.4 PERFUSÃO

Os animais destinados a análises morfológicas (histoquímica de Mesulan e Imunohistoquímica), foram perfundidos transcardiacamente com solução salina (NaCl 0,9%) contendo heparina 0,05% por cerca de 10 minutos, para remoção de todo sangue corporal e assim proporcionar adequada fixação pela solução de Karnowski (paraformaldeído 1% e glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 – 7,4), para histoquímica, e paraformaldeído 4% para imunohistoquímica. Após a fixação, os cérebros foram removidos e mantidos *overnight* em uma solução de sacarose a 20% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 – 7.4, a fim de crioprotéger os tecidos.

Os cérebros foram congelados em gelo seco e posteriormente cortados, no plano coronal ou parassagital, em um micrótomo de congelamento American Optical à -15°C , na espessura de 40 micrômetros, para histoquímica de HRP e a 20 micrômetros para imunohistoquímica.

3.4.5 HISTOQUÍMICA PARA HRP

Após a criotomia os cortes foram imersos em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e deixados *overnight* a 4°C . A seguir foram processados de acordo com o protocolo de Mesulan (Mesulan, 1978) no qual são utilizadas duas soluções em um volume final de 200ml. A solução A é composta de 185mL de água MiliQ, 10mL de tampão acetato 0,2M pH 3,3, 18mg de Nitroprussiato de Sódio (NPS) e a solução B consiste de 2mL de álcool etílico absoluto e 10 mg de tetrametilbenzidina (TMB). Estas soluções foram preparadas separadamente e misturadas no momento da incubação, após 20 minutos nas cubas contendo os cortes e as soluções, foi adicionado 6mL de substrato do traçador injetado, o peróxido de hidrogênio a 0,3%, após mais 20 minutos de reação os cortes foram lavados 6 vezes com tampão acetato a 0,5% pH 3,3 e montados em lâminas previamente gelatinizadas.

No dia seguinte as laminas foram desidratadas por 5 segundos em álcool etílico absoluto, clarificadas duas vezes em xilol por 5 minutos, montadas com lamínulas em Entelan (Merck) e fotografadas em microscopia óptica de campo escuro para posterior análise quantitativa das projeções retinianas no colículo superior.

3.4.6 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA

Animais que receberam a dieta restrita de triptofano (RT), ou a dieta complementada com triptofano (CT), até o décimo quarto dia pós-natal (P14) foram sacrificados, e os cérebros processados conforme descrito anteriormente. Para o estudo da imunorreatividade para serotonina, foram selecionados cortes parassagitais sequenciais da linha média dos cérebros dos animais (analisamos cerca de 30 cortes por animais), a fim de avaliarmos as mesmas áreas dos núcleos da rafe em todos animais. Os cortes, montados em laminas previamente gelatinizadas, foram armazenados em freezer a -20°C para conservação das estruturas.

Para o processamento imunohistoquímico utilizamos o seguinte protocolo:

- ❖ Lavagem do tecido com PBS 0,1M pH 7,6 por 5 minutos (3X);
- ❖ Inativação da peroxidase endógena com metanol e H_2O_2 3% durante 10 minutos;
- ❖ Lavagem do tecido com PBS 0,1M pH 7,6 por 5 minutos (3X);
- ❖ Bloqueio dos sítios inespecíficos com soro normal de cabra (NGS) 10% diluído em PBS contendo Triton a 0,25% durante 30 minutos;
- ❖ Incubação dos cortes com o anticorpo primário específico para serotonina (SIGMA S-5545, na diluição 1:10000), ou para o transportador de serotonina (SERT) (monoclonal, CHEMICON MAB1564, na diluição de 1:1000) diluídos em PBS/Triton, à temperatura ambiente e em câmara úmida durante 24 horas; os cortes controle foram incubados com PBS/Triton somente.
- ❖ Lavagem do tecido com PBS 0,1M pH 7,6 por 5 minutos (3X);
- ❖ Incubação dos cortes com o anticorpo secundário, contra coelho (VECTOR BA-1000, diluição 1:500, produzido em cabra - cortes incubados com anti-serotonina) ou contra camundongo (VECTOR BA-2001, diluição 1:200, produzidos em cavalo - cortes incubados com anti-SERT), diluído em PBS/Triton, à temperatura ambiente em câmara úmida durante 90 minutos;

- ❖ Lavagem do tecido com PBS 0,1M pH 7,6 por 5 minutos (3X);
- ❖ Incubação do tecido com o complexo avidina-biotina, à temperatura ambiente e em câmara úmida durante 60 minutos;
- ❖ Lavagem do tecido com PBS 0,1M pH 7,6 por 5 minutos (3X);
- ❖ Revelação da atividade enzimática da peroxidase pela incubação com solução DAB (diaminobenzidina- Sigma) diluída em tampão Tris HCl 50 mM na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 0,015%), em câmara escura, num período de tempo que variava de 3 a 10 minutos;
- ❖ Lavagem do tecido com PBS 0,1M pH 7,6 por 10 minutos (4X);
- ❖ Desidratação das lâminas por 5 segundos em álcool 50, 70, 80, 90% e álcool absoluto, seguida por xilol durante 5 minutos (2 trocas);
- ❖ Montagem das lamínulas utilizando Entellan (Merck).

3.5 WESTERN BLOTTING

Os animais CT ou RT, em P14, foram sacrificados por inalação com clorofórmio e decapitados. Após a dissecação do encéfalo, as camadas superficiais do colículo superior dissecadas, com auxílio de um bisturi N° 15. O tecido, referente à fatia de 1 colículo superior, foi transferido para um ependorf com 100 μ L de tampão de amostra-SDS, dentro do gelo e então “vortexado” por cerca de 5 minutos, até que fosse dissolvido todo o tecido. O homogenizado foi levado à fervura por 5-8 minutos, e centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro ependorf e conservado congelado no freezer à -70 °C.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Com as amostras prontas, foi realizado *western blotting* para visualizar a expressão da proteína ERK fosforilada. Foi utilizado 50 μ g de proteína para correr no gel SDS/PAGE 10%. A corrida foi realizada sob amperagem constante de 20 mA. Após a corrida foi realizada a transferência das proteínas para membranas de PVDF durante 1h com voltagem fixada entre 45-60 V. Logo após a transferência, realizava-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com uma solução de bloqueio de TBS-T + 5%

de leite por duas horas. Em seguida, as membranas foram lavadas uma vez por 5 minutos com TBS-T e incubadas com anticorpo primário monoclonal de coelho anti-pERK. Após 24h, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com TBS-T, incubadas com anticorpo secundário por 1 hora, lavadas mais 2 vezes com TBS-T e uma vez com TBS e, reveladas em filmes radiográficos após exposição ao reagente ECL (Tabela VI).

Foi realizado também o controle de carregamento das proteínas no gel de eletroforese, utilizando a proteína ERK não fosforilada (ERK TOTAL) como controle. Para isso, foi realizado o *stripping* da membrana da seguinte forma: Após a membrana ter sido utilizada na revelação, ela foi lavada com TBS e incubada com uma solução de glicina 0,2M pH 2,2 por 30 minutos em agitação orbital. Em seguida, a membrana estava pronta para ser novamente bloqueada e, assim, dar início novamente ao protocolo de incubação com os anticorpos.

Anticorpos	Origem	Fonte (EXPERIMENTOS)	Diluição
Anticorpos Primários			
Anti-ERKp	Coelho	Oncogene (WB)	1:500
Anti-ERK TOTAL	Coelho	Santa Cruz (WB)	1:6000
Anticorpos Secundários			
Anti-IgG de coelho	Burro	Amersham Bioscience (WB)	1:5000

TABELA VI – Relação de anticorpos utilizados, suas respectivas concentrações e fonte de obtenção. Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos em TBS-T+5% de leite para os experimentos de western blot (WB).

3.6 ZIMOGRRAFIA

Colículos superiores de animais P14, alimentados com a dieta RT ou CT, foram homogeneizados sem a inclusão de inibidores de proteases, em 100µl de tampão de homogeneização (100mM Tris HCl, pH 7,6; 200mM NaCl; 100nM CaCl₂, 1% Triton-X 100). Os homogeneizados foram centrifugados a 15000 xg por 10

minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados para análise. Proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

As amostras resultantes foram estocadas a -70°C para análise. Cada amostra de 50µg foi submetida a zimografia em gel de acrilamida a 10% co-polimerizado com 1% de gelatina. As amostras foram acrescidas de tampão contendo SDS na ausência de agente redutor. A corrida teve duração de 2 horas, submetida inicialmente a corrente constante de 15mA (por 1 hora) e posteriormente 20 mA (1 hora).

Após a corrida, os géis foram lavados em tampão tris HCl 50mM pH 7,6 contendo 2,5% triton X-100 por 1 hora, sob agitação, para renaturação das proteínas. Em seguida, os géis foram transferidos pra o tampão de lise Tris HCl 50mM pH 7,8 contendo 150 mM NaCl e 5mM CaCl₂, a 37°C, sob agitação. Os géis foram corados com azul brilhante de *comassie blue* R-250 (Sigma®) a 5% em 40% de etanol e 10% de ácido acético. Bandas de proteínas lisadas num fundo azul foram visualizadas pela marcação com *comassie blue*. Os géis foram então descorados e posteriormente escaneados usando o programa *Adobe Photoshop*. A identificação da metaloprotease foi feita baseada no peso molecular, considerando a forma ativa da MMP-9 (86 KDa), utilizando padrão de peso molecular Bio-Rad.

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.7.1 GANHO PONDERAL

Os animais experimentais foram pesados diariamente, desde o nascimento, até P21, com o objetivo de comparar o ganho ponderal entre os grupos CT e RT. Após a realização das médias dos pesos, os resultados foram analisados utilizando o teste t de Student.

3.7.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA SEROTONINA

Com o objetivo de comparar a diferença no número de células serotoninérgicas marcadas nos cérebros dos animais que tiveram restrição de triptofano e dos animais que ingeriram triptofano com a dieta complementada cortes adjacentes à linha média do cérebro, e que continham neurônios positivos para serotonina nos núcleos medianos da rafe foram selecionados. As imagens foram fotografadas utilizando o microscópio óptico Zeiss Axioskop e captadas com o auxílio de uma câmera digital Sound Vision. As células serotoninérgicas dos núcleos ventrais e do núcleo dorsal da rafe foram contadas em cada corte, e para cada animal foi obtida uma média, representando, portanto o número médio de neurônios dos núcleos dorsais e ventrais por animais. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa Graph Pad Prism.

Nos histogramas estão representados a média e o erro padrão da média. Para analisar a quantificação da imunorreatividade para serotonina foi usado o teste T de Student. Para todos os testes estatísticos foram considerados como significativos os valores com $p < 0,05$.

3.7.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA O TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (SERT)

Com o objetivo de comparar a diferença na quantidade de fibras imunoreativas para SERT entre os animais que tiveram restrição de triptofano (RT) e os que ingeriram triptofano com a dieta complementada (CT), cortes do colículo superior marcados para SERT foram fotografados utilizando o microscópio óptico Zeiss Axioskop e uma câmera digital Sound Vision. Avaliamos a intensidade e quantidade de fibras que expressavam esse transportador pela marcação da imunorreatividade através do programa (Scion Image), que faz análise de densidade óptica. Nos histogramas estão representados a média e o erro padrão da média. A análise quantitativa da imunorreatividade para SERT foi realizada pelo programa Graph Pad Prisma, e utilizamos o teste T de Student para os resultados estatísticos, foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

3.7.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA – MESULAN

A análise quantitativa dos resultados da histoquímica foi feita após observação ao microscópio óptico sob iluminação de campo escuro e luz polarizada. Após digitalização das imagens obtidas ao microscópio, utilizamos um programa (Scion Image). Através deste programa analisamos a densidade óptica do primeiro terço superficial do rearranjo plástico da projeção retinotectal ipsilateral após uma lesão na retina contralateral nos animais experimentais e controles, a fim de avaliarmos o efeito da influência da restrição de triptofano sobre a plasticidade retinotectal. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa Graph Pad Prism, utilizando a análise de variância (ANOVA), e posteriormente o pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos.

3.7.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS: *WESTERN BLOT* E ZIMOGRAFIA

A quantificação das bandas observadas nas técnicas de *western blot* e zimografia foi feita através da análise por densitometria usando a análise de *Gelplot* macros no programa *ScionImage Software, Version 4.03*, (Scion Corporation, MD, USA) que mede a densidade integrada de cada banda. Os dados em cada gel foram comparados a um controle interno, considerando como 100%. A análise foi realizada pelo programa Graph Pad Prisma, e utilizamos o teste t de Student para os resultados estatísticos, foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os animais que participaram desse estudo foram divididos em três grupos; os animais controles que receberam a ração comercial para roedores (Nuvital®), os que receberam a ração complementada com triptofano (CT), o controle interno da dieta, e o grupo experimental, que recebeu a ração com restrição de triptofano (RT).

Ao observar que os animais RT tinham um tamanho reduzido, em comparação com os CT da mesma idade, fomos analisar o quanto essa diferença era representativa.

Nossos resultados demonstraram que o grupo alimentado com a dieta RT, até o dia pós-natal 21 (P21), apresentou um deficit ponderal quando comparados com os animais do grupo controle Nuvital®. Os animais que receberam a dieta RT até o décimo dia pós-natal, posteriormente ingeriram triptofano pela ração CT até o vigésimo primeiro dia pós-natal (P21), apresentaram um menor ganho de peso comparado com o grupo Nuvital®, entretanto ganharam mais peso que os animais RT da mesma idade (Fig.11), sugerindo que a deficiência no ganho de peso é reversível.

A alteração de peso observada nos animais restritos de triptofano não foi associada por atrasos na maturação somática. Sinais desta maturação tais como descolamento do pavilhão auditivo, erupção dos dentes incisivos com sete dias pós-natal e a abertura dos olhos entre P13 e P14 foram observados no mesmo período em todos os grupos experimentais, indicando um padrão de desenvolvimento somático normal nos animais submetidos à restrição nutricional de triptofano (González et al, 2008).

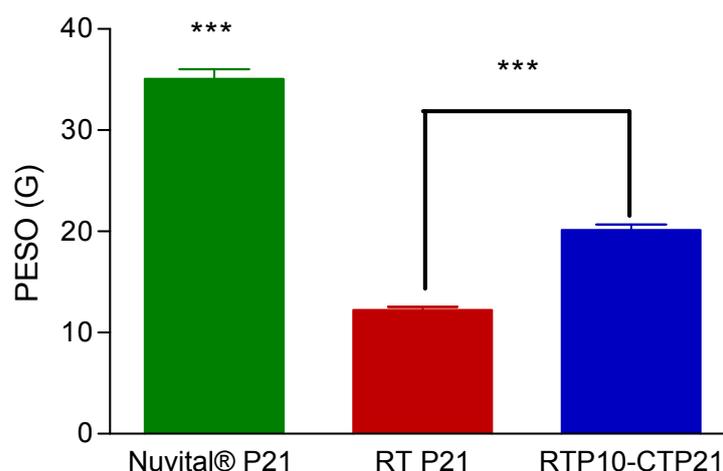


FIGURA 11. Análise quantitativa da variação ponderal entre os animais controle, os quais receberam dieta Nuvital®, os animais alimentados somente com ração RT e aqueles que, além da ração RT foram complementados com triptofano após a lesão em P10. Barra mostra erro padrão da média. CONTROLE n= 6, RT n= 6 e RT-CT n=5, ***p<0,001.

4.1 IMUNODETECÇÃO DE SEROTONINA NOS NÚCLEOS DA RAFE: RELAÇÃO COM AS DIETAS CT E RT

Como a síntese de serotonina é dependente do aporte nutricional de triptofano, o primeiro passo do nosso trabalho foi avaliar possíveis alterações na presença de células serotoninérgicas nos núcleos da rafe em animais alimentados com a dieta restrita de triptofano (RT), comparados com o grupo controle CT.

O padrão de imunorreatividade para 5-HT, nos núcleos ventrais e dorsais da rafe mostrou uma diferença significativa entre os animais que foram alimentados com a dieta RT, e os que receberam triptofano na quantidade recomendada para roedores através da dieta CT até P 14 (Fig. 12-A, B e Fig. 13-A, B). A análise quantitativa mostrou que tanto nos núcleos ventrais quanto nos núcleos dorsais da rafe, os animais que receberam a dieta RT tinham menos células imunorreativas para serotonina quando comparados com o grupo que recebeu a dieta CT (Fig. 14). Essa diferença na quantidade de células marcadas nos núcleos da região dorsal é de extrema importância para o nosso estudo, pois nessa região é onde está

localizado o núcleo B7, de onde partem os axônios serotoninérgicos que irão inervar os colículos.

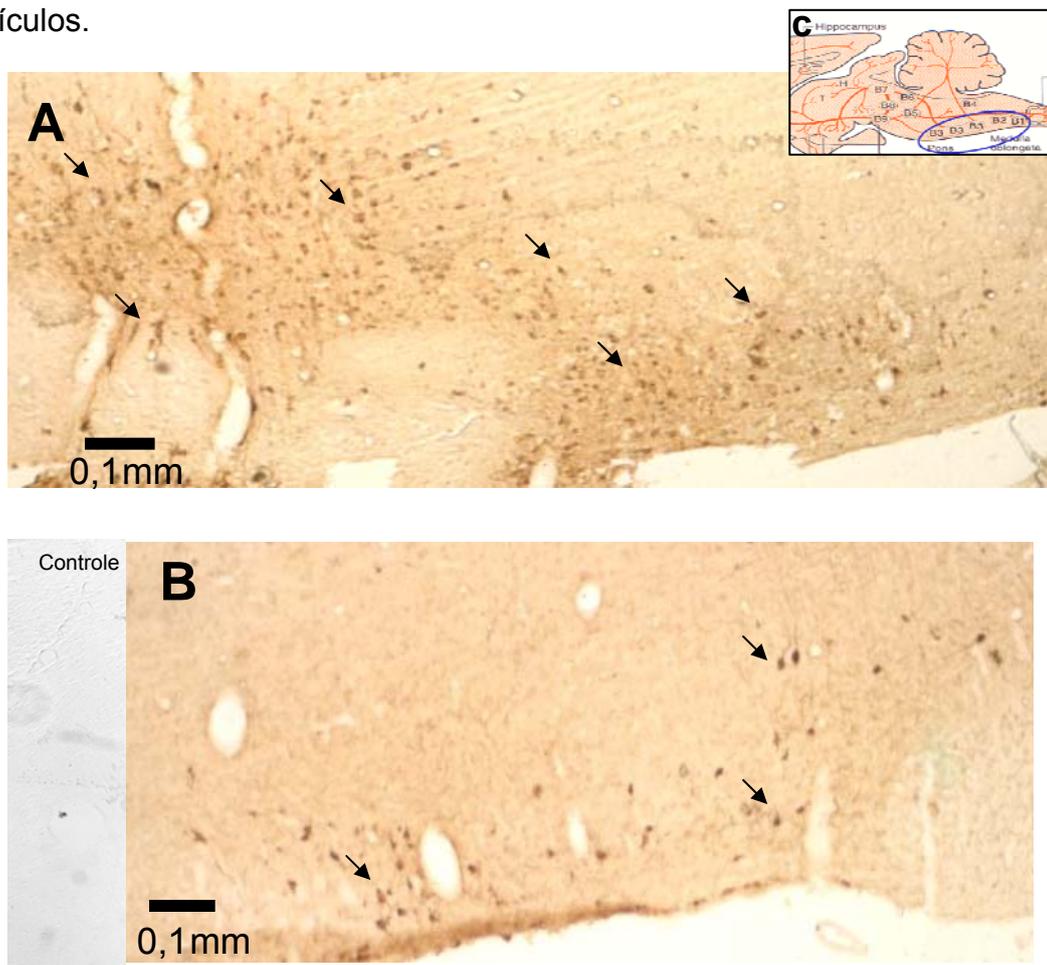


FIGURA 12. Imunoreatividade para serotonina em cortes parassagitais dos núcleos ventrais da rafe em ratos no dia pós-natal 14 (P14). Células serotoninérgicas (↑) A) Animais alimentados com a ração CT. B) Animais alimentados com a ração RT. Notar o menor número de células marcadas nos animais alimentados com a ração RT em comparação aos que receberam a ração CT. CONTROLE= ausência do anticorpo primário. Todos cortes foram reagidos na mesma imunorreação. Aumento de 100X Escala= 0,1mm C) Esquema mostrando a região fotografada.

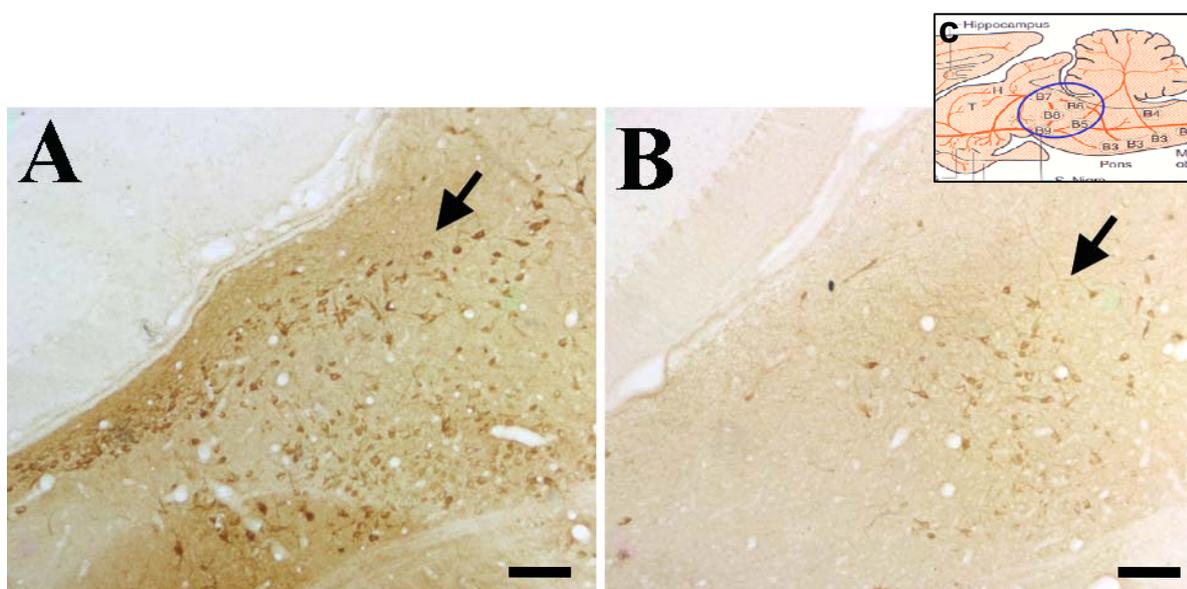


FIGURA 13. Imunorreatividade para serotonina em cortes parassagitais dos núcleos dorsais da rafe em ratos no dia pós-natal 14 (P14). Células serotoninérgicas (↑) A) Animais alimentados com a ração CT. B) Animais alimentados com a ração RT. Notar o menor número de células marcadas nos animais alimentados com a ração RT em comparação aos que receberam a ração CT. CONTROLE= ausência do anticorpo primário. Todos cortes foram reagidos na mesma imunorreação. Aumento de 100X Escala= 0,1mm C) Esquema mostrando a região fotografada.

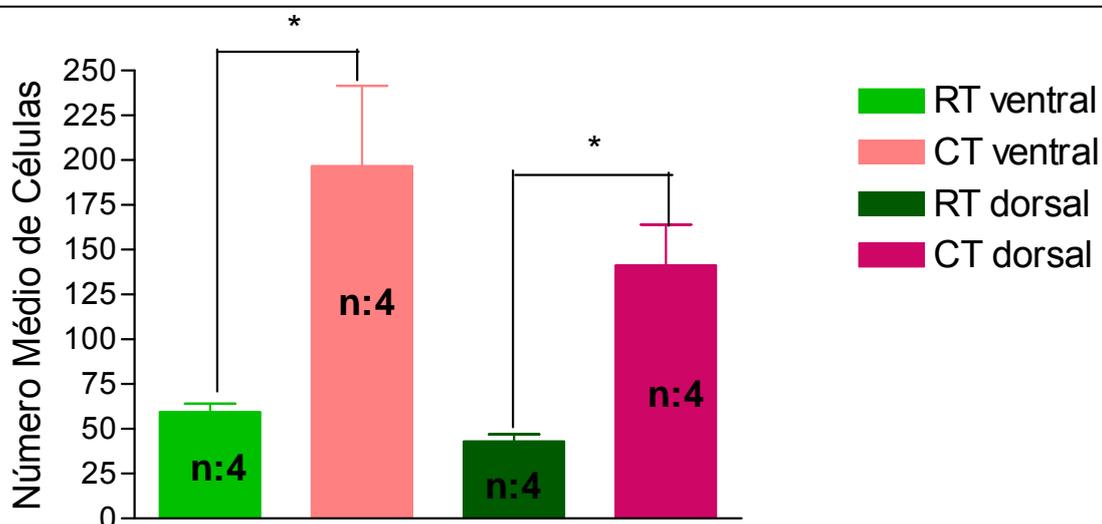


FIGURA 14. Histograma mostrando a média do número de células marcadas para serotonina nos núcleos dorsais e ventrais da rafe dos animais que receberam dieta CT e RT. Notar a diferença significativa na quantidade de células marcadas entre os grupos experimentais tanto nos núcleos dorsais como ventrais, n=4 animais em cada grupo experimental * $p < 0,05$.

4.2 IMUNODETECÇÃO DE SERT NOS COLÍCULOS SUPERIORES: RELAÇÃO COM AS DIETAS CT E RT

A disponibilidade de serotonina na fenda sináptica é controlada por um transportador presente na membrana do terminal pré-sináptico (SERT), que é responsável pela reciclagem de 5-HT para o meio intracelular. A função da serotonina no sistema é então dependente da concentração de SERT na membrana pré-sináptica (Galineau *et al.*, 2004).

Como no nosso modelo de estudo foi observado um reduzido número de células serotoninérgica da rafe em animais restritos de triptofano, investigamos se essa restrição nutricional poderia estar modulando a expressão do transportador de 5-HT, que é tão importante para o sistema serotoninérgico.

A imunorreatividade para SERT, nos colículos superiores, de animais alimentados com a dieta complementada com triptofano até o décimo quarto dia pós-natal (CT P14) foi menos intensa e marcou uma menor quantidade de fibras expressando o transportador de serotonina quando comparada com a imunorreatividade presente nos colículos superiores de animais que tiveram a restrição nutricional de triptofano até a mesma idade (RT P14) (Fig. 15-A e B). A análise quantitativa da densidade óptica confirmou essa significativa diferença na marcação de fibras, mostrando uma maior intensidade de marcação nos colículos de animais RT (Fig. 16). Esse resultado sugere uma resposta dos axônios pré-sinápticos que na situação de baixas concentrações de serotonina intracelular expressam mais transportadores na tentativa de internalizar o máximo de serotonina possível e então tentar normalizar os níveis intracelulares desse neurotransmissor.

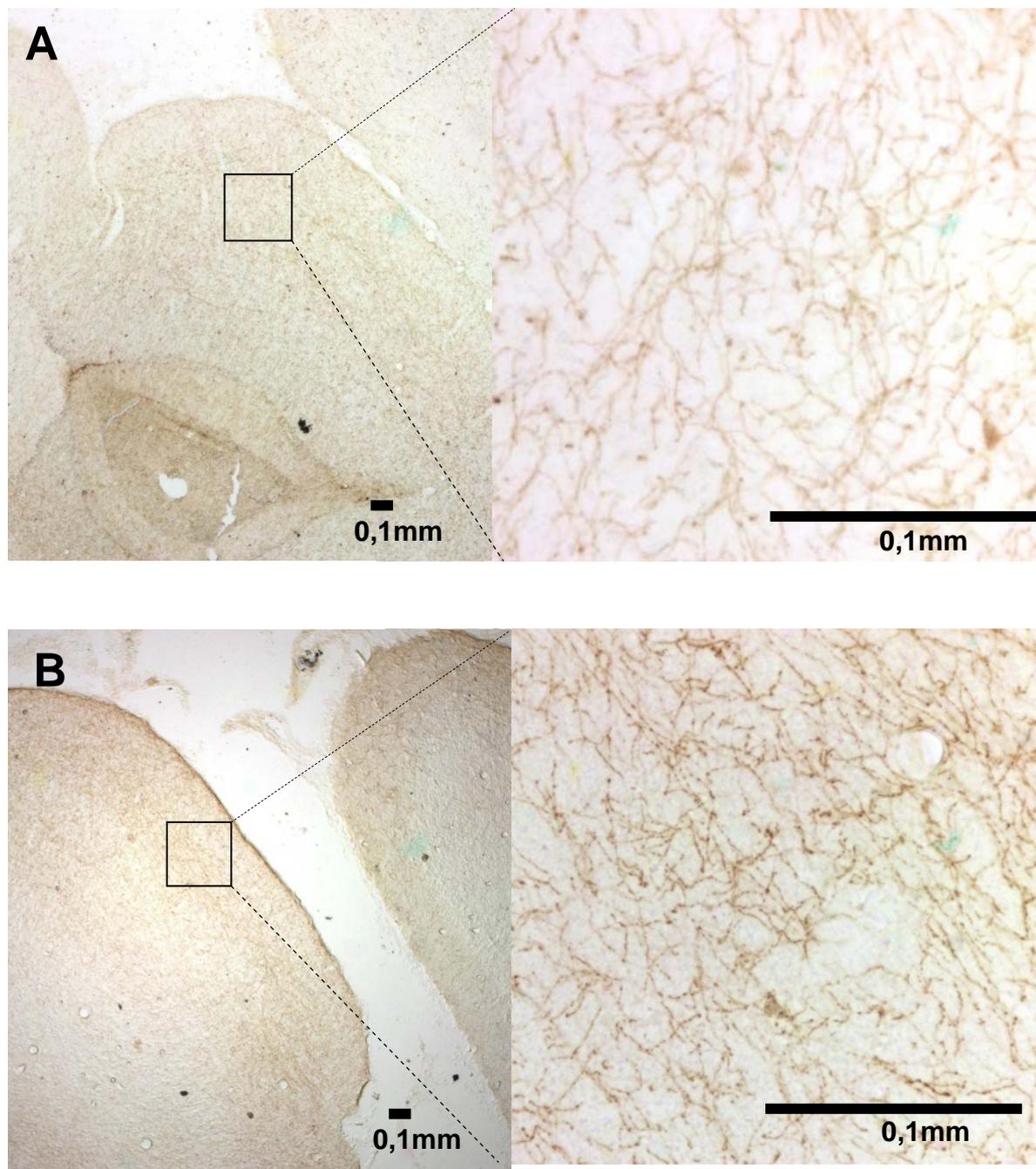


FIGURA 15. Imunoreatividade para SERT em cortes parassagitais de colículos superiores de ratos no dia pós-natal 14 (P14). A) Animais alimentados com a ração CT – aumento de 4X. Imagens com aumento de 100, da região indicada pelo tracejado, mostrando a presença de poucas fibras expressando SERT. B) Animais alimentados com a ração RT – aumento de 4X. Imagens com um aumento de 100, da região indicada pelo tracejado, mostrando a presença de inúmeras fibras expressando SERT. Todos cortes foram reagidos na mesma imunorreação. Escala= 0,1mm

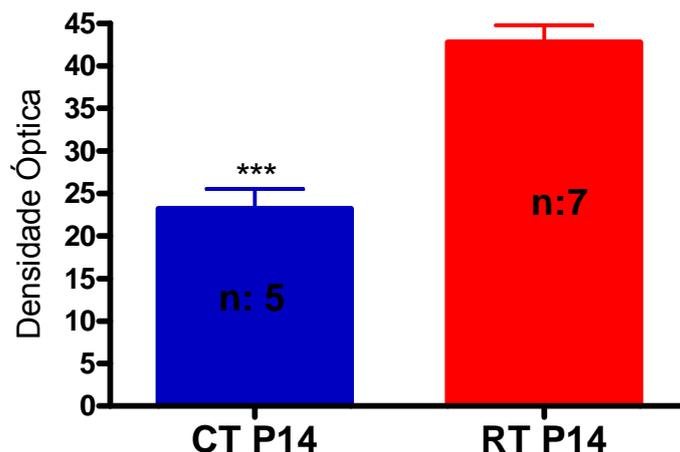


FIGURA 16. Histograma mostrando a densidade óptica de fibras marcadas na imunorreatividade para SERT nos colículos superiores dos animais que receberam dieta CT e RT até P14. Notar a diferença significativa na densidade óptica de marcação entre o grupo CT, n:5 e RT, n:7 .
 *** p<0,0001.

4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE pERK NO COLÍCULO SUPERIOR DE ANIMAIS ALIMENTADOS COM A DIETA CT OU RT

Dados da literatura mostram que os receptores para serotonina 5-HT_{1A} e 5HT-1B encontrados no colículo superior são acoplados negativamente a adenilil ciclase (Barnes & Sharp, 1999; Raymond *et al.*, 2001; Debski & Cline, 2002). Desta forma os níveis basais de AMP cíclico podem refletir o efeito da diminuição de serotonina no sistema retinotectal. Inúmeros estudos estão correlacionando plasticidade sináptica com receptores serotoninérgicos envolvendo modulação de segundos mensageiros como os níveis de AMPc, assim como a via de sinalização da quinase regulada extracelularmente (pERK) (Cowen, 2007).

Resultados prévios do nosso laboratório indicaram que os animais que recebiam a dieta RT apresentavam um maior acúmulo de AMP cíclico nos colículos superiores (González *et al.*, 2008). Investigamos então, se a restrição nutricional de triptofano poderia estar modulando a expressão das isoformas 1/ 2 pERK.

Os resultados de western blot apontaram um intenso aumento na expressão das duas isoformas da pERK no colículo superior dos animais que receberam a

dieta RT (Fig. 17 A). A quantificação da área das bandas marcadas na imunodeteccção pelo programa Scion Image evidenciou que a diferença entre as bandas marcadas nos animais que receberam a dieta RT e nos que receberam a CT foi significativa (Fig. 17 C, D).

O aumento na expressão da pERK nos animais RT está totalmente de acordo com os dados apresentados por González, 2008 e com os nossos resultados de redução no número de células serotoninérgicas na rafe, uma vez que a literatura indica uma resposta inibitória da adenilil ciclase, e então supressão na ativação da via das MAP Kinases, para estímulos serotoninérgicos (Yuen *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 1987).

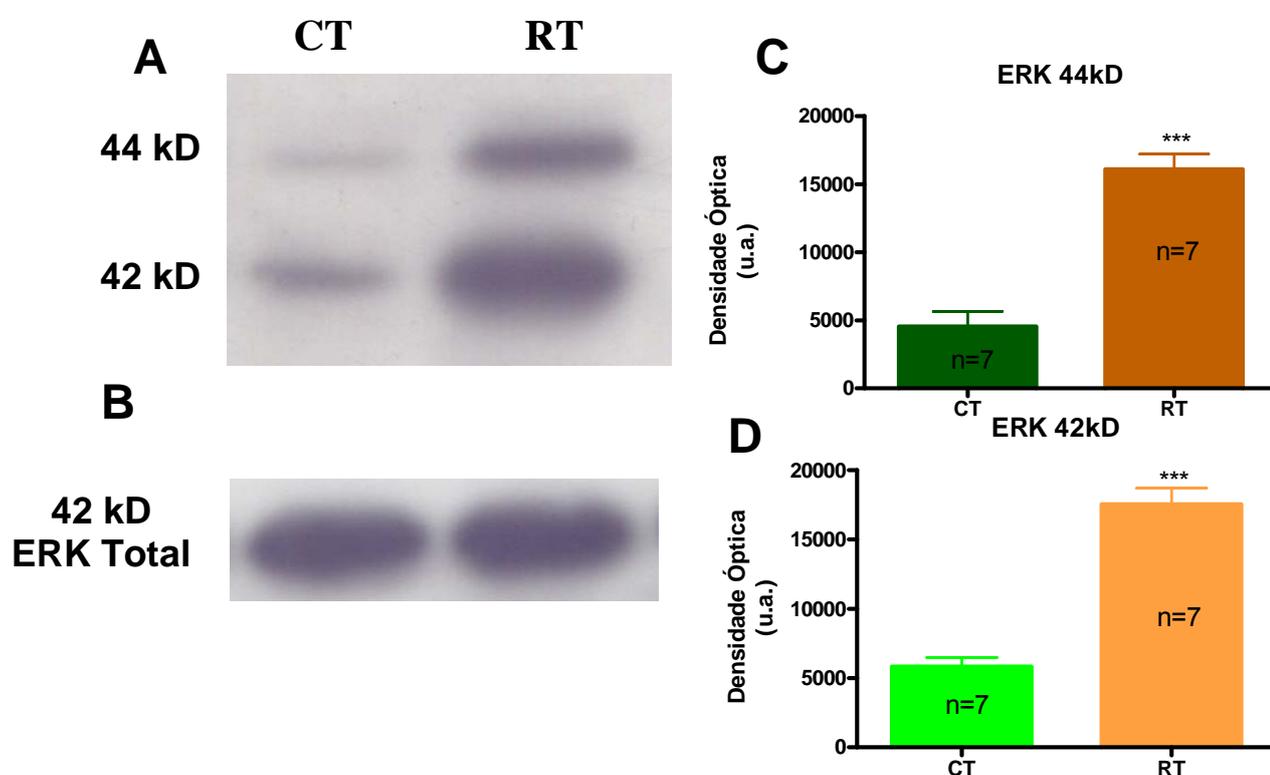


FIGURA 17. (A) Imunodeteccção da expressão das isoformas 1 (44Kd) e 2 (42KDa) da proteína pERK em amostras de tecido do colículo superior dos animais que receberam dieta CT e RT até P14. (B) Controle de carregamento, expressão da ERK total 42KDa. (C e D) Histogramas mostrando a área da densidade óptica da banda relativa a quantidade de pERK- 42KDa e pERK- 44KDa nas amostras experimentais. Notar a diferença significativa na densidade óptica de marcaçãodas, nas duas isoformas, entre os grupos, n:7 (foram utilizados 7 animais em cada situação). *** $p < 0,0005$.

4.4 EFEITO DA RESTRIÇÃO NUTRICIONAL DE TRIPTOFANO NA PLASTICIDADE INDUZIDA POR LESÃO DE RETINA

Estudos anteriores, demonstraram que após uma lesão de retina temporal em ratos com 10 dias de vida pós-natal, ocorre uma denervação na região antero-lateral do colículo superior (CS) contralateral ao olho lesado, e uma consequente migração das projeções ipsolaterais, do olho intacto, para regiões mais superficiais do CS após 48h de sobrevivência. (Serfaty & Linden, 1990; Serfaty *et al.*, 2005). Com o objetivo de avaliar o papel da restrição de triptofano na plasticidade retinotectal induzida, animais RT, CT e Nuvital® foram submetidos à lesão de retina em P10 e tiveram diferentes períodos de sobrevivência pós-lesão. A análise do perfil de inervação foi feita pela marcação anterógrada dos axônios ipsolaterais de cortes em plano coronal.

Tanto o grupo controle (ração Nuvital®) como o grupo CT, apresentaram um padrão bi-laminar de marcação terminal, semelhante ao padrão demonstrado por Serfaty e colaboradores em 2005. Foi observada uma densa inervação terminal na região superficial antero-lateral do colículo superior. Na região intermediária do colículo observa-se um padrão difuso de fibras e terminação, enquanto a região mais profunda das camadas visuais, os axônios ipsolaterais arborizaram-se em pequenos aglomerados de marcação terminal (Fig. 18). Estes resultados demonstraram que a dieta CT gera o mesmo efeito plástico frente a lesão de retina que a dieta Nuvital®.

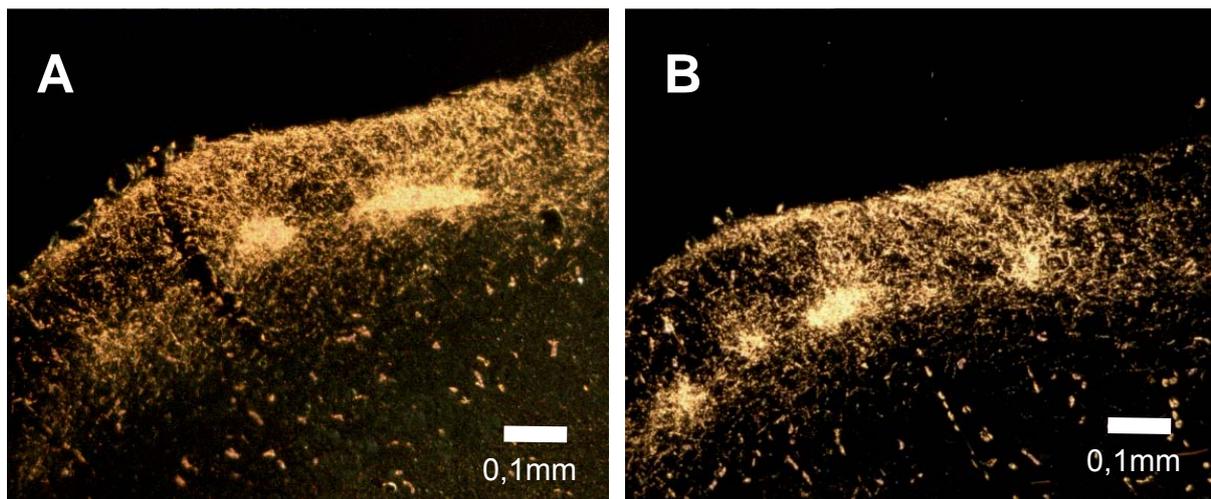


FIGURA 18. Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais do colículo superior em aumento de 100X evidenciando a reorganização induzida pela lesão dos axônios ipsolaterais na região superficial. (A) animais do grupo Nuvital® P14; (B) grupo CT P14. Notar o padrão bilaminar apresentado pelos animais dos dois grupos. (González, 2003) Escala 100 μ m.

Com o objetivo de avaliar o efeito da restrição neonatal de triptofano na resposta plástica dos axônios frente à lesão de retina, animais foram alimentados com a dieta com restrição de triptofano (RT) até P14 e foram submetidos à lesão de retina temporal no olho esquerdo em P10. O grupo RT P14 teve uma acentuada redução da marcação axonal superficial no colículo superior em comparação com a marcação dos animais CT (Fig 19 A e B). A análise quantitativa da densidade óptica, nos grupos RT e CT, confirmaram os resultados qualitativos (RT=32,4 \pm 4,0 e CT=60,6 \pm 5,2) (Fig.20).

A fim de analisar a possibilidade da reversão do déficit de resposta plástica causado pela ausência de triptofano ingerido, foi feito um estudo com animais que receberam a dieta com restrição desse aminoácido (RT) até P10, quando receberam a lesão de retina, e depois foram alimentados com a ração complementada com triptofano (CT) por 4 dias, até P14 (Fig. 19 C). A análise qualitativa demonstrou que estes animais apresentaram um pequeno aumento na densidade de inervação terminal na região superficial ântero - lateral do CS, em resposta a lesão de retina temporal, quando comparados aos animais restritos de triptofano até a mesma idade (Fig. 19-B e C). Apesar de o padrão difuso de fibras e terminais observados na

região intermediária do CS, diferente ao visualizado em animais do grupo RT, não foi identificado nos animais experimentais RTP10/CTP10-14 um padrão bi-laminar de marcação terminal característico dos animais que ingeriram somente a ração CT ou Nuvital® até P14. A análise quantitativa confirmou uma menor densidade óptica de inervação ipsolateral nos animais realimentados (RTP10/CTP10-14) quando comparados com o grupo controle (CT P14 e Nuvital® P14), entretanto, quando comparados com o grupo RT não foi observada diferença significativa de densidade de marcação (Fig. 20).

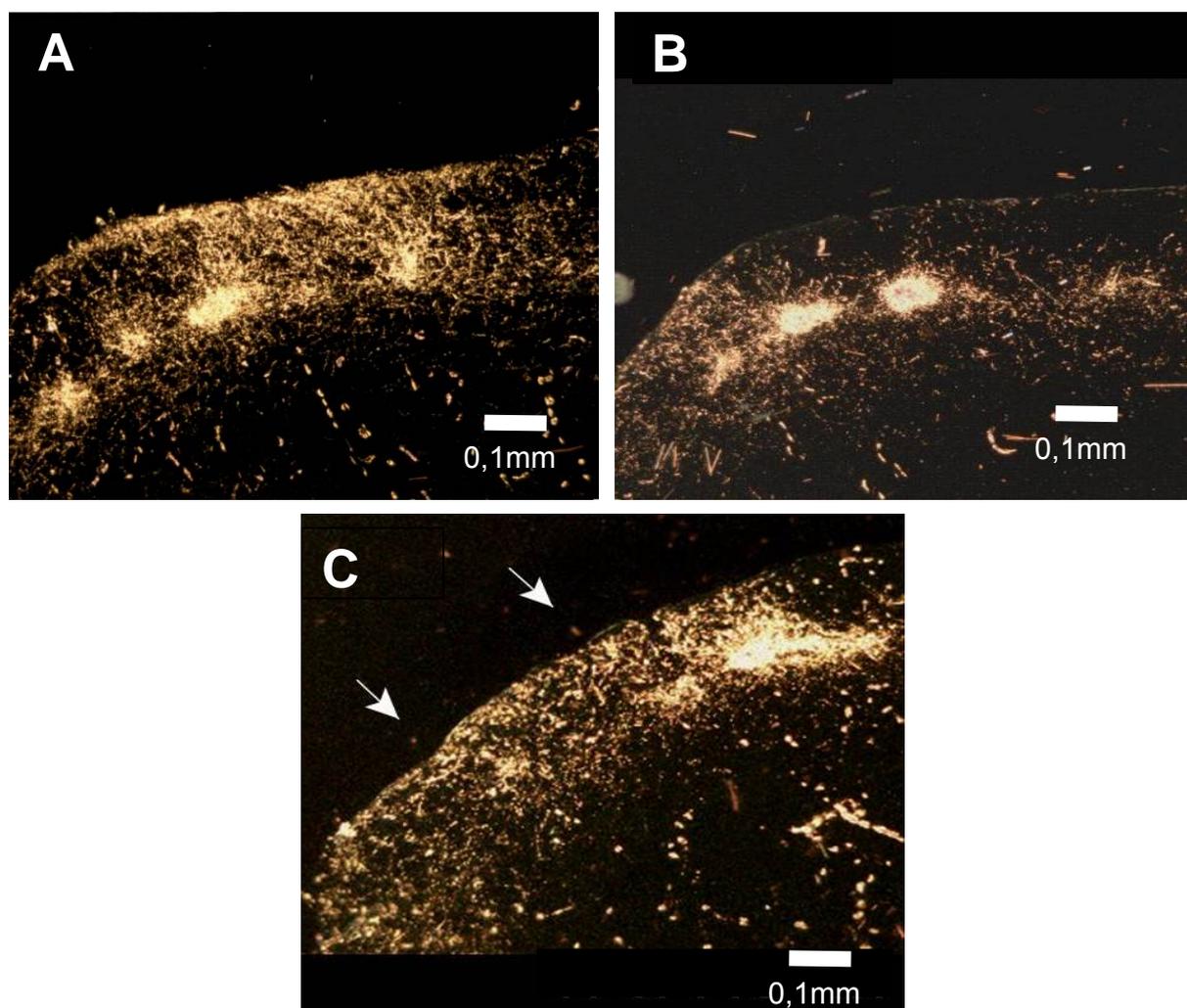


FIGURA 19. Fotomicrografia de campo escuro de cortes coronais do colículo superior em aumento de 100X evidenciando a reorganização induzida pela lesão dos axônios ipsolaterais na região superficial. (A) animais do grupo CT P14; (B) grupo RT P14; (C) grupo RT P10 / CT P10-P14. Notar o padrão bilaminar apresentado pelos animais do grupo CT em A, o qual padrão não aparece nos demais grupos. Escala 100 μ m.

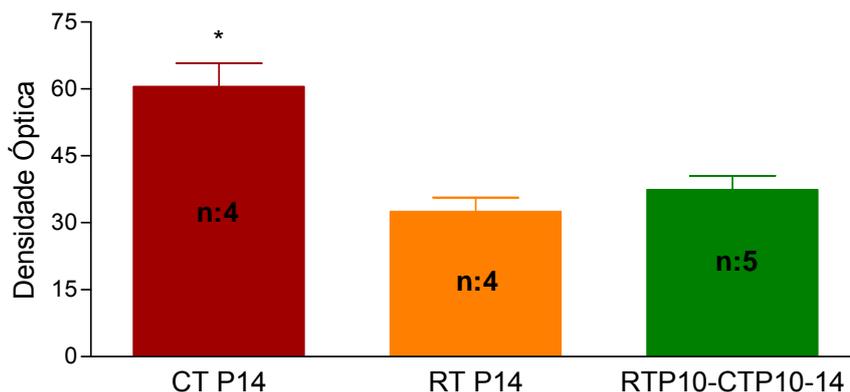


FIGURA 20. Densidade óptica de inervação superficial dos aferentes ipsolaterais na área denervada no colículo superior após lesão de retina temporal. Notar a densidade de marcação do grupo CT 14 que é diferente das outras duas colunas. Barra representa SEM. * $p < 0,05$.

Considerando que apenas quatro dias de realimentação com triptofano poderia ser pouco tempo para o sistema restaurar a plasticidade perdida com a carência desse aminoácido nos 10 dias antecedentes, foi desenvolvido outro experimento. Animais que tiveram a restrição de triptofano (RT) até a data da lesão de retina temporal (P10), foram realimentados com a ração CT desde P10 até P21.

Os animais RTP10/CTP10-21 apresentaram um aumento da densidade de inervação terminal, quando comparados com os animais que receberam somente a dieta RT até a mesma idade (P21). O padrão de marcação terminal das projeções dos animais RTP10/CTP10-21 mostrou-se compatível com o encontrado nos animais alimentados com a ração Nuvital® a partir do nascimento até P21. O grupo RTP10/CTP10-21 apresentou um padrão bi-laminar de marcação terminal, sugerindo que o déficit na reorganização dos axônios retinotectais, resultante da restrição neonatal de triptofano pode ser revertido após a re-introdução prolongada deste aminoácido, durante a segunda metade do período crítico (Fig. 21). A análise quantitativa da densidade óptica, nas camadas superficiais do colículo superior, do grupo RT (RT P10/CTP10-21 = $99,38 \pm 9,96$ n=6) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle Nuvital® (Controle P21 = $116,3 \pm 4,32$ n=4) (Fig. 22).

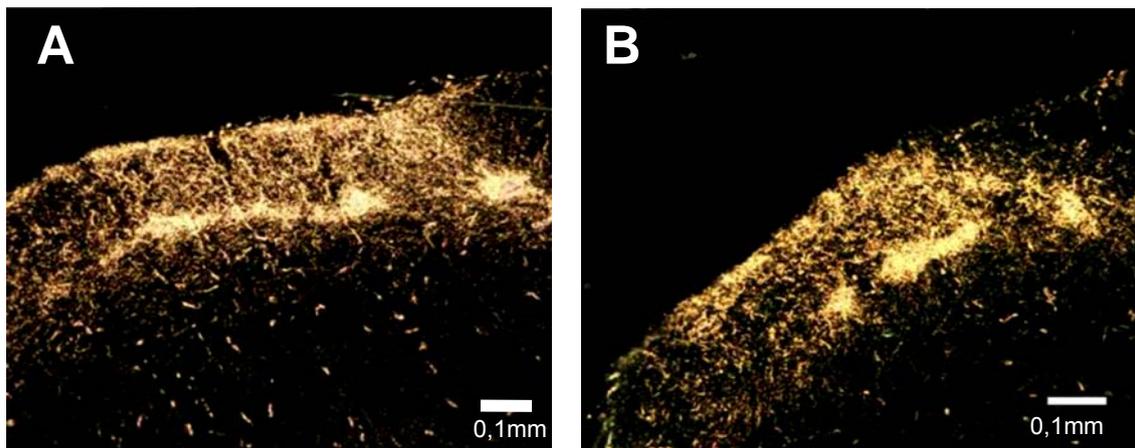


FIGURA 21. Fotomicrografias de cortes coronais do colículo superior, em campo escuro, com aumento de 100X, evidenciando a reorganização induzida pela lesão dos axônios ipsolaterais na região superficial. (A) animais alimentados com ração Nuvital® até P21; (B) grupo RTP10 /CT P10-P21;. Escala 100 μ m.

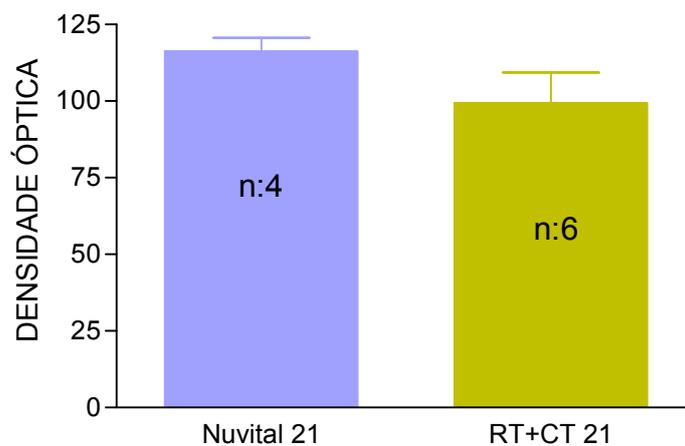


FIGURA 22. Análise de densidade óptica da marcação superficial na área de lesão do colículo superior. Os animais tratados não mostraram diferenças significativas em relação ao controle para $p > 0,05$.

Uma vez que o período crítico de desenvolvimento do sistema visual de roedores se estende até a terceira semana pós-natal, testamos a hipótese de que esse período possa influenciar a restauração da plasticidade dos axônios retinotectais pela re-introdução do triptofano. Para tal, estudamos no modelo de

lesão de retina (P10), um grupo de animais que recebeu a dieta RT do dia do nascimento até P28 (idade posterior ao fechamento do período crítico), e que foi alimentado com a ração CT entre P28 e P41 (Fig. 23 B). Após a sobrevivência adequada, os animais tiveram as projeções retinotectais ipsolaterais marcadas com HRP e a distribuição dos axônios superficiais comparada com a marcação de animais alimentados com a ração controle Nuvital® (Fig. 23 A). Este experimento mostrou que, ao contrário dos animais realimentados durante o período crítico, a reintrodução de triptofano tardia, após fechamento do período crítico, não restaura a perda de plasticidade causada pela dieta RT (Fig. 23 A, B). Dados quantitativos revelaram uma redução significativa na densidade óptica da marcação superficial nos animais experimentais (RTP28/CTP28-P41) em comparação aos animais controles (Nuvital® P41) (Fig. 24).

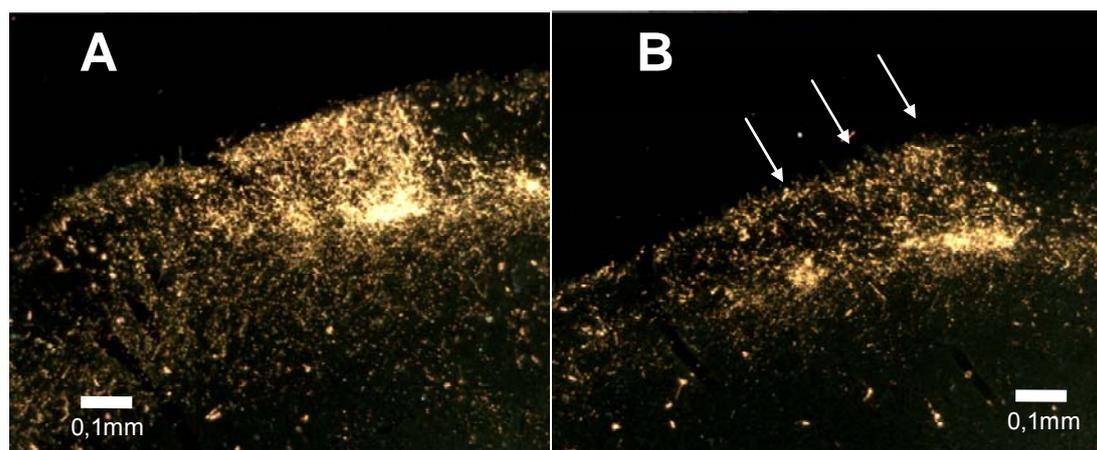


FIGURA 23. Fotomicrografias de campo escuro de cortes coronais do colículo superior, em campo escuro, com aumento de 100X; evidenciando a reorganização induzida pela lesão dos axônios ipsolaterais na região superficial. (A) animais alimentados com ração Nuvital® até P41; (B) grupo RTP28/CTP28-41. Escala 100 μ m. * $p < 0,05$

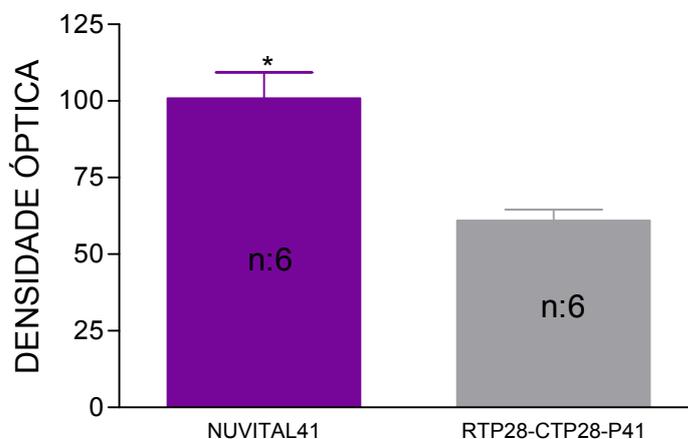


FIGURA 24. Análise de densidade óptica da marcação superficial na área de lesão do colículo superior. Os animais tratados com a dieta RT até P28 e CT de P28-P41 mostraram diferenças significativas em relação ao controle (Nuvital®) *: $p < 0.05$.

4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA METALOPROTEASE – 9 NO COLÍCULO SUPERIOR DE ANIMAIS ALIMENTADOS COM A DIETA CT OU RT

A reorganização topográfica, caracterizada pela arborização axonal para as regiões superficiais dos colículos superiores, no modelo de lesão de retina temporal pode ser influenciada por inúmeros fatores como moléculas de atração e repulsão, receptores NMDA, neurotransmissores, assim como da alteração da matriz extracelular (Oliveira-Silva *et al.*, 2007; Serfaty *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 1999; Cheng *et al.* 1992).

Já é consistente a evidência de que as MMPs regulam o crescimento axonal e estão envolvidas com interações de efrinas e seus receptores (Webber *et al.*, 2002). A atividade das metaloproteases está localizada nos cones de crescimento dos neurônios, e a inibição da atividade das MMPs reduz a motilidade dos cones de crescimento (Sheffield *et al.*, 1994). Baixos níveis de MMP-9 estão associados com baixa capacidade de regeneração de axônios do sistema nervoso central (Chernoff *et al.*, 2000).

Devido à intensa diminuição da plasticidade induzida pela lesão de retina temporal nos animais que receberam a dieta RT, avaliamos se essa dieta poderia estar modulando a atividade da metaloprotease-9 (também conhecida como gelatinase B, ou 92 kDa gelatinase/ colagenase tipo IV) no colículo superior.

As bandas formadas pela degradação da gelatinase-9 nos géis nos permitiu constatar uma redução na atividade da MMP-9 no colículo superior de animais que receberam a ração RT quando comparados com os animais que receberam a dieta CT até P14 (Fig. 25 A). A análise quantitativa das bandas apresentadas nos zimogramas mostrou que a diminuição na densidade óptica da marcação nos animais RT foi significativa (Fig. 25 B). Esse resultado sugeriu uma modulação nutricional, pela restrição na ingestão de triptofano, na degradação da matriz extracelular, pela atividade da MMP-9, o que pode ser associado a um dos fatores relacionados à menor plasticidade induzida nesses animais.

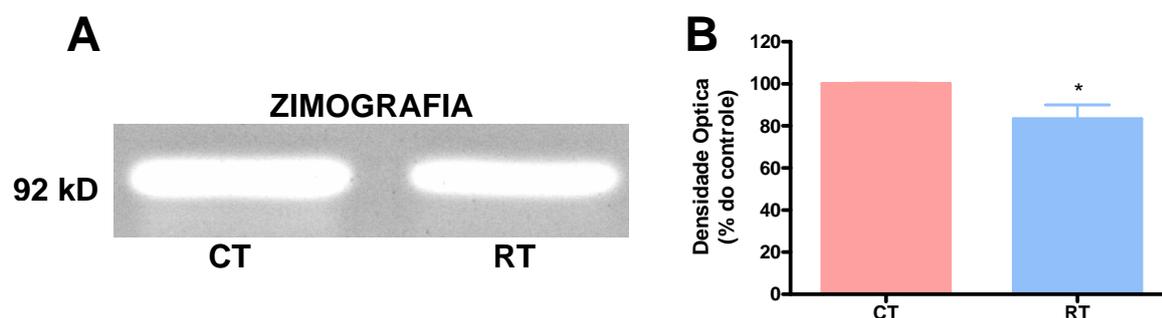


FIGURA 25. (A) Detecção da atividade enzimática da metaloprotease-9 no colículo superior dos animais que receberam dieta CT e RT até P14. (B) Quantificação da atividade da gelatinase MMP-9 pelo programa Scion Image, n=4 para todas as idades estudadas
* p<0,05.

4.6 EFEITO DA ENUCLEAÇÃO MONOCULAR NA ATIVIDADE DA METALOPROTEASE- 9 NO COLÍCULO SUPERIOR DE ANIMAIS QUE RECEBERAM DIETA CT OU RT

Enucleação monocular induz brotamento e reorganização de axônios intactos, não-lesados, da população ipsilateral no colículo superior contralateral a lesão (Lund & Bunt, 1976). Foi investigado se restrição nutricional de triptofano poderia alterar a resposta da atividade da MMP-9 no CS denervado no modelo de enucleação monocular dentro do período crítico do desenvolvimento. A fim de comparar a atividade enzimática da MMP-9 entre os animais que receberam a dieta CT e RT, traçamos um experimento onde os animais tiveram uma enucleação monocular em DPN10, em seguida sobrevivia de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas pós-lesão (Fig. 26).

Para cada animal o colículo ipsilateral ao olho enucleado foi usado como controle interno (CS controle = 100%), já que este colículo sofre uma denervação mínima provocada pela remoção de apenas 5% dos aferentes ipsolaterais retinianos. Por outro lado o CS contralateral à enucleação sofre uma denervação maciça (95% de suas aferências retinianas), capaz de induzir uma reorganização dos axônios intactos de projeção ipsilateral do olho remanescente. Tanto os CS controle quanto os CS deafferentados foram processados da mesma forma.

Zimogramas de colículos superiores controles e denervados pela enucleação monocular apontam uma flutuação semelhante quanto a atividade da MMP-9 nos dois grupos experimentais, RT e CT (Fig. 26).

A quantificação dos resultados, encontrados nos colículos superiores de animais CT, indicaram um aumento na atividade da MMP-9 significativo 6h após a remoção dos aferentes, seguido de uma diminuição da atividade 12h após a enucleação, que não foi significativa, com três consecutivos aumentos na atividade dessa gelatinase, 24, 48 e 72h após enucleação, dos quais aumentos apenas os referentes a 24 e 72h foram significativos nesse grupo (Fig. 27 A). No grupo RT, após o aumento significativo na atividade da MMP-9 6h após a remoção dos aferentes, também se observou uma diminuição, que neste grupo foi bastante acentuada, no tempo de 12h após a enucleação, seguido de dois aumentos

significativos, 24 e 48h após a lesão, e um aumento mais discreto, não significativo, 72h após a enucleação (Fig. 27 B).

Estes resultados sugerem que a atividade da MMP-9 além de ser regulada por alterações nutricionais no sistema serotoninérgico no desenvolvimento normal, pode ser modulada em modelos de plasticidade induzida por lesões.

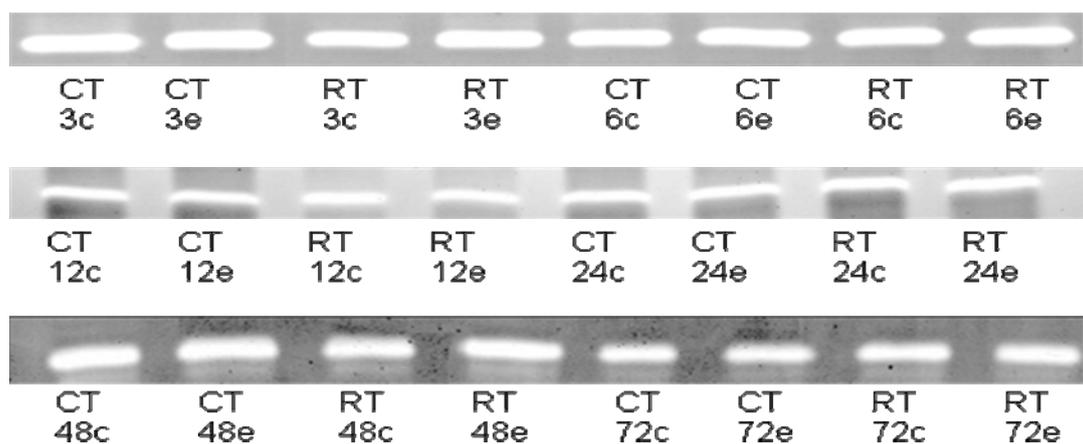


FIGURA 26- Detecção da atividade enzimática da metaloprotease-9 no CS de animais alimentados com as dietas CT e RT, que sofreram o processo de enucleação monocular no DPN10 e tiveram 3, 6, 12, 24, 48, 72 horas de sobrevivência.

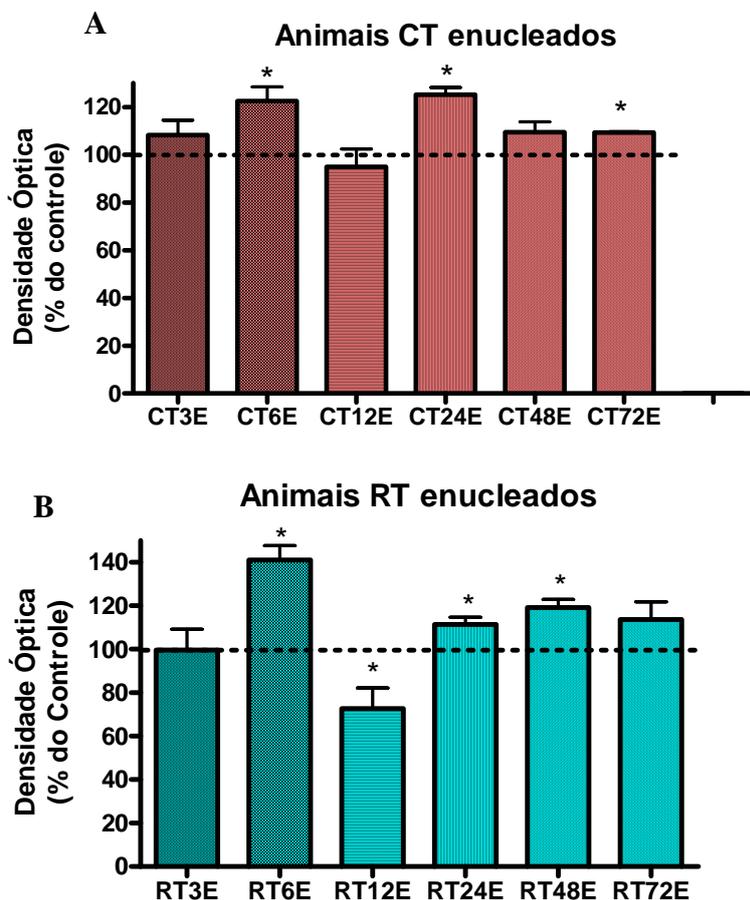


FIGURA 27 – Quantificação da atividade da MMP-9, nos CS de animais CT (A) e RT (B), apresentadas nas zimografias. Resultados analisados pelo programa Scion Image, considerando o colículo referente ao olho não enucleado como controle interno normalizado para 100% (linha pontilhada) n=6 para todas as idades. * p<0.05.

Ao comparar a variação na atividade da MMP-9, causada pela enucleação monocular, entre os grupos RT e CT detectamos diferenças significativas 12 e 24h após a enucleação, quando a atividade desta gelatinase é maior nos animais que receberam a dieta CT comparados com os animais que receberam a dieta RT. Esses dados nos permitem relacionar a atividade da metaloproteinase-9 com os resultados neuroanatômicos nos quais a lesão de retina temporal gera uma maior reorganização axonal para superfície nos animais CT quando comparados com os RT; uma vez que essa reorganização axonal depende do remodelamento de matriz extracelular, uma maior atividade da MMP-9 nos colículos dos animais CT pode refletir em uma maior degradação de matriz sendo então um fator facilitador do rearranjo axonal (Fig. 28).

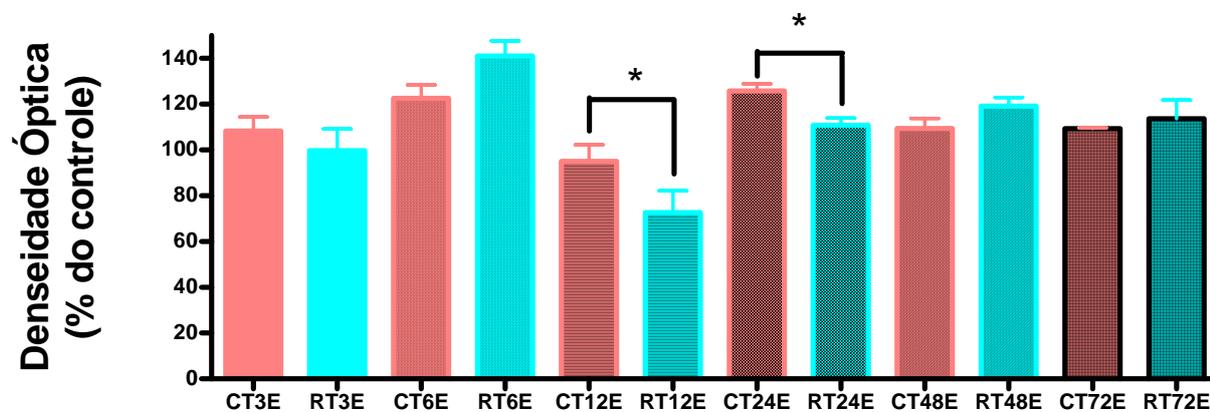


FIGURA 28- Comparação da atividade da MMP-9 nos colículos enucleados entre os grupos CT e RT, nas diferentes horas após a lesão, através quantificação dos zimogramas pelo programa Scion Image. * $p < 0.05$.

5 DISCUSSÃO

Existem evidências de que a má nutrição pode induzir alterações morfológicas e funcionais no desenvolvimento do cérebro, influenciando a neurogenese, a migração celular, a diferenciação celular, ou ainda no aumento da morte celular. A restrição protéica pode, ainda, influenciar a sinaptogênese, e a síntese de neurotransmissores. De acordo com o estágio do desenvolvimento, essas alterações podem ter proporções diferenciadas (Morgane *et al.*, 1993; Levitsky & Strupp, 1995).

Diversos estudos, ao avaliar o impacto causado pela desnutrição sobre o sistema nervoso em desenvolvimento, mostram, tanto em humanos como em animais de laboratório, que a deficiência protéica retarda processos de divisão celular e mielinização, diminui os níveis de ácidos nucléicos e proteínas (Guedes & Priess, 1997), altera diretamente a distribuição plasmática e hepática de aminoácidos (Colombo *et al.*, 1992) e conseqüentemente pode afetar os sistemas de neurotransmissores como dopamina, norepinefrina e serotonina (Soto-Moyano *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1997).

O presente estudo demonstrou o efeito da restrição nutricional de triptofano desde a fase do aleitamento. Os resultados mostram uma severa redução na capacidade de reorganização do SNC que pode ser revertida pela reintrodução do triptofano, ainda durante o período crítico do desenvolvimento. Este aminoácido essencial é precursor da síntese de serotonina, neurotransmissor amplamente distribuído no sistema nervoso central.

A serotonina é expressa precocemente no sistema nervoso estando diretamente envolvida nas vias de desenvolvimento neural (Lesch *et al.*, 1997). No adulto, 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.*, 2004) além de outros mensageiros químicos. Portanto, a deficiência deste neurotransmissor pode alterar diversos processos do desenvolvimento e da plasticidade sináptica e está associada a várias doenças de comportamento como esquizofrenia, ansiedade, estresse, alcoolismo, depressão, doença de Alzheimer, entre outras (Galter & Unsicker, 2000). A serotonina influencia ainda distúrbios alimentares como a hiperfagia (bulimia), a compulsão por carboidratos e gorduras, e também hipofagia (anorexia), que são tratados com drogas que regulam os níveis de serotonina na fenda sináptica.

5.1 INFLUÊNCIA DAS DIETAS NO GANHO PONDERAL

Estudos têm demonstrado que um dos principais sinais clínicos de desnutrição protéico-calórica é o retardo na maturação somática. Para este diagnóstico, em roedores, além do ganho ponderal existem os parâmetros de abertura dos olhos, erupção dos dentes incisivos e abertura do pavilhão auditivo (Almeida *et al.*, 2002; Jensen & Binkley, 2002), os quais não foram diferentes em animais tratados com a dieta CT ou RT (González *et al.*, 2008). Assim, no presente estudo, a diferença no ganho ponderal, entre os animais que receberam a ração RT e CT, (Fig. 11) apesar de significativa, não pode ser relacionada com retardo de desenvolvimento normal, pois os sinais de maturação somática foram constatados em idades normais. Dados da literatura têm relacionado o consumo de dietas a base de milho com diminuição plasmática do hormônio do crescimento (GH) associado a um importante déficit ponderal (Del Angel-Meza *et al.*, 2001). Outro estudo demonstrou que a serotonina e seus receptores alteram a liberação de GH em roedores (Conway *et al.*, 1990). Trabalhos já têm destacado a relevância da restrição nutricional de triptofano, como modelo não-farmacológico de redução dos níveis de serotonina (Fadda *et al.*, 2000).

No presente estudo, demonstramos ainda que os animais que receberam a ração RT até dez dias de vida e a ração CT nos onze dias seguintes obtiveram um incremento no ganho ponderal quando comparados ao grupo que permaneceu deficiente em triptofano durante o mesmo período (21 dias), demonstrando que o

atraso de ganho de peso causado pela dieta RT pode ser revertido pela re-introdução de triptofano pela dieta CT (Fig.13).

5.2 EFEITO DA RESTRIÇÃO DE TRIPTOFANO SOBRE OS NEURÔNIOS SEROTONINÉRGICOS DOS NÚCLEOS DA RAPE

Neurônios serotoninérgicos surgem dos núcleos da rafe, projetam-se para o hipocampo, córtex, cerebelo e tronco cerebral, o que sugere sua participação em vários processos fisiológicos. Essas regiões participam de várias funções cognitivas assim como o controle do humor e da coordenação motora e sensorial (Ohashi *et al.*, 2003). A serotonina, portanto, está associada a várias doenças de comportamento como a esquizofrenia, o alcoolismo, dependência química, depressão, Alzheimer, demência, entre outras (Galter & Unsicker, 2000).

Nesse trabalho trazemos evidências de que a menor plasticidade resultante da lesão de retina temporal, em animais restritos de triptofano até o décimo quarto dia pós-natal, está correlacionada com uma diminuição no número de células serotoninérgicas dos núcleos ventrais e dorsais da rafe (Fig. 12 e 13), o que está de acordo com dados da literatura (Orozco-Suarez *et al.*, 2003).

Estudos têm demonstrado que a suplementação com L-triptofano é capaz de aumentar os níveis de serotonina no sistema nervoso central de ratos alimentados com fórmulas deficientes neste aminoácido, o que indica uma possível modulação dos níveis desse neurotransmissor pela dieta (Sarwar & Botting, 1999).

A serotonina, como já descrito, é essencial para o desenvolvimento de neurônios tal como neurogênese, apoptose, arborização de axônios e dendritogênese. A depleção de moléculas envolvidas no metabolismo, ou no transporte de 5-HT afeta a maturação dendrítica durante o desenvolvimento de camundongos (Gaspar *et al.*, 2003).

Pesquisas feitas com modelos de dietas isocalóricas e hipoproteicas baseadas em milho para induzir depressão de serotonina no sistema nervoso central em roedores têm demonstrado que essas dietas além de reduzirem a síntese de serotonina provocam uma significativa diminuição no total de células serotoninérgicas nos núcleos da rafe (Orozco-Suarez *et al.*, 2003).

5.3 RESTRIÇÃO NUTRICIONAL DE TRIPTOFANO MODULANDO O TRANSPORTADOR DE SERONONINA (SERT)

A disponibilidade da serotonina na fenda sináptica, e suas inúmeras funções são controlados pelo funcionamento do transportador proteico de membrana pré-sináptica (SERT), que está extensamente distribuído por todo cérebro, principalmente no tronco cerebral e córtex (Peremans *et al.*, 2006).

O SERT é responsável por remover a serotonina da fenda sináptica para o interior do neurônio serotoninérgico. Drogas antidepressivas, usadas em tratamentos de doenças como a ansiedade, a depressão e as desordens obsessivo-compulsivas, bloqueiam o SERT, aumentando a concentração de serotonina na fenda sináptica (Launay *et al.*, 2006).

Estudos em nosso laboratório têm demonstrado, através do tratamento com fluoxetina, que o aumento da disponibilidade de serotonina facilita a reorganização topográfica de áreas denervadas do colículo superior por lesão de retina temporal, mesmo em fases avançadas do desenvolvimento quando este tipo de reorganização axonal é limitada (Bastos *et al.*, 1999).

Os nossos resultados mostraram uma menor imunorreatividade para células serotoninérgicas nos animais alimentados com a dieta RT. Assim, avaliamos a possibilidade da restrição nutricional de triptofano estar também alterando a expressão do transportador de serotonina. Detectamos então, um aumento na expressão de SERT nos colículos superiores dos animais que receberam a dieta RT comparados com os alimentados com a CT, sugerindo uma maior presença desse transportador em resposta a deficiência de serotonina (Fig. 15 e 16). Estes resultados indicam que o aumento do SERT seja uma resposta compensatória para aperfeiçoar a captação de serotonina em condições de restrição nutricional de triptofano.

Com isso, no nosso modelo de estudo, observamos uma intensa expressão do SERT associada a uma diminuição da plasticidade retinotectal nos animais restritos de triptofano, o que está totalmente de acordo com a situação observada após o bloqueio do SERT com fluoxetina (Bastos *et al.*, 1999). Dados da literatura

também corroboram esses nossos resultados ao demonstrar que durante a diferenciação serotoninérgica, o aumento de serotonina extracelular exerce uma resposta negativa no sítio funcional do transportador de serotonina, o que diminui a velocidade do transporte pelo SERT (Launay *et al.*, 2006).

5.4 SEROTONINA E LTP

Como anteriormente descrito, a deficiência de serotonina pode alterar vários processos na formação do sistema nervoso central, assim como a plasticidade sináptica. A potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) são fenômenos gerados a partir da eficiência 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; Volgushev *et al.*, 1994; Lo & Mize, 2000). Enquanto a LTP, durante o desenvolvimento cerebral, fortalece e estabiliza as sinapses, a LTD leva a um enfraquecimento e eventual eliminação sináptica (Konnerth & Eilers, 1994; Crair *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 2000). Os fenômenos de LTP e LTD estão totalmente correlacionados com o aprendizado e memória. A depleção de triptofano pode afetar a atuação da memória de longa duração, assim como mudanças bruscas de humor (Riedel *et al.*, 1999). Isso foi consolidado com um experimento onde, 6 horas após a ingestão de uma bebida com triptofano, uma informação era passada aos grupos experimentais: os que receberam um placebo esqueciam mais rapidamente a informação, durante as 24 horas seguintes, comparados ao grupo que recebia a bebida com triptofano (Riedel *et al.*, 1998). A literatura já apresentou a relevância da serotonina na regulação do desenvolvimento da LTP no córtex visual primário de roedores. Ainda durante o desenvolvimento, dentro do período crítico, foi detectada uma progressiva diminuição da LTP no córtex visual, associada a um aumento dos níveis de serotonina extracelular, com o passar do tempo (Edagawa *et al.*, 2001). Por outro lado, Ohashi demonstrou, que em situações de perda da arborização serotoninérgica, em um modelo de lesão cerebral, ocorre diminuição da plasticidade sináptica de curta duração, com aumento da LTP (Ohashi *et al.*, 2003). Neste

estudo, sugerimos que a redução da serotonina através da restrição de triptofano possa estar aumentando a eficácia sináptica (via aumento da LTP) e, portanto, a estabilização de axônios retinotectais.

5.5 RESTRIÇÃO NUTRICIONAL DE TRIPTOFANO NA EXPRESSÃO DE pERK

Como já descrito, dois subtipos de receptores para serotonina foram isolados nas camadas visuais do colículo superior de roedores: o receptor 5-HT_{1A}, localizado nos terminais pós-sinápticos e o receptor 5-HT_{1B}, encontrado em aferentes pré-sinápticos oriundos de células ganglionares da retina (Mooney *et al.*, 1996). Postula-se que receptores do subtipo 5-HT_{1B} inibam, a transmissão retinotectal em anfíbios (Malayev & Debski, 1998) e roedores (Mooney *et al.*, 1994; Mooney *et al.*, 1996) enquanto receptores do subtipo 5-HT_{1A} afetam a atividade das células coliculares (Mooney *et al.*, 1996; Butt *et al.*, 2002). Ambos os receptores, acoplados a proteína-G, modulam negativamente a atividade da enzima adenilil ciclase, inibindo então a síntese de AMPc (Hwang & Dun, 1999; Raymond *et al.*, 2001; Yuen *et al.*, 2005).

Como já consolidado, a ERK pode fosforilar vários substratos, com isso regula numerosas funções celulares, tais como a expressão gênica, o metabolismo e a morfologia celular. Conseqüentemente, as vias de sinalização das ERK têm um importante papel para o destino celular, sinalizando para diversos eventos, tais como a proliferação, a diferenciação, a morte e a sobrevivência de neurônios (Dumaz & Marais, 2005).

Serotonina, modulando a síntese AMPc, como também a regulação indireta das vias das ERKs (Cowen, 2007). Resultados de eletrofisiologia demonstraram que a ativação do receptor 5-HT_{1A} causa supressão da atividade da CaMKII e da ERK por inibição da PKA (Yuen *et al.*, 2005). Chen e colaboradores, apresentaram agonistas do receptor 5-HT_{1A} induzindo uma diminuição dos níveis de pERK, no hipocampo (Chen *et al.*, 2002).

No córtex visual primário de roedores, a LTP é inibida via receptor 5HT_{1A} (Edagawa *et al.*, 1998), o que indica uma maior estabilidade das conexões retinotectais em sistemas com maiores níveis desse subtipo de receptor ativado. O efeito oposto foi observado nesse estudo, onde animais RT apresentaram uma

maior estabilidade sináptica em um sistema com níveis reduzidos de serotonina. Considerando a relevância da atividade da pERK na indução de LTP no córtex (Toyoda *et al.*, 2007) novamente podemos associar nossos resultados de menor reorganização axonal, com o aumento da expressão da pERK, observada nos animais RT (Fig. 17).

Os maiores níveis de AMPc, encontrados nos animais alimentados com a dieta RT, podem resultar em um aumento da estabilidade de conexões previamente estabelecidas, o que dificultaria o crescimento axonal em direção a novos sítios pós-sinápticos, como sugere o presente estudo (González *et al.*, 2008). A síntese de AMPc, e então a ativação da PKA, ativa a via de sinalização das MAPK (Toyoda *et al.*, 2007). Essa cascata de ativação vai de acordo com os nossos resultados, que mostraram, nos animais RT, um aumento da expressão da pERK .

Dados da literatura já apresentam inibidores da recaptação de serotonina induzindo neuroplasticidade, por aumento indireto da expressão de fatores de crescimento, que modulam vias das ERK e AKT (Cowen, 2007), o que corrobora novamente com os resultados apresentados no presente estudo, os quais mostram um aumento da expressão do SERT, associada a uma maior expressão da pERK e uma plasticidade reduzida.

5.6 PAPEL DA SEROTONINA NO REFINAMENTO TOPOGRÁFICO E PLASTICIDADE: MODELO DE RESTRIÇÃO NUTRICIONAL

Bastos e colaboradores, em 1999, destacaram a importância dos níveis extracelulares de serotonina com a plasticidade retinotectal, ao demonstrar uma resposta plástica mais intensa, no colículo superior de animais que tiveram um aumento da disponibilidade desse neurotransmissor, através da administração farmacológica de fluoxetina (Bastos *et al.*, 1999). O nosso grupo também demonstrou recentemente que a restrição nutricional de triptofano gera um atraso na eliminação de axônios transitórios no colículo superior (González *et al.*, 2008)

Estudos do nosso laboratório corroboram a hipótese de que a redução da eficácia da transmissão sináptica retinotectal é um fator essencial para a facilitação

da reorganização de axônios intactos sobre áreas denervadas no colículo superior após lesão da retina contralateral (Serfaty *et al.*, 2005).

Campelo-Costa e colaboradores demonstraram que o bloqueio da síntese de óxido nítrico ou ácido araquidônico, favorece a indução de plasticidade retinotectal (Campello-Costa *et al.*, 2000). Tais mensageiros retrógrados estão associados à indução de LTP, e então ao aumento da estabilidade de conexões retinotectais (Arancio *et al.*, 1995; Schmidt, 2004). Esses dados sugerem que a redução da expressão de LTP no colículo superior facilite a desestabilização de sinapses e conseqüente brotamento de conexões e sinapses retinotectais após lesão de retina temporal, conforme proposto por Lo e Mize em 2000 (Lo & Mize, 2000).

Os efeitos da depleção de 5-HT na plasticidade dos circuitos cerebrais podem justificar os resultados encontrados no nosso trabalho, visto que a depleção de serotonina, causada pela restrição de triptofano na dieta, gerou uma redução reversível do efeito plástico de axônios intactos no modelo de lesão de retina temporal. Fibras e terminais se apresentaram esparsos no sítio da lesão com uma nítida redução do crescimento de axônios/terminais, para a região subpial, impedindo então a formação do característico padrão bi-laminar observado nos animais controle, que recebiam triptofano na recomendação adequada. Este efeito foi constatado em animais que receberam a dieta RT desde o nascimento, através da amamentação até diferentes idades (P14, P21 e P42), que tiveram lesão de retina em P10. Nestas idades os axônios intactos responderam com modificações plásticas exuberantes tanto em grupos alimentados com a dieta CT quanto animais alimentados com ração padrão para roedores. A redução do potencial plástico induzida pela diminuição de serotonina disponível pode ser correlacionada com outros dados já comprovados na literatura, como um estudo que mostrou um retardo na maturação do córtex cerebelar causado por baixos níveis de serotonina nesta região (Gonzalez-Burgos *et al.*, 2001).

A serotonina modula o desenvolvimento e a plasticidade do SNC através da liberação do fator trófico glial S-100 β , que promove o crescimento dos próprios neurônios serotoninérgicos. Em adultos foi mostrado que a depleção de 5-HT pela administração de PCPA produziu uma significativa retração glial (Ramos *et al.*, 2004).

A interrupção do desenvolvimento serotoninérgico pode causar alterações permanentes no funcionamento do cérebro e no comportamento. O cérebro tende a eliminar conexões e células redundantes ou inúteis durante o processo de desenvolvimento, e por estar presente desde etapas precoces, a serotonina é considerada peça chave para este refinamento. Portanto a serotonina juntamente com o S-100 β e BDNF têm importantes funções nos fenômenos de neurogênese, remoção neuronal, refinamento dendrítico, remodelamento sináptico, além de manutenção e migração celular. Muitos efeitos do S-100 β estão associados com o remodelamento do citoesqueleto, este fator interage com a estabilização de microtúbulos associados às MAPs (proteínas associadas à microtúbulos) possibilitando a inibição da fosforilação. A fosforilação da proteína associada ao crescimento neuronal (GAP-43) é também inibida por S-100 β permitindo aumento do crescimento e da plasticidade dos neurônios, uma vez que o estado desfosforilado da GAP-43 está relacionado com a mobilidade dos cones de crescimento. S-100 β também influencia a consolidação de memória (Whitaker-Azmitia, 2001).

O BDNF melhora o processo de fortalecimento sináptico por aumentar os níveis da potenciação de longa duração (LTP). A atuação do fator trófico BDNF deve ser o mecanismo chave onde a sinalização cognitiva, exercício, restrição dietética e drogas antidepressivas preservam o cérebro durante os anos. Manipulações comportamentais e farmacológicas que melhoram a sinalização de BDNF e serotonina poderiam ajudar na promoção de um cérebro saudável na senilidade (Mattson *et al.*, 2004). Um estudo demonstrou que camundongos sem BDNF apresentam menor imunorreatividade para serotonina (Djalali *et al.*, 2005).

Dong Ryulu e colaboradores evidenciaram que camundongos adultos alimentados durante duas semanas com uma dieta pobre em triptofano, baseada em milho e caseína, tiveram significativa redução nos níveis de NGF no hipocampo e de BDNF no córtex cerebral (Lee *et al.*, 1999).

Estudos *in vivo* têm indicado que BDNF promove crescimento e sobrevivência de axônios serotoninérgicos maduros. Eles sugerem que a serotonina atue nos receptores 5-HT_{1A} causando aumento da regulação de BDNF (Galter & Unsicker, 2000). Portanto, postula-se que a diminuição de neurotrofinas pode estar

relacionada aos resultados do nosso estudo quanto à redução da resposta plástica induzida nos animais RT.

A fim de analisar se o déficit de plasticidade, induzido pela restrição nutricional seria definitivo, avaliamos no modelo de lesão de retina, um grupo experimental de animais alimentados com ração RT do nascimento até P10 e complementados com triptofano através da dieta CT por quatro dias. Os resultados mostraram uma resposta parcial do sistema ao aumento dos níveis de serotonina, mas abaixo da plasticidade observada nos grupos controles (Fig. 13). Entretanto, ao disponibilizar um maior tempo de complementação com triptofano (entre P10 e P21) com a dieta CT, o padrão de marcação terminal se apresentou condizente com o observado nos animais alimentados somente com ração padrão Nuvital® até a mesma idade, apesar do déficit ponderal que foi ainda observado no grupo RT-CT P10-21. Isso sugere que o déficit ponderal por si só não seja um fator limitante para a plasticidade do SNC.

As projeções retinotectais de roedores se desenvolvem dentro de uma janela temporal que compreende as duas/três primeiras semanas pós-natal. Um animal P10, apesar de não ter aberto os olhos, apresenta uma distribuição das fibras retinotectais ipsolaterais semelhante ao observado em animais adultos (Serfaty & Linden, 1994). Além disso, outros estudos já demonstraram que é possível induzir uma resposta plástica rápida dos axônios retinianos após lesões localizadas de retina contralateral (Serfaty *et al.*, 2005) ou ainda após a enucleação monocular (Lund *et al.*, 1980).

A reintrodução de triptofano após o fechamento do período crítico de desenvolvimento do SNC, (após P28 para roedores) não restaura o déficit de plasticidade nos animais alimentados com a dieta RT até a data da lesão de retina (P10). O que nos permite evidenciar a importância dessa janela temporal para respostas plásticas, e o papel da ingestão de triptofano no desenvolvimento uso-dependente das conexões visuais.

5.7 ATIVIDADE DA METALOPTOTEASE-9 NA RESTRIÇÃO NUTRICIONAL NUTRICIONAL DE TRIPTOFANO

A serotonina altera moléculas da matriz extracelular das células e influencia a formação dos contatos sinápticos. O receptor 5-HT_{1A} auxilia na estabilidade do citoesqueleto e resulta em diferenciação neuronal. A serotonina tem um papel direto na regulação e manutenção de microtúbulos e microfilamentos (Azmitia, 2001).

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento, existe uma alta detecção de MMP-9, que é seguida por uma significativa diminuição, à medida que essa estrutura se torna madura. O curso temporal dessa modulação acontece dentro do período crítico do desenvolvimento do sistema visual, na primeira e segundas semanas pós-natais (Oliveira-Silva *et al.*, 2007). Acredita-se que a MMP-9 possa estar envolvida em vários processos do desenvolvimento incluindo a eliminação seletiva de axônios e formação de sinapses, essencial para o ajuste fino dessas conexões (Sternlicht & Werb, 2001; Szklarczyk *et al.*, 2002; Mott & Werb, 2004).

A proteólise da matriz extracelular (MEC) é importante em processos de plasticidade funcional e estrutural. Metaloproteases na sua forma ativa, por exemplo, induzem a uma clivagem de moléculas da MEC, resultando no processamento e/ou liberação dos ligantes que sinalizam através de receptores de superfície celular, e assim disparam cascatas intracelulares de sinalização. Outra função das MMPs seria a participação em processos fisiológicos remodelando o microambiente pericelular via clivagem de moléculas de adesão ou componentes da matriz extracelular que mantêm a citoarquitetura do tecido (Sternlicht & Werb, 2001; Mott & Werb, 2004).

Esses achados podem ser correlacionados com os resultados do presente estudo, onde a redução da plasticidade deve estar associada a alterações na MEC, via atuação de metaloproteases de matriz extracelular, reduzindo a permissividade ao crescimento axonal. A restrição de triptofano na dieta e a redução dos níveis de serotonina no sistema, podem estar de alguma forma impedindo a mudança na conformação do citoesqueleto celular, o que dificulta a alteração da arborização axonal gerada pela plasticidade neuronal induzida pelo efeito da lesão de retina.

Conforme a importância da MMPs na plasticidade sináptica, investigamos a atividade da gelatinase-9 no nosso modelo de restrição nutricional, e constatamos que a deficiência de reorganização axonal, presente nos animais alimentados com a dieta RT até P14, foi acompanhada de uma menor atividade da MMP-9 no colículo superior, quando comparados com os animais controles que receberam a dieta CT até a mesma idade (Fig. 25). Nossos resultados são coerentes com dados da literatura uma vez que o remodelamento das conexões neurais é totalmente dependente de degradação de matriz extracelular (Szklarczyk *et al.*, 2002).

A enucleação monocular, assim como lesões parciais de retina tem sido utilizados como modelo de reorganização plástica no SNC por induzir brotamento e reorganização dos axônios intactos pertencentes a população de axônios ipsolaterais (não lesados) no colículo superior (Lund *et al.*, 1980; Serfaty *et al.*, 2005). Estudamos uma possível modulação da restrição nutricional de triptofano sobre o efeito da enucleação monocular na expressão e atividade da MMP-9 nas camadas visuais do colículo superior. Encontramos, nos dois grupos de dietas estudados, o mesmo perfil de variação da atividade desta gelatinase, em diferentes períodos após a lesão (Fig. 26 e 27). Esses dados estão de acordo com os descritos por Szklarczyk e colaboradores (2002) que identificaram, após uma lesão induzida por cainato no hipocampo, uma regulação para cima da expressão e atividade da MMP-9 com um padrão de curso temporal similar ao que encontramos no colículo superior (Szklarczyk *et al.*, 2002). Nossos resultados também se confirmam por outros do nosso grupo que mostraram, após lesão de retina temporal no dia pós-natal 10, uma indução de brotamento dos terminais axonais nas camadas superficiais do CS observadas 24 horas pós-lesão (Serfaty *et al.*, 2005). Em conjunto, os resultados nos sugerem que em fases precoces após lesões, a MMP-9 atue como um fator indutor da quebra de moléculas inibitórias ao crescimento axonal, permitindo dessa forma, que axônios intactos brotem dentro da área denervada nas camadas visuais do colículo superior.

Ao comparar as variações da atividade da MMP-9 entre os nossos grupos foi significativamente evidente uma menor atividade da MMP-9, 12 e 24 horas após lesão nos colículos de animais alimentados com a dieta RT, quando comparados com os animais que receberam a dieta CT, o que está novamente corroborando com

o deficit de plasticidade induzida nos animais RT, uma vez que o procedimento de enucleação monocular mimetiza de forma mais expressiva a lesão de retina temporal. (Fig. 28)

Portanto, acreditamos que a restrição nutricional de triptofano, e a menor disponibilidade de serotonina podem alterar a proteólise de moléculas da MEC, pela modulação da atividade da MMP-9 no colículo superior no seu papel permissivo/indutor do remodelamento axonal induzida pela deafferentação.

Os dados apresentados neste estudo levantam um importante questionamento sobre a utilização em políticas públicas de saúde, notadamente na alimentação de crianças em comunidades carentes, de suplementos alimentares como a multimistura, que apresenta deficiência em triptofano na sua composição (Câmara & Madruga, 2000). Os resultados de González *et al*, 2008, e os apresentados nesta dissertação mostram que a alimentação com dietas deficientes em triptofano pode retardar ou causar danos permanentes na capacidade de reorganização do sistema nervoso central, com possíveis implicações sobre o desenvolvimento sensório-motor ou cognitivo.

6 CONCLUSÃO

Este estudo correlacionou os fatores neuroquímicos associados à restrição nutricional de triptofano, sobre a capacidade de reorganização plástica no sistema visual (Fig. 29). Como principais conclusões podemos destacar:

- A deficiência nutricional de triptofano gera uma acentuada redução na no número de células serotoninérgicas nos núcleos da rafe.
- A depleção de serotonina aumenta a expressão do transportador (SERT).
- O numero reduzido de células serotoninérgicas nos animais RT foi correlacionado com uma menor capacidade de reorganização plástica de axônios visuais em um modelo de deaferentação parcial do território alvo.
- A redução da plasticidade pode ser revertida através da re-introdução de triptofano na dieta ainda durante o período crítico, sendo esta reversão dependente da fase de desenvolvimento dos circuitos neurais.
- A reintrodução deste aminoácido após o encerramento do período crítico não foi capaz de reverter a redução de plasticidade no modelo de lesão de retina temporal.
- A deficiência de plasticidade observada nos animais RT pode ter como um dos fatores causadores o aumento dos níveis de AMPc, e aumento da fosforilação da ERK, o que pode estar gerando uma maior estabilidade e menor plasticidade.
- A atividade da MMP-9, foi menor no modelo de restrição nutricional de triptofano.
- A restrição de triptofano reduz a atividade da MMP-9, no colículo superior, 12 e 24h após uma enucleação monocular.

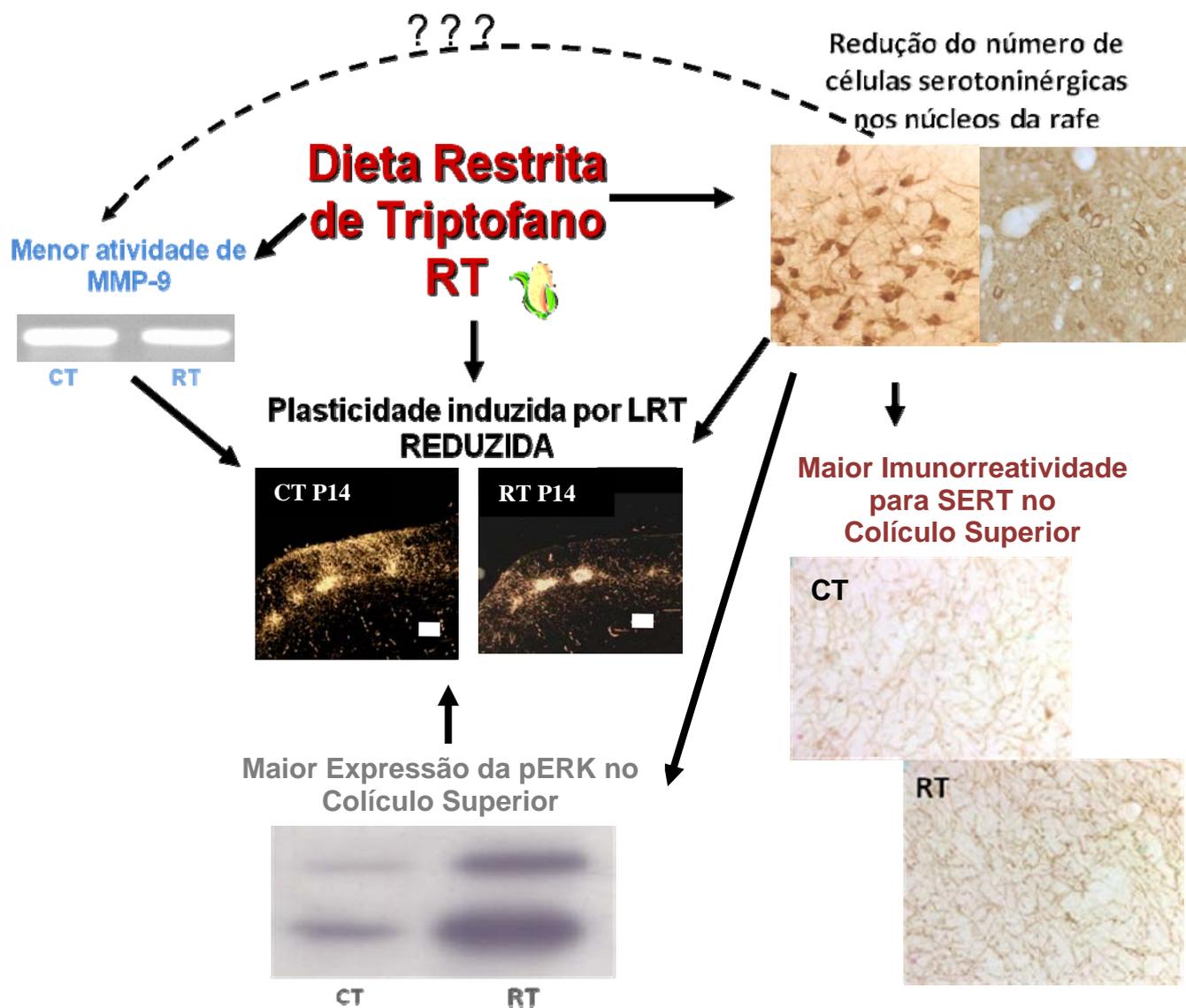


FIGURA 29- Esquema demonstrativo da conclusão dos resultados.

7. Referências Bibliográficas

- ADELL, A., CELADA, P., ABELLAN, M. T. & ARTIGAS, F. (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* 39, 154-180.
- ALMEIDA, S. S., DUNTAS, L. H., DYE, L., NUNES, M. L., PRASAD, C., ROCHA, J. B., WAINWRIGHT, P., ZAIA, C. T. & GUEDES, R. C. (2002). Nutrition and brain function: a multidisciplinary virtual symposium. *Nutr Neurosci* 5, 311-320.
- ANTON, E. S., KREIDBERG, J. A. & RAKIC, P. (1999). Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22, 277-289.
- ARANCIO, O., KANDEL, E. R. & HAWKINS, R. D. (1995). Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 376, 74-80.
- ARANEDA, R. & ANDRADE, R. (1991). 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40, 399-412.
- ARCE, E. A., BENNETT-CLARKE, C. A., MOONEY, R. D. & RHOADES, R. W. (1992). Synaptic organization of the serotonergic input to the superficial gray layer of the hamster's superior colliculus. *Synapse* 11, 67-75.
- ARJONA, A. A., POOLER, A. M., LEE, R. K. & WURTMAN, R. J. (2002). Effect of a 5-HT_{2C} serotonin agonist, dexnorfenfluramine, on amyloid precursor protein metabolism in guinea pigs. *Brain Res* 951, 135-140.
- AZMITIA, E. C. (1999). Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 21, 33S-45S.
- AZMITIA, E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* 56, 413-424.
- AZMITIA, E. C., GANNON, P. J., KHECK, N. M. & WHITAKER-AZMITIA, P. M. (1996). Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* 14, 35-46.
- BALLABRIGA, A. (1990). [Life style, environment and childhood diseases]. *An Esp Pediatr* 33 Suppl 42, 1-19.
- BARNES, N. M. & SHARP, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083-1152.

- BARR, C. S., NEWMAN, T. K., SHANNON, C., PARKER, C., DVOSKIN, R. L., BECKER, M. L., SCHWANDT, M., CHAMPOUX, M., LESCH, K. P., GOLDMAN, D., SUOMI, S. J. & HIGLEY, J. D. (2004). Rearing condition and rh5-HTTLPR interact to influence limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in infant macaques. *Biol Psychiatry* 55, 733-738.
- BASTOS, E. F., MARCELINO, J. L., AMARAL, A. R. & SERFATY, C. A. (1999). Fluoxetine-induced plasticity in the rodent visual system. *Brain Res* 824, 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* 250, 498-509.
- BENGEL, D., MURPHY, D. L., ANDREWS, A. M., WICHEMS, C. H., FELTNER, D., HEILS, A., MOSSNER, R., WESTPHAL, H. & LESCH, K. P. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* 53, 649-655.
- BERARDI, N., PIZZORUSSO, T. & MAFFEI, L. (2000). Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* 10, 138-145.
- BILOUSOVA, T. V., RUSAKOV, D. A., ETHELL, D. W. & ETHELL, I. M. (2006). Matrix metalloproteinase-7 disrupts dendritic spines in hippocampal neurons through NMDA receptor activation. *J Neurochem* 97, 44-56.
- BLUNDELL, J. E. (1992). Serotonin and the biology of feeding. *Am J Clin Nutr* 55, 155S-159S.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- BUNT, S. M., LUND, R. D. & LAND, P. W. (1983). Prenatal development of the optic projection in albino and hooded rats. *Brain Res* 282, 149-168.
- BUTT, C. M., ZHAO, B., DUNCAN, M. J. & DEBSKI, E. A. (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* 931, 21-31.
- CÂMARA, F. S. & MADRUGA, M. S. (2000). CYANIC ACID, PHYTIC ACID, TOTAL TANNIN AND AFLATOXIN CONTENTS OF A BRAZILIAN (NATAL) MULTIMISTURA PREPARATION. *Revista de Nutrição* 14.
- CAMPHELLO-COSTA, P., FOSSE-JUNIOR, A. M., OLIVEIRA-SILVA, P. & SERFATY, C. A. (2006). Blockade of arachidonic acid pathway induces sprouting in the adult but not in the neonatal uncrossed retinotectal projection. *Neuroscience* 139, 979-989.

- CAMPELLO-COSTA, P., FOSSE, A. M., JR., 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* 44, 371-381.
- CASES, O., LEBRAND, C., GIROS, B., VITALIS, T., DE MAEYER, E., CARON, M. G., PRICE, D. J., GASPAR, P. & SEIF, I. (1998). Plasma membrane transporters of serotonin, dopamine, and norepinephrine mediate serotonin accumulation in atypical locations in the developing brain of monoamine oxidase A knock-outs. *J Neurosci* 18, 6914-6927.
- CHAILLAN, F. A., RIVERA, S., MARCHETTI, E., JOURQUIN, J., WERB, Z., SOLOWAY, P. D., KHRESTCHATISKY, M. & ROMAN, F. S. (2006). Involvement of tissue inhibition of metalloproteinases-1 in learning and memory in mice. *Behav Brain Res* 173, 191-198.
- CHEN, J., SHEN, C. & MELLER, E. (2002). 5-HT_{1A} receptor-mediated regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in rat brain. *Eur J Pharmacol* 452, 155-162.
- CHEN, J. C., TURIK, G., GALLER, J. & VOLICER, L. (1997). Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. *Int J Dev Neurosci* 15, 257-263.
- CHERNOFF, E. A., O'HARA, C. M., BAUERLE, D. & BOWLING, M. (2000). Matrix metalloproteinase production in regenerating axolotl spinal cord. *Wound Repair Regen* 8, 282-291.
- CLARKE, W. P., DE VIVO, M., BECK, S. G., MAAYANI, S. & GOLDFARB, J. (1987). Serotonin decreases population spike amplitude in hippocampal cells through a pertussis toxin substrate. *Brain Res* 410, 357-361.
- COLOMBO, J. P., CERVANTES, H., KOKOROVIC, M., PFISTER, U. & PERRITAZ, R. (1992). Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rat. *Ann Nutr Metab* 36, 23-33.
- CONSTANTINE-PATON, M., CLINE, H. T. & DEBSKI, E. (1990). Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annu Rev Neurosci* 13, 129-154.
- CONWAY, S., RICHARDSON, L., SPECIALE, S., MOHEREK, R., MAUCERI, H. & KRULICH, L. (1990). Interaction between norepinephrine and serotonin in the neuroendocrine control of growth hormone release in the rat. *Endocrinology* 126, 1022-1030.
- COWEN, D. S. (2007). Serotonin and neuronal growth factors - a convergence of signaling pathways. *J Neurochem* 101, 1161-1171.

- CROCKER, S. J., PAGENSTECHEER, A. & CAMPBELL, I. L. (2004). The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res* 75, 1-11.
- CYNADER, M., SHAW, C., PRUSKY, G. & VAN HUIZEN, F. (1990). Neural mechanisms underlying modifiability of response properties in developing cat visual cortex. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 67, 85-108.
- DEBSKI, E. A. & CLINE, H. T. (2002). Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. *Curr Opin Neurobiol* 12, 93-99.
- DEBSKI, E. A., CLINE, H. T. & CONSTANTINE-PATON, M. (1990). Activity-dependent tuning and the NMDA receptor. *J Neurobiol* 21, 18-32.
- DEL ANGEL-MEZA, A. R., RAMIREZ-CORTES, L., OLVERA-CORTES, E., PEREZ-VEGA, M. I. & GONZALEZ-BURGOS, I. (2001). A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. *Int J Dev Neurosci* 19, 447-453.
- DI CRISTO, G., BERARDI, N., CANCEDDA, L., PIZZORUSSO, T., PUTIGNANO, E., RATTO, G. M. & MAFFEI, L. (2001). Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* 292, 2337-2340.
- DJALALI, S., HOLTJE, M., GROSSE, G., ROTHE, T., STROH, T., GROSSE, J., DENG, D. R., 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* 92, 616-627.
- 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. *Exp Neurol* 154, 113-125.
- DRAGER, U. C. & OLSEN, J. F. (1980). Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol* 191, 383-412.
- DUMAZ, N. & MARAIS, R. (2005). Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *Febs J* 272, 3491-3504.
- DWIVEDI, Y., RIZAVI, H. S., ROBERTS, R. C., CONLEY, R. C., TAMMINGA, C. A. & PANDEY, G. N. (2001). Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *J Neurochem* 77, 916-928.
- DYE, L., LLUCH, A. & BLUNDELL, J. E. (2000). Macronutrients and mental performance. *Nutrition* 16, 1021-1034.

- EDAGAWA, Y., SAITO, H. & ABE, K. (1998). Serotonin inhibits the induction of long-term potentiation in rat primary visual cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22, 983-997.
- 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* 21, 1532-1537.
- EGBLAD, M. & WERB, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.
- ELGERSMA, Y. & SILVA, A. J. (1999). Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 9, 209-213.
- ERICKSON, J. D., EIDEN, L. E. & HOFFMAN, B. J. (1992). Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10993-10997.
- ETHELL, I. M. & ETHELL, D. W. (2007). Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* 85, 2813-2823.
- FADDA, F., COCCO, S. & STANCAMPIANO, R. (2000). A physiological method to selectively decrease brain serotonin release. *Brain Res Brain Res Protoc* 5, 219-222.
- FAO/OMS, F. A. A. O. W. H. O. (1989). Expert Consultation Committee on Protein Quality Evaluation.
- FERSTROM, J. D. (1974). Modification of brain serotonin by the diet. *Annu Rev Med* 25, 1-8.
- GALINEAU, L., KODAS, E., GUILLOTEAU, D., VILAR, M. P. & CHALON, S. (2004). Ontogeny of the dopamine and serotonin transporters in the rat brain: an autoradiographic study. *Neurosci Lett* 363, 266-271.
- GALLI, L. & MAFFEI, L. (1988). Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science* 242, 90-91.
- 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* 61, 295-301.
- GASPAR, P., CASES, O. & MAROTEAUX, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4, 1002-1012.
- GIBSON, G. E., & BLASS, J. P.. . (1999). Nutrition and Brain Function. *Basic Neurochemistry* 6, 691 - 709.

- GONZALEZ-BURGOS, I., PEREZ-VEGA, M. I. & BEAS-ZARATE, C. (2001). Neonatal exposure to monosodium glutamate induces cell death and dendritic hypotrophy in rat prefrontocortical pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 297, 69-72.
- GONZÁLEZ, E., PENEDO, L., OLIVEIRA-SILVA, P., CAMPELO COSTA, P. & SERFATY, C. A. (2008). Neonatal tryptophan dietary restriction alters development of retinotectal projections in rats. *Experimental Neurology*.
- GU, Q. & SINGER, W. (1995). Involvement of serotonin in developmental plasticity of kitten visual cortex. *Eur J Neurosci* 7, 1146-1153.
- GUEDES, S. & PRIESS, J. R. (1997). The *C. elegans* MEX-1 protein is present in germline blastomeres and is a P granule component. *Development* 124, 731-739.
- HOFBAUER, A. & DRAGER, U. C. (1985). Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J Comp Neurol* 234, 465-474.
- HOLT, C. E. & HARRIS, W. A. (1998). Target selection: invasion, mapping and cell choice. *Curr Opin Neurobiol* 8, 98-105.
- HORSBURGH, G. M. & SEFTON, A. J. (1986). The early development of the optic nerve and chiasm in embryonic rat. *J Comp Neurol* 243, 547-560.
- HWANG, L. L. & DUN, N. J. (1999). Serotonin modulates synaptic transmission in immature rat ventrolateral medulla neurons in vitro. *Neuroscience* 91, 959-970.
- ISA, T. & SAITO, Y. (2001). The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection. *Neurosci Res* 41, 107-113.
- JACOBS, B. L. & FORNAL, C. A. (1999). Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 21, 9S-15S.
- JEN, L. S., SO, K. F. & WOO, H. H. (1984). An anterograde HRP study of the retinocollicular pathways in normal hamsters and hamsters with one eye enucleated at birth. *Brain Res* 294, 169-173.
- JENSEN, G. L. & BINKLEY, J. (2002). Clinical manifestations of nutrient deficiency. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 26, S29-33.
- KIM, D. K., TOLLIVER, T. J., HUANG, S. J., MARTIN, B. J., ANDREWS, A. M., WICHEMS, C., HOLMES, A., LESCH, K. P. & MURPHY, D. L. (2005). Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. *Neuropharmacology* 49, 798-810.

- KLASSEN, H., SAKAGUCHI, D. S. & YOUNG, M. J. (2004). Stem cells and retinal repair. *Prog Retin Eye Res* 23, 149-181.
- KNOLL, B. & DRESCHER, U. (2002). Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* 25, 145-149.
- KOJIC, L., GU, Q., DOUGLAS, R. M. & CYNADER, M. S. (1997). Serotonin facilitates synaptic plasticity in kitten visual cortex: an in vitro study. *Brain Res Dev Brain Res* 101, 299-304.
- KRAUSE, J., MAHAN, K. L., & STUMP, S. E. . (1999). *Principios Nutricionais, Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*.
- KYOSSEVA, S. V. (2004). The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in cerebellar abnormalities in schizophrenia. *Cerebellum* 3, 94-99.
- LAUNAY, J. M., SCHNEIDER, B., LORIC, S., DA PRADA, M. & KELLERMANN, O. (2006). Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT_{2B} receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *Faseb J* 20, 1843-1854.
- LAUTENSCHLAGER, M., HOLTJE, M., VON JAGOW, B., VEH, R. W., HARMS, C., BERGK, A., DIRNAGL, U., AHNERT-HILGER, G. & HORTNAGL, H. (2000). Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences. *Neuroscience* 99, 519-527.
- LAVDAS, A. A., BLUE, M. E., LINCOLN, J. & PARNAVELAS, J. G. (1997). Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17, 7872-7880.
- LEE, D. R., SEMBA, R., KONDO, H., GOTO, S. & NAKANO, K. (1999). Decrease in the levels of NGF and BDNF in brains of mice fed a tryptophan-deficient diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 337-340.
- LEIBOWITZ, S. F. (1990). The role of serotonin in eating disorders. *Drugs* 39 Suppl 3, 33-48.
- LEONARD, B. E. (1996). Serotonin receptors and their function in sleep, anxiety disorders and depression. *Psychother Psychosom* 65, 66-75.
- LESCH, K. P., BALLING, U., SEEMANN, M., TEUFEL, A., BENGEL, D., HEILS, A., GODECK, P. & RIEDERER, P. (1997). Molecular heterogeneity of neurotransmitters: implications for neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl* 49, 155-167.
- LETOURNEAU, P. C., CONDIC, M. L. & SNOW, D. M. (1994). Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J Neurosci* 14, 915-928.

- LEVITSKY, D. A. & STRUPP, B. J. (1995). Malnutrition and the brain: changing concepts, changing concerns. *J Nutr* 125, 2212S-2220S.
- LI, Q. (2006). Cellular and molecular alterations in mice with deficient and reduced serotonin transporters. *Mol Neurobiol* 34, 51-66.
- LO, F. S. & MIZE, R. R. (2000). Synaptic regulation of L-type Ca(2+) channel activity and long-term depression during refinement of the retinocollicular pathway in developing rodent superior colliculus. *J Neurosci* 20, RC58.
- LUND, R. D. & BUNT, A. H. (1976). Prenatal development of central optic pathways in albino rats. *J Comp Neurol* 165, 247-264.
- LUND, R. D., LAND, P. W. & BOLES, J. (1980). Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: an HRP study in adults. *J Comp Neurol* 189, 711-720.
- MALAYEV, A. A. & DEBSKI, E. A. (1998). Serotonin modulates induced synaptic activity in the optic tectum of the frog. *Brain Res* 781, 167-181.
- MATTSON, M. P., MAUDSLEY, S. & MARTIN, B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27, 589-594.
- MAZER, C., MUNEYYIRCI, J., TAHENY, K., RAI0, N., BORELLA, A. & WHITAKER-AZMITIA, P. (1997). Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res* 760, 68-73.
- MCCAWLEY, L. J. & MATRISIAN, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13, 534-540.
- MCMAMARA, R. K. & SKELTON, R. W. (1993). The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Brain Res Rev* 18, 33-49.
- MEGUID, M. M., FETISSOV, S. O., VARMA, M., SATO, T., ZHANG, L., LAVIANO, A. & ROSSI-FANELLI, F. (2000). Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* 16, 843-857.
- MEIGHAN, S. E., MEIGHAN, P. C., CHOUDHURY, P., DAVIS, C. J., OLSON, M. L., ZORNES, P. A., WRIGHT, J. W. & HARDING, J. W. (2006). Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J Neurochem* 96, 1227-1241.
- MELLITZER, G., XU, Q. & WILKINSON, D. G. (2000). Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Neurobiol* 10, 400-408.

- MEY, J. & THANOS, S. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 32, 343-379.
- MEYER, R. L. (1982). Tetrodotoxin blocks the formation of ocular dominance columns in goldfish. *Science* 218, 589-591.
- MOONEY, R. D., HUANG, X., SHI, M. Y., BENNETT-CLARKE, C. A. & RHOADES, R. W. (1996). Serotonin modulates retinotectal and corticotectal convergence in the superior colliculus. *Prog Brain Res* 112, 57-69.
- MOONEY, R. D., SHI, M. Y. & RHOADES, R. W. (1994). Modulation of retinotectal transmission by presynaptic 5-HT_{1B} receptors in the superior colliculus of the adult hamster. *J Neurophysiol* 72, 3-13.
- MOORE, P., LANDOLT, H. P., SEIFRITZ, E., CLARK, C., BHATTI, T., KELSOE, J., RAPAPORT, M. & GILLIN, J. C. (2000). Clinical and physiological consequences of rapid tryptophan depletion. *Neuropsychopharmacology* 23, 601-622.
- 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 Biobehav Rev* 17, 91-128.
- MORIN, L. P. (1999). Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med* 31, 12-33.
- MOTT, J. D. & WERB, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16, 558-564.
- 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* 525, 84-91.
- NAGY, V., BOZDAGI, O., MATYNIA, A., BALCERZYK, M., OKULSKI, P., DZWONEK, J., COSTA, R. M., SILVA, A. J., KACZMAREK, L. & HUNTLEY, G. W. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci* 26, 1923-1934.
- OHASHI, S., TOGASHI, H., MATSUMOTO, M., MORI, K., UENO, K. & YOSHIOKA, M. (2003). Changes in synaptic properties in cortical-limbic communications induced by repeated treatments with fluvoxamine in rats. *J Pharmacol Sci* 92, 100-107.
- OLIVEIRA-SILVA, P., JURGILAS, P. B., TRINDADE, P., CAMPELLO-COSTA, P., PERALES, J., SAVINO, W. & SERFATY, C. A. (2007). Matrix metalloproteinase-9 is involved in the development and plasticity of retinotectal projections in rats. *Neuroimmunomodulation* 14, 144-149.

- OROZCO-SUAREZ, S., DEL ANGEL, A. R., BEAS-ZARATE, C., MANJARRREZ, G. & FERIA-VELASCO, A. (2003). Corn feeding during development induces changes in the number of serotonergic neurons in the raphe nuclei. *Int J Dev Neurosci* 21, 13-22.
- PARKS, W. C., WILSON, C. L. & LOPEZ-BOADO, Y. S. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 617-629.
- PEREMANS, K., GOETHALS, I., DE VOS, F., DOBBELEIR, A., HAM, H., VAN BREE, H., VAN HEERINGEN, C. & AUDENAERT, K. (2006). Serotonin transporter and dopamine transporter imaging in the canine brain. *Nucl Med Biol* 33, 907-913.
- PERRY, V. H., HENDERSON, Z. & LINDEN, R. (1983). Postnatal changes in retinal ganglion cell and optic axon populations in the pigmented rat. *J Comp Neurol* 219, 356-368.
- PETERS, M. A. (2002). Patterning the neural retina. *Curr Opin Neurobiol* 12, 43-48.
- POUYSEGUR, J. & LENORMAND, P. (2003). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem* 270, 3291-3299.
- PURO, D. G., DE MELLO, F. G. & NIRENBERG, M. (1977). Synapse turnover: the formation and termination of transient synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 4977-4981.
- RAMOS, A. J., RUBIO, M. D., DEFAGOT, C., HISCHBERG, L., VILLAR, M. J. & BRUSCO, A. (2004). The 5HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, protects neurons and reduces astroglial reaction after ischemic damage caused by cortical devascularization. *Brain Res* 1030, 201-220.
- RAYMOND, J. R., 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. *Pharmacol Ther* 92, 179-212.
- REESE, B. E. & COLELLO, R. J. (1992). Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience* 46, 419-429.
- REEVES, T. M., PRINS, M. L., ZHU, J., POVLISHOCK, J. T. & PHILLIPS, L. L. (2003). Matrix metalloproteinase inhibition alters functional and structural correlates of deafferentation-induced sprouting in the dentate gyrus. *J Neurosci* 23, 10182-10189.
- 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. *J Comp Neurol* 334, 397-409.

- RHOADES, R. W., MOONEY, R. D., CHIAIA, N. L. & BENNETT-CLARKE, C. A. (1990). Development and plasticity of the serotonergic projection to the hamster's superior colliculus. *J Comp Neurol* 299, 151-166.
- RIEDEL, A., HARTIG, W., FRITSCHY, J. M., BRUCKNER, G., SEIFERT, U. & BRAUER, K. (1998). Comparison of the rat dorsal and ventral striatopallidal system. A study using the GABA(A)-receptor alpha1-subunit and parvalbumin immunolabeling. *Exp Brain Res* 121, 215-221.
- RIEDEL, W. J., KLAASSEN, T., DEUTZ, N. E., VAN SOMEREN, A. & VAN PRAAG, H. M. (1999). Tryptophan depletion in normal volunteers produces selective impairment in memory consolidation. *Psychopharmacology (Berl)* 141, 362-369.
- 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, 665-677.
- RIVERA, S., TREMBLAY, E., TIMSIT, S., CANALS, O., BEN-ARI, Y. & KHRESTCHATISKY, M. (1997). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is differentially induced in neurons and astrocytes after seizures: evidence for developmental, immediate early gene, and lesion response. *J Neurosci* 17, 4223-4235.
- RODGER, J., BARTLETT, C. A., BEAZLEY, L. D. & DUNLOP, S. A. (2000). Transient up-regulation of the rostrocaudal gradient of ephrin A2 in the tectum coincides with reestablishment of orderly projections during optic nerve regeneration in goldfish. *Exp Neurol* 166, 196-200.
- ROTONDO, S., EVANGELISTA, V., MANARINI, S., DE GAETANO, G. & CERLETTI, C. (1997). Different requirement of intracellular calcium and protein kinase C for arachidonic acid release and serotonin secretion in cathepsin G-activated platelets. *Thromb Haemost* 78, 919-925.
- ROUCH, C., NICOLAIDIS, S. & OROSCO, M. (1999). Determination, using microdialysis, of hypothalamic serotonin variations in response to different macronutrients. *Physiol Behav* 65, 653-657.
- SARWAR, G. & BOTTING, H. G. (1999). Liquid concentrates are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats. *J Nutr* 129, 1692-1697.
- SCHMIDT, J. T. (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* 10, 233-246.
- SCHMIDT, J. T. (2004). Activity-driven sharpening of the retinotectal projection: the search for retrograde synaptic signaling pathways. *J Neurobiol* 59, 114-133.

- SEBOLT-LEOPOLD, J. S. & HERRERA, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 937-947.
- SERFATY, C. A., 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* 66, 128-134.
- SERFATY, C. A. & LINDEN, R. (1990). Development of abnormal lamination and binocular segregation of retinal afferents onto the rat superior colliculus. *Braz J Med Biol Res* 23, 663-666.
- 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. *Brain Res Dev Brain Res* 60, 9-17.
- SERFATY, C. A. & LINDEN, R. (1994). Development of abnormal lamination and binocular segregation in the retinotectal pathways of the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 82, 35-44.
- SHEFFIELD, J. B., KRASNOPOLSKY, V. & DEHLINGER, E. (1994). Inhibition of retinal growth cone activity by specific metalloproteinase inhibitors in vitro. *Dev Dyn* 200, 79-88.
- SKAPER, S. D., MOORE, S. E. & WALSH, F. S. (2001). Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog Neurobiol* 65, 593-608.
- SOTO-MOYANO, R., HERNANDEZ, A., PEREZ, H., RUIZ, S., GALLEGUILLOS, X. & BELMAR, J. (1989). Effect of clonidine early in life on brain morphofunctional deficits induced by neonatal malnutrition in the rat. *Int J Neurosci* 49, 103-113.
- SRETAVAN, D. & SHATZ, C. J. (1984). Prenatal development of individual retinogeniculate axons during the period of segregation. *Nature* 308, 845-848.
- STELLWAGEN, D. & SHATZ, C. J. (2002). An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity. *Neuron* 33, 357-367.
- STENKAMP, D. L. & CAMERON, D. A. (2002). Cellular pattern formation in the retina: retinal regeneration as a model system. *Mol Vis* 8, 280-293.
- STERNLICHT, M. D. & WERB, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.
- SZKLARCZYK, A., LAPINSKA, J., RYLSKI, M., MCKAY, R. D. & KACZMAREK, L. (2002). Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 22, 920-930.

- THANOS, S. & MEY, J. (2001). Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res Brain Res Rev* 35, 205-245.
- TOMASULO, R. A., RAMIREZ, J. J. & STEWARD, O. (1993). Synaptic inhibition regulates associative interactions between afferents during the induction of long-term potentiation and depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11578-11582.
- TOYODA, H., ZHAO, M. G., XU, H., WU, L. J., REN, M. & ZHUO, M. (2007). Requirement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase for long-term potentiation in adult mouse anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 3, 36.
- UPTON, A. L., SALICHON, N., LEBRAND, C., RAVARY, A., BLAKELY, R., SEIF, I. & GASPAR, P. (1999). Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J Neurosci* 19, 7007-7024.
- VAILLANT, C., DIDIER-BAZES, M., HUTTER, A., BELIN, M. F. & THOMASSET, N. (1999). Spatiotemporal expression patterns of metalloproteinases and their inhibitors in the postnatal developing rat cerebellum. *J Neurosci* 19, 4994-5004.
- VENERO, J. L., HERRERA, A. J., MACHADO, A. & CANO, J. (1992). Changes in neurotransmitter levels associated with the deficiency of some essential amino acids in the diet. *Br J Nutr* 68, 409-420.
- VOLGUSHEV, M., VORONIN, L. L., CHISTIAKOVA, M. & SINGER, W. (1994). Induction of LTP and LTD in visual cortex neurones by intracellular tetanization. *Neuroreport* 5, 2069-2072.
- WALTHER, D. J. & BADER, M. (1999). Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Res Mol Brain Res* 68, 55-63.
- WEBBER, C. A., HOCKING, J. C., YONG, V. W., STANGE, C. L. & MCFARLANE, S. (2002). Metalloproteases and guidance of retinal axons in the developing visual system. *J Neurosci* 22, 8091-8100.
- WHEAL, H. V., CHEN, Y., MITCHELL, J., SCHACHNER, M., MAERZ, W., WIELAND, H., VAN ROSSUM, D. & KIRSCH, J. (1998). Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 55, 611-640.
- WHITAKER-AZMITIA, P. M. (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology* 21, 2S-8S.
- WHITAKER-AZMITIA, P. M. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull* 56, 479-485.

- WIESEL, T. N. (1971). Effects of monocular deprivation on the cat's visual cortex. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 75, 1186-1198.
- WRIGHT, J. W., KRAMAR, E. A., MEIGHAN, S. E. & HARDING, J. W. (2002). Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides* 23, 221-246.
- YAGER, J. Y. & HARTFIELD, D. S. (2002). Neurologic manifestations of iron deficiency in childhood. *Pediatr Neurol* 27, 85-92.
- YOKOGOSHI, H. & NOMURA, M. (1991). Effect of amino acid supplementation to a low-protein diet on brain neurotransmitters and memory-learning ability of rats. *Physiol Behav* 50, 1227-1232.
- YONG, V. W. (2005). Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 6, 931-944.
- YUEN, E. Y., JIANG, Q., CHEN, P., GU, Z., FENG, J. & YAN, Z. (2005). Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J Neurosci* 25, 5488-5501.

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](#)