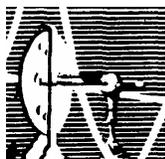


Priscilla Oliveira Silva

“Expressão, atividade e papel funcional da metaloprotease-9 durante o desenvolvimento do sistema visual de roedores”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
200

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Plasticidade Neural do Departamento de Neurobiologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, sob orientação de Claudio Alberto Serfaty, no laboratório de pesquisas sobre o Timo do Departamento de Imunologia da Fundação Oswaldo Cruz/RJ, sob a supervisão do Dr. Wilson Savino e no laboratório de Toxinologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica da FIOCRUZ, sob a supervisão da Dra. Patrícia Jurgilas, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES/MEC), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), PRONEX-MCT e PAPES- FIOCRUZ

Expressão, atividade e papel funcional da metaloprotease-9 durante o desenvolvimento do sistema visual de roedores. Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Biofísica, 2007.

xii,133f

Tese: Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)

- |                          |                    |                 |
|--------------------------|--------------------|-----------------|
| 1. Projeção retinotectal | 2. Metaloproteases | 3. Plasticidade |
| 4. Desenvolvimento       | 5. DM-43           |                 |

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro- IBCCF<sup>0</sup>.

II. Título

À Júlia, com todo  
meu amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento para a realização deste trabalho.

Agradeço de maneira especial ao meu orientador, Dr. Claudio Alberto Serfaty, pela paciência e amizade inigualáveis com que me auxiliou a desenvolver este trabalho. Obrigada por contribuir de maneira efetiva para meu crescimento profissional ao longo desses sete longos e maravilhosos anos, e, sobretudo, pela confiança a mim destinada.

Ao Dr. Wilson Savino, por ser praticamente uma “enciclopédia da matriz extracelular”, pelos laços de confiança e amizade que criamos ao longo desses anos. O meu agradecimento especial por ter me introduzido ao “mundo das metaloproteases” pelas mãos de Patrícia Jurgilas.

À Dra. Patrícia Barbosa Jurgilas, por ser meu braço direito, e às vezes o esquerdo também. Qualquer coisa que eu diga jamais atingirá a plenitude do agradecimento que eu possa fazer à você. Sem você Pati provavelmente nada disso teria sido possível. Obrigada por nunca ter pensado em desistir, nem nos 3 em 8!

Ao Dr. Jonas Perales, que me abriu as portas do seu laboratório a fim de que eu pudesse realizar meus ensaios com a DM-43.

À Dra. Patrícia Gardino, do IBCCF- UFRJ, pela revisão criteriosa deste documento.

À Dra. Paula Campello-Costa Lopes, pelo seu papel fundamental na minha vida. Obrigada por todas as oportunidades de crescimento profissional que me proporcionou, e pelas infindáveis discussões dos dados deste trabalho. E mais do que isso, por ter se tornado uma grande amiga.

À amiga Dra. Jaine Martins Ferreira, uma criatura especial, meu agradecimento por toda a força e incentivo, mesmo que de longe.

Aos professores Adriana Melibeu, Ana Ventura, Chico, Ronald Marques, Karin Calaza, Roberto Paes de Carvalho, por tornarem o ambiente na UFF sempre de muito alto astral.

A todo o corpo docente do programa de pós-graduação em biofísica do IBCCF- UFRJ, em especial ao Dr. Ricardo Reis, grande incentivador do meu crescimento profissional.

À Sandrinha, secretária do nosso programa de pós-graduação, que para mim é um exemplo de eficiência, competência e dedicação a um trabalho bem feito. Obrigada por toda a atenção. Você é demais!

A todos os amigos do Laboratório de Plasticidade Neural e adjacências, em especial ao Pablo Trindade, que contribuiu em parte

na obtenção de dados deste trabalho. Tita, obrigada por todas as “soluções” dos meus problemas, você é muito especial pra mim. Ao “trio maravilha”: Flávio, Wandilson e Carlos. À Raquelzinha, Letícia, Rafaela, “Patrícias”, Isis, Guilherme, Rodrigo e Alexandre, obrigada pela frase absolutamente necessária nos momentos difíceis: “Falta pouco”. Á Aninha, que apesar de “pequeninha”, é uma grande *persona!*

Aos amigos do Laboratório de Toxinologia, em especial: Dani, Gisela, Marcelinha, William, Lidiane, Afonso e Frank. Aos amigos do Laboratório de Timo, em especial os “professores”: Suse, Luiz Berbert, Sueli, Juliana, Eugênia e Wallace.

Aos amigos Tamara & Dadá (e sua boneca), Didi, Pipi, Gabi, Maria Alice, Kikita, Renatão, Batata, Valesca, Abílio, Renatinho, Maria de Fátima, Geovanini, Cris “loira”, Simone, Valerinha, Xandeco, Paolo, “Seu” Edvaldo e Dona Mélida.

A Felipe Hess, meu agradecimento especial pelas valiosas discussões sobre a ciência.

A todos os alunos com quem sempre pude aprender, em especial Reila, Marina e Raphael.

Às famílias Chasilew, Levy e Paz tão especiais pra mim. Em especial: Mimirimi, Ninoca, Karen, Alon, Daniel e Gabriel.

À família Bomfim, muitíssimo obrigada pelo carinho. Felipe, pra você toda a minha gratidão, por cada segundo de paciência, afeto e dedicação inabaláveis.

À Terezinha Resende, que põe ordem na "bagunça dos meus neurônios", nunca vou esquecer o que você faz por mim, "nem que eu viva cem anos". E à Ângela, sua fiel escudeira, muito querida por mim.

Aos meus afilhados Enzo e Maurinho. Ao Enzinho miúdo e todas as crianças que povoam os meus dias, e tornam minha vida maravilhosa.

Aos meus pais, Erivaldo e Terezinha, irmãos, Marcello e Patrícia, avó Irene, tia Fátima e minha cunhada Rejane, por serem o meu alicerce e fonte de amor na vida. E à Julinha, minha primeira sobrinha oficial, que chegará em breve para fazer de mim uma tia bem bo(a)bona!

A Deus que se faz presente em cada uma dessas pessoas que tornam minha existência feliz.

“And now the end is near  
So I face the final curtain  
My friend, I'll say it clear  
I'll state my case of which I'm  
certain  
I've lived a life that's full  
I've travelled each and every  
highway  
And more, much more than this  
I did it my way  
Regrets, I've had a few  
But then again, too few to mention  
I did what I had to do  
And saw it through without  
exception  
.....  
I've loved, I've laughed and cried  
I've had my fails, my share of losing  
And now as tears subside  
I find it all so amusing  
To think I did all that  
And may I say, not in a shy way  
Oh, no, no not me  
I did it my way”  
**Paul Anka & Jacques Revaux**  
(My Way)

## ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1)INTRODUÇÃO.....	1
1.1) O SISTEMA VISUAL DE ROEDORES (VIAS VISUAIS).....	4
1.2) DESENVOLVIMENTO DE TOPOGRAFIA NO SISTEMA VISUAL.....	10
1.3) PERÍODO CRÍTICO E PLASTICIDADE.....	13
1.4) Uma visão geral sobre a matriz extracelular.....	18
1.5) METALOPROTEASES.....	25
1.5.1) ASPECTOS GERAIS.....	25
1.5.2) REGULAÇÃO DA ATIVIDADE METALOPROTEASE.....	30
1.5.3) PAPEL DAS MMPs NO DESENVOLVIMENTO, PLASTICIDADE E REGENERAÇÃO DO SNC.....	34
1.6) PROJEÇÕES RETINOTECTAIS COMO MODELO DE PLASTICIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	39
2) OBJETIVOS.....	43
2.1) OBJETIVOS GERAIS.....	42
2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42

3) MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1) eXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA <i>WESTERN BLOTTING</i> E ZIMOGRAFIA.....	44
3.2) <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	45
3.3) ZIMOGRAFIA.....	46
3.4) DENSITOMETRIA.....	47
3.5) gRUPOS DE LESÃO.....	48
3.6) CONFECÇÃO DO ELVAX COMO FONTE DE LIBERAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS.....	49
3.7) DM-43.....	50
3.8) IMPLANTE SUBPIAL DE ELVAX.....	52
3.9) UTILIZAÇÃO DE TRAÇADOR.....	53
3.10) PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	54
3.11) HISTOQUÍMICA PARA HRP.....	55
3.12) ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	56
3.13) QUANTIFICAÇÃO DE AGLOMERADOS DE MARCAÇÃO TERMINAL E DE FIBRAS ESPARSAS IPSOLATERAIS NAS CAMADAS VISUAIS DO COLÍCULO SUPERIOR.....	57
3.14) aNÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4) RESULTADOS.....	59

4.1) EXPRESSÃO DA mmp-9 NO cs DE ROEDORES DURANTE O DESENVOLVIMENTO.....	59
4.2) ANÁLISE ZIMOGRÁFICA DA ATIVIDADE GELATINASE DA METALOPROTEASE-9 NO COLÍCULO SUPERIOR EM DESENVOLVIMENTO E NO ANIMAL ADULTO.....	61
4.3) EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA MMP-9 NÃO SÃO AFETADAS PELA ATIVIDADE ELÉTRICA EVOCADA .....	64
4.4) EFEITO DA ENUCLEAÇÃO MONOCULAR SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MMP-9 NO CS DE ROEDORES.....	67
4.5) INIBIÇÃO DA ATIVIDADE METALOPROTEASE INDUZ ALTERAÇÕES NO PADRÃO DE REFINAMENTO TOPOGRÁFICO RETINOTECTAL.....	73
5) DISCUSSÃO.....	76
5.1) PROTEÓLISE DA MATRIZ EXTRACELULAR, REMODELAMENTO AXONAL E SINAPTOGÊNESE.....	78
5.2) MODULAÇÃO DAS MMPs por atividade neural.....	81
5.3) MODULAÇÃO DE METALOPROTEASES NA PLASTICIDADE DO SNC.....	83
5.4) PAPEL DAS MMPS NO DESENVOLVIMENTO DE ESPECIFICIDADE TOPOGRÁFICA NO SISTEMA VISUAL.....	85
6) CONCLUSÕES.....	90
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC- Condroitinase

ADAMS- Desintegrina e Metaloprotease

AMPA-  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato

APV- Ácido Aminofosfonoaléico

BDNF- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

Ca<sup>2+</sup>- Cálcio

CDO- Colunas de Dominância Ocular

CS- Colículo Superior

DM-43- Glicoproteína de 43 kDa

DMSO- Dimetilsulfóxido

DPN- Dia Pós-natal

EGF- Fator de Crescimento Epidermal

GABA- Ácido Gama-aminobutírico

GPI- Glicosil Fosfatidil Inositol

HRP- Peroxidase de Raiz Forte

IC- Colículo Inferior

LTD- Depressão de Longa Duração

LTP- Potenciação de Longa Duração

L-LTP- Fase Tardia da Potenciação de Longa Duração

MAPK- Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno

MEC- Matriz extracelular

MHC- Complexo de Histocompatibilidade

MMPs- Metaloproteases

MT-MMP- Metaloprotease Associada a Membrana Celular

NaCl- Cloreto de sódio

NGL- Núcleo Genuculado Lateral

NMDA- N-metil-D-aspartato

NO- Óxido Nítrico

PBS- Salina Tamponada com Fosfato

PM- Privação Monocular

RGD- Arginina, Glicina e Ácido Aspártico

SGI- *Stratum Griseum Intermediale*

SGP- *Stratum Griseum Profundum*

SGS- *Stratum Griseum Superficiale*

SNC- Sistema Nervoso Central

SO- *Stratum Opticum*

SZ- *Stratum Zonale*

TBS- Salina Tamponada com Tris

TBS-T- TBS com Tween

TIMPs- Inibidores Teciduais de Metaloproteases

tPA- Ativador Tecidual de Plasminogênio

## Resumo

Durante o desenvolvimento pós-natal, as projeções retinotectais sofrem um processo de eliminação axonal, que induz a uma correta organização topográfica final, entre os axônios das células ganglionares da retina e as camadas visuais do colículo superior. Os mecanismos relacionados a esta maturação e refinamento topográfico são dependentes e independentes (moléculas de adesão e de direcionamento axonal) da atividade elétrica correlacionada entre a célula pré e pós- sináptica. Metaloproteases da matriz extracelular, tem sido relacionadas ao desenvolvimento e a plasticidade do sistema nervoso. O objetivo deste trabalho foi de estudar a expressão, atividade e o papel funcional das metaloproteases durante o desenvolvimento normal e após plasticidade induzida por lesão das projeções retinotectais. Ratos *Lister Hooded* foram usados neste estudo. Para análises de *western blotting* e zimografia, os colículos foram removidos sem fixação. Para ensaios de anatomia, ratos no dia pós-natal 0 receberam implantes subpial de EVA (acetato de etileno vinil – EVA 40W) contendo veículo ou inibidor de metaloproteases (DM-43), liberados sobre a superfície do colículo superior. Posteriormente, os animais receberam injeção intraocular de peroxidase a fim de traçar anterogradamente as projeções ipsolaterais. Encontramos uma maior expressão e atividade da metaloprotease-9 na primeira semana pós-natal, com significativo decréscimo após a segunda semana pós-natal. A inibição da atividade metaloprotease *in vivo* foi capaz de induzir um evidente atraso na formação de aglomerados de marcação terminal ao longo da região medial do colículo superior. Enucleação monocular no dia pós-natal 10 foi capaz de promover um rápido aumento na atividade metaloprotease-9 24 horas pós-denervação. Nossos dados indicam que metaloproteases são cruciais ao desenvolvimento retinotectal e ainda que estão envolvidas em processos plásticos após lesões do sistema nervoso central corroborando aos processos de organização topográfica e especificidade sináptica dessas conexões.

**Abstract**

During postnatal development, retinotectal projections undergo a process of misplaced axon elimination, leading to a topographical matching between the retinal surface and the superior colliculus. Adhesion and guidance molecules are involved with these processes. Matrix metalloproteinases have been implicated in the development and plasticity of the nervous system. We studied the expression, activity and the role of metalloproteinases during normal development of retinotectal projections and after monocular enucleation-induced plasticity. *Lister Hooded* rats were used in this study. For immunoblotting and zymography, colliculi were removed without fixation. For the anatomy assays rats at post natal day 0 received subpial EVA (ethylene vinyl acetate – EVA 40W) implants to deliver a metalloproteinases inhibitor (DM-43) or vehicle to the superior colliculus. Animals received intraocular injections of horseradish peroxidase for anterograde tracing of ipsilateral projections. We observed the highest metalloproteinase expression and activity in the first postnatal week, with decreasing activity thereafter. Importantly, inhibition of metalloproteinase activity *in vivo* induced a marked delay of axonal clustering along the medial aspect of colliculus. Monocular enucleation at postnatal day 10 yielded a rapid increase in metalloproteinase activity, 24 hours following denervation of the contralateral colliculus. Our data indicate that metalloproteinases are crucial to retinotectal development and in processes of plasticity induced by lesions at the central nervous system, concurring to the fine tuning of topographical order and synaptic specificity of these connections.

## 1) INTRODUÇÃO

A especificidade das conexões neurais é um marco do desenvolvimento do sistema nervoso. A sinaptogênese é um processo altamente regulado durante o desenvolvimento que apresenta um padrão temporal e espacial muito preciso, de forma que conexões apropriadas entre a célula pré-sináptica e o tecido alvo sejam corretamente estabelecidas. Os fatores moleculares envolvidos nestes processos vêm sendo bastante estudados, e pistas moleculares e celulares têm sido identificadas nos processos de interação de superfície celular.

Essas interações incluem uma série de moléculas, como os neurotransmissores clássicos e seus receptores, fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão celular, moléculas de orientação como efrinas, semaforinas, entre outras, além das moléculas da matriz extracelular (MEC). Moléculas da matriz extracelular, especialmente na última década, têm sido relacionadas a processos de desenvolvimento e formação de sinapses funcionais (Sur & Rubenstein, 2005). O adequado entendimento dos fatores que regulam a formação de circuitos neurais organizados são fundamentais para o entendimento dos processos que governam o desenvolvimento neural e os fenômenos de plasticidade neural.

A fim de compreender o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), o sistema visual tem sido há décadas utilizado como modelo experimental. Em particular, o sistema retinotectal de peixes, anfíbios e mamíferos tem fornecido inúmeras informações acerca do desenvolvimento e processamento sensoriais. No sistema visual de roedores, o desenvolvimento de especificidade sináptica envolve remodelamento axonal e dendrítico orientado por gradientes de efrinas no eixos rostro-caudal e médio-lateral (Knoll & Drescher, 2002; Schmitt *et al.*, 2006).

A formação de uma topografia fina depende ainda dos padrões de atividade espontânea das células ganglionares da retina, até o momento da abertura dos olhos, quando a atividade neural esculpe o padrão final de conectividade (Penn & Shatz, 1999). Esta plasticidade dinâmica das conexões neurais é observada não só durante o desenvolvimento normal, mas também em casos de lesão do sistema nervoso central (Majewska *et al.*, 2006; Shamy *et al.*, 2007). Na via retinotectal do rato, a plasticidade é mais evidente dentro das três primeiras semanas pós-natal, embora ainda esteja presente após este período crítico (Serfaty *et al.*, 2005).

Neste trabalho, investigamos os possíveis papéis desempenhados pelas metaloproteases (MMPs) da matriz extracelular, no desenvolvimento e plasticidade do sistema visual. Os resultados

obtidos sugerem que o desenvolvimento e a reorganização plástica induzida por lesão do SNC sejam modulados pela metaloprotease- 9 e que esta MMP esteja envolvida na formação do mapa topográfico retinotectal.

### 1.1) O SISTEMA VISUAL DE ROEDORES (VIAS VISUAIS)

A retina é uma estrutura derivada do ectoderma neural e possui uma organização laminar composta de neurônios arranjados em camadas nucleares, intercaladas por camadas plexiformes onde estão os contatos sinápticos. A camada mais interna é a de células ganglionares que são os neurônios de projeção da retina. Os axônios de todas as células ganglionares dirigem-se ao disco óptico onde se tornam mielinizados e juntos formam o nervo óptico. Os nervos ópticos de cada olho se juntam no quiasma óptico, e daí se projetam em direção ao encéfalo. Na região do quiasma óptico, em mamíferos, as fibras da retina apresentam decussação parcial, onde axônios oriundos da retina nasal se projetam contralateralmente e axônios da retina temporal, ipsilateralmente. Esta organização permite, portanto, que cada hemisfério cerebral receba informação das duas retinas sobre o hemicampo visual contralateral (Rakic, 1981; Simon & O'Leary, 1992a; Heiduschka & Thanos, 2000; Mey & Thanos, 2000; Thanos & Mey, 2001).

Em roedores, 95% das células ganglionares possuem axônios de projeção contralateral (Linden & Perry, 1983). Esta população celular ocupa toda extensão da retina e, por isso, todo o campo visual visto por esse olho é por ela representado. Apenas 5% das células que se

encontram na periferia temporal da retina, a crescente temporal, se projetam para o mesmo lado do cérebro (Cowey & Perry, 1979; Drager & Olsen, 1980). Após passarem pelo quiasma óptico os axônios das células ganglionares da retina formam o trato óptico e seguem para os seus alvos de projeção onde estabelecem conexões sinápticas (Figura 1). Os principais alvos visuais subcorticais são os núcleos geniculado lateral dorsal do tálamo, núcleos pré-tectais e o colículo superior (ou teto óptico) (Heiduschka & Thanos, 2000).

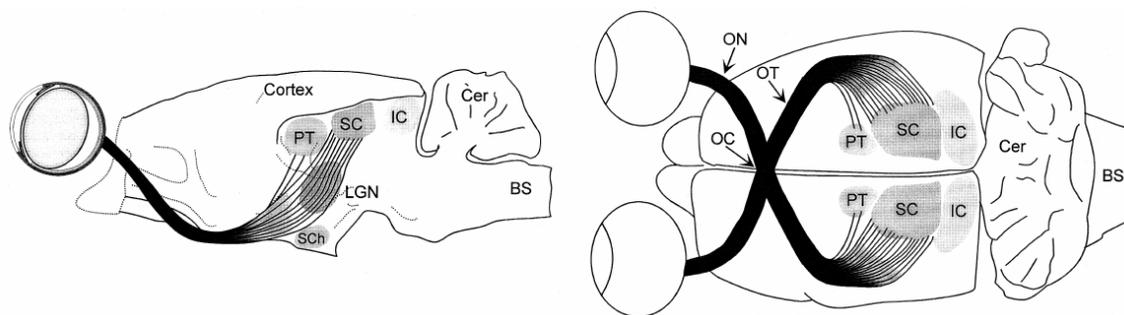


Figura 1: Esquema mostrando os axônios das células ganglionares da retina formando o nervo óptico, cruzando o quiasma óptico e inervando os centros visuais primários em ratos. Os axônios do nervo óptico terminam principalmente no colículo superior e alguns no pré- *tectum*. Abreviaturas: colículo superior (SC), tronco cerebral (BS), cerebelo (Cer), colículo inferior (IC), núcleo geniculado lateral (NGL), quiasma óptico (OC), trato óptico (OT), pré-tectum (PT). Modificado de Heiduscha & Thanos, 2000.

O colículo superior (CS) é uma estrutura laminar, responsável pela integração de estímulos auditivos, visuais e somatossensoriais, sendo considerado uma estrutura homóloga ao teto óptico de vertebrados não-mamíferos (Debski & Cline, 2002). O CS é um dos principais centros visuais subcorticais em roedores já que recebe aferências de todas as células ganglionares da retina (Linden & Perry, 1983). É subdividido em duas regiões: as camadas superficiais, essencialmente visuais, compostas pelo *stratum zonale* (SZ), *stratum griseum superficiale* (SGS) e *stratum opticum* (SO), e as camadas profundas, *stratum griseum intermediale* (SGI) e *stratum griseum profundum* (SGP), essencialmente motoras (Figura 2). O *stratum opticum* (SO) é a subcamada mais ventral das camadas visuais por onde penetram os axônios aferentes da retina. Os neurônios do SGS são os alvos de axônios da retina que penetram no colículo pela porção rostro-lateral e trafegam pelo SO. O CS recebe, ainda, aferentes provenientes da camada V do córtex visual, da região pré-tectal e núcleos parabigeminais. Seus eferentes projetam-se para núcleos subcorticais integrando respostas comportamentais e reflexos visuomotores (Binns, 1999; Isa & Saito, 2001).

Do ponto de vista da topografia retinotectal, os axônios da retina nasal se projetam para a região posterior do colículo e os axônios provenientes da retina temporal se projetam para a região anterior do

colículo. Axônios da retina dorsal e ventral projetam-se, respectivamente, para as regiões lateral e medial do colículo, respectivamente (Knoll & Drescher, 2002; Rashid *et al.*, 2005).

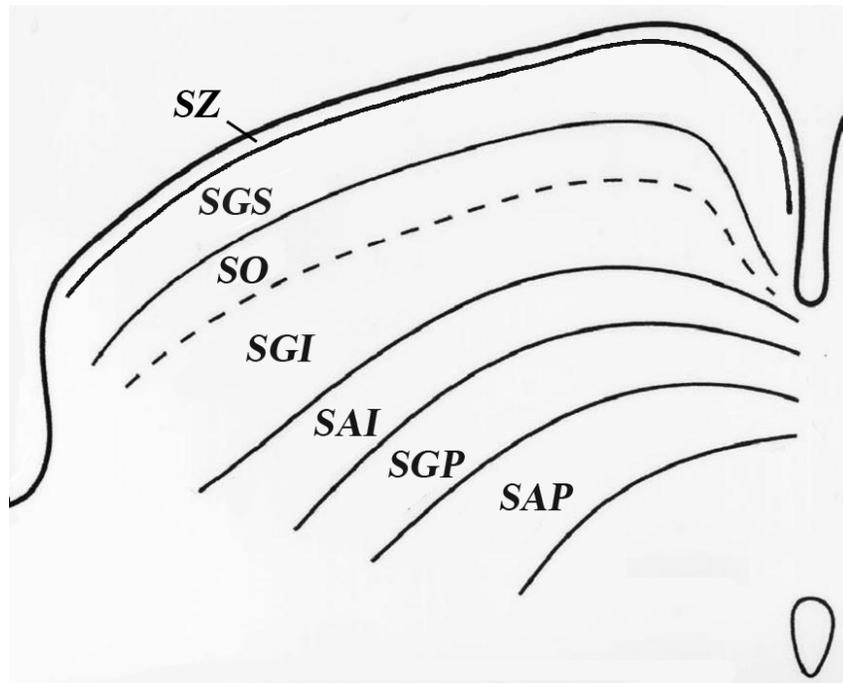


Figura 2: Laminação no colículo superior em um plano de corte coronal. A linha pontilhada delimita as camadas de processamento visual na região dorsal e as camadas profundas de processamento auditivo, motor e integração de informações. Abreviações: *stratum zonale* (SZ), *stratum griseum superficiale* (SGS), *stratum opticum* (SO), *stratum griseum intermediale* (SGI), *stratum album intermediale* (SAI), *stratum griseum profundum* (SGP), *stratum album profundum* (SAP). Adaptado de (Parsons *et al.*, 2001).

## 1.2) DESENVOLVIMENTO DE TOPOGRAFIA NO SISTEMA VISUAL

Uma das características mais marcantes dos sistemas sensoriais, e particularmente do sistema visual, é a representação topográfica da superfície receptora no tecido neural. Desta forma, a imagem do campo visual é representada nos núcleos visuais centrais de forma que pontos adjacentes na retina são reproduzidos em regiões adjacentes no tecido neural (Constantine-Paton *et al.*, 1990; Shatz, 1992b, a, 1996).

Essa circuitaria emerge durante o desenvolvimento pela formação de conexões sinápticas entre centenas de milhares de neurônios. A via retinotectal do rato neonato é um modelo que tem sido usado para o estudo destes mecanismos relacionados ao desenvolvimento dos mapas topográficos sensoriais e processos resultantes da interação/competição de vias neurais convergentes (Lund & Lund, 1972; Schmidt, 1985; Molotchnikoff & Itaya, 1993; Itaya *et al.*, 1995; Mize & Lo, 2000; Lemke & Reber, 2005).

O desenvolvimento da organização topográfica surge nos estágios iniciais do desenvolvimento, quando aferentes da retina estão inicialmente distribuídos de forma difusa nas camadas visuais do CS (Meyer, 1998; Ruthazer & Cline, 2004). A eliminação de axônios transitórios e o estabelecimento de uma topografia rudimentar estão

relacionados a expressão de moléculas como as efrinas (Eph), envolvidas principalmente na modulação de mecanismos repulsivos ao crescimento axonal. Efrinas são expressas no CS num gradiente decrescente de posterior para anterior, suprimindo a formação de terminais de axônios originados na retina temporal que expressam receptores Eph na região posterior dessa estrutura (Mellitzer *et al.*, 2000; Debski & Cline, 2002; Knoll & Drescher, 2002; Himanen & Nikolov, 2003; McLaughlin *et al.*, 2003; Rashid *et al.*, 2005; Pfeiffenberger *et al.*, 2006; Willshaw, 2006).

No decorrer do desenvolvimento o padrão de atividade elétrica das células ganglionares da retina contribui para a formação de uma organização topográfica fina (Meister *et al.*, 1991; Debski & Cline, 2002; Chandrasekaran *et al.*, 2005). Células ganglionares vizinhas com padrão de atividade sincrônico, ao ativar células pós-sinápticas, provocam a somação de potenciais pós-sinápticos excitatórios (PPSEs), deflagrando então um processo de estabilização sináptica, que é uso-dependente e compatível com o modelo da sinapse Hebbiana (Hebb, 1949; Katz & Shatz, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Brown & Milner, 2003; Cline, 2003; Murphy, 2003; Ruthazer & Cline, 2004). Além do desenvolvimento de topografia fina no sistema retinotectal, a atividade elétrica dos aferentes determina a segregação dos axônios retinianos em camadas olho-específicas no núcleo

geniculado lateral e o desenvolvimento das colunas de dominância ocular no córtex visual primário (Schmidt, 1985; Katz & Shatz, 1996; Crowley & Katz, 2002; Katz & Crowley, 2002; Horng & Sur, 2006; Huberman *et al.*, 2006; Majewska & Sur, 2006).

Evidências recentes da literatura mostram que tanto a participação das efrinas, quanto a atividade elétrica são fundamentais a organização da topografia de estruturas centrais, de tal forma que em animais nocaute triplo para efrinas A2/A3/A5 observa-se severa alteração da topografia retinogeniculada e retinotectal. Entretanto neste animais nocaute a topografia não é totalmente abolida. Contudo, camundongos nocaute para a subunidade beta 2 dos receptores nicotínicos de acetilcolina associada a mutação das efrinas-As, apresentam defeitos na formação desses mapas topográficos, com um severa alteração nas projeções retinotectais (Pfeiffenberger *et al.*, 2006). Esses dados sugerem que efrinas e atividade elétrica atuem conjuntamente para favorecer o estabelecimento de mapas topográficos.

### 1.3) PERÍODO CRÍTICO E PLASTICIDADE

O período da maturação funcional dos circuitos neurais envolve a correção de erros, e este processo, em geral, requer a atividade neural (Cynader *et al.*, 1990; Shatz, 1992a; Ruthazer & Cline, 2004; Chandrasekaran *et al.*, 2005; Mrsic-Flogel *et al.*, 2005; Chandrasekaran *et al.*, 2007). Durante processos de maturação dos sistemas sensoriais a estimulação visual aumenta a estabilização das árvores axonais e dendríticas que contenham mais sinapses ativas, ao passo que as sinapses inativas são desestabilizadas e eventualmente eliminadas (Horng & Sur, 2006).

Dados sugerem um modelo em que sinaptogênese e maturação sináptica influenciam o crescimento de axônios pela estimulação da formação e extensão de novos ramos e pela seletiva estabilização dos mesmos (Cohen-Cory, 2002; Meyer & Smith, 2006; Ruthazer *et al.*, 2006). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um dos fatores envolvidos nesses processos e tem sido relacionado à modulação do sítio pré-sináptico e à estabilização da arborização axonal (Hu *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de conexões evolui durante uma janela temporal característica de cada espécie, o chamado período crítico (Hensch, 2004). Durante este período, observa-se uma extensa

reorganização das projeções centrais, caracterizada por modificações plásticas dos axônios visuais semelhantes às aquelas observadas em resposta à lesões, modificações do ambiente, alterações no padrão de atividade elétrica, ativação de sistemas de neurotransmissores e/ou mensageiros retrógrados (Constantine-Paton, 1990; Bastos *et al.*, 1999; Campello-Costa *et al.*, 2000; Serfaty *et al.*, 2005; Campello-Costa *et al.*, 2006).

A modulação da plasticidade do desenvolvimento está intimamente relacionada à formação de espículas dendríticas (Hering & Sheng, 2001; Kasai *et al.*, 2003; Ruthazer *et al.*, 2003). Dados recentes da literatura mostram que a formação de espículas em dendritos apicais no córtex visual em desenvolvimento é dependente da ação do ativador tecidual de plasminogênio (tPA) dentro do período crítico do desenvolvimento (Mataga *et al.*, 2002; Mataga *et al.*, 2004). Além disso, outros dados demonstram que o tPA também está envolvido em eventos de aprendizado e memória no cerebelo (Seeds *et al.*, 2003), no estriado e hipocampo (Pawlak *et al.*, 2002). O tPA ainda é capaz de induzir a ativação de metaloproteases e desta forma participar de processos de desenvolvimento e plasticidade (Dzwonek *et al.*, 2004).

Fenômenos de plasticidade uso-dependente utilizam receptores N-metil- D-aspartato (NMDA) para o glutamato (Bliss & Collingridge,

1993; Katz & Shatz, 1996; Shatz, 1996). A ativação destes receptores produz um influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nas espículas dendríticas pós-sinápticas o que consolida e fortalece os aferentes com atividade temporal relacionada. Por outro lado, a variação na concentração pós-sináptica de  $\text{Ca}^{2+}$  também dispara um processo que enfraquece e eventualmente desconecta os aferentes cujo padrão temporal de atividade não seja correlacionado com a célula pós-sináptica (Katz & Shatz, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Murphy, 2003), corroborando a teoria hebbiana (Hebb, 1949). Esses mecanismos estão intimamente relacionados aos fenômenos de potenciação de longa duração (LTP) e depressão de longa duração (LTD), observados nos fenômenos de aprendizado e memória (Mu & Poo, 2006).

Um mecanismo essencial para a expressão de muitas formas de LTP e LTD depende da inserção de receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) para o glutamato na membrana pós-sináptica (Malinow & Malenka, 2002; Malenka, 2003). Outras evidências apontam que a proteína de densidade pós-sináptica de 95 kDa (PSD-95), uma ancoradora de receptores AMPA, interfere com estabilização sináptica e estrutura das espículas dendríticas (Ehrlich & Malinow, 2004; Ehrlich *et al.*, 2007).

Dados sugerem uma correlação entre a LTD e a eliminação de sinapses transitórias no colículo superior (Lo & Mize, 2000) e neocórtex (Malenka, 1994). Dados recentes mostram que a abertura dos olhos e o início da estimulação visual são necessários ao ajuste fino das conexões visuais (Lu & Constantine-Paton, 2004). Lu & Constantine-Paton (2004) demonstraram que a estimulação sensorial visual que ocorre durante o período de abertura dos olhos coincide com a maturação das subunidades do receptor NMDA. Num período precoce, que sucede a abertura dos olhos, e logo 6 horas após este evento, há a detecção de correntes mediadas por receptores NMDA que contenham a subunidade NR2B, bem como a ativação de sinapses silenciosas. Após as primeiras 24 horas que sucedem a abertura dos olhos há a indução da troca das subunidades deste receptor, que muda de NR2B para NR2A. Esta mudança reflete a potenciação sináptica que ocorre neste período e reforça o processo de refinamento destas conexões em seus alvos apropriados (Lu & Constantine-Paton, 2004).

A plasticidade não se limita aos períodos precoces do desenvolvimento, embora seja mais evidente nesses estágios. Trabalhos recentes indicam que a experiência prévia aumenta a plasticidade no córtex visual. Isso acontece em casos de privação monocular (PM), procedimento que induz uma mudança nas colunas de dominância ocular (CDO) a favor do olho aberto, resultando em

alterações na conectividade cortical (Crowley & Katz, 2000, 2002). Hofer e colaboradores (2006) mostraram recentemente que ratos submetidos à privação monocular dentro do período crítico do desenvolvimento apresentavam modificações no padrão de conectividade das CDO. Estes animais quando re-submetidos à privação monocular na vida adulta respondiam com grande reorganização, sugerindo que PM prévia facilita a plasticidade em adultos (Hofer *et al.*, 2006).

Muitos processos podem estar relacionados a modificações resultantes da privação monocular, entre eles a atividade proteolítica do tPA que induz alterações nas espículas dendríticas das áreas corticais relacionadas as CDO (Mataga *et al.*, 2004). Adicionalmente, a ativação de genes imediatos em áreas corticais requer experiência sensorial e induz o aumento de eficácia de sinapses, antes inativas (Wang *et al.*, 2006).

#### **1.4) UMA VISÃO GERAL SOBRE A MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)**

O papel das moléculas da matriz extracelular foi inicialmente descrito no sistema imunológico, onde participam de uma série de eventos biológicos que incluem desde a diferenciação, adesão celular, até processos de migração de células do sistema vascular para o interior dos sítios de inflamação. A matriz extracelular influencia diretamente o comportamento de células migratórias e funciona ainda como um reservatório de fatores, tais como fatores de crescimento, citocinas, proteases e seus inibidores, que por sua vez podem influenciar a resposta inflamatória (Vaday & Lider, 2000; Vaday *et al.*, 2001; Parks *et al.*, 2004).

Células do sistema imune, como os leucócitos, secretam citocinas, quimiocinas e enzimas de degradação que afetam o comportamento da MEC, exercendo assim efeito modulatório sobre a inflamação (Vaday & Lider, 2000). Evidências sugerem que vários hormônios possam produzir um aumento da expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular, determinando uma ligação entre o sistema imune e o eixo neuro-endócrino (Savino *et al.*, 1999; Savino & Dardenne, 2000).

A relação existente entre moléculas do sistema imunológico e o sistema nervoso central tem sido cada vez mais evidente, uma vez que dados recentes da literatura indicam que neurônios expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) *in vivo* e que este fato tem íntima relação, não só com a capacidade imunológica do sistema nervoso central, mas também com o próprio desenvolvimento do cérebro, incluindo a diferenciação neuronal e a plasticidade neural, (Boulanger & Shatz, 2004).

No sistema nervoso central moléculas da matriz extracelular são secretadas por neurônios e pela glia, e se acumulam no espaço extracelular ou permanecem associadas a membrana celular a fim de regular diversos processos pré e pós-sinápticos (Ethell & Ethell, 2007). Grupos organizados de células são envoltos por moléculas da matriz extracelular (MEC), tais como colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas, formando um arcabouço para os variados tipos celulares. Moléculas da MEC não somente interagem entre si como também ativam vias de sinalização intracelulares, que coordenam proliferação, migração e diferenciação celular. Participam ainda da plasticidade neural durante o desenvolvimento, da regeneração do sistema nervoso, e de processos fisiológicos de plasticidade sináptica que compartilham mecanismos celulares e moleculares similares aos

descritos nos fenômenos de aprendizado e memória (Dityatev & Schachner, 2003; Dityatev *et al.*, 2006; Dityatev & Schachner, 2006).

A matriz extracelular está envolvida, assim como as moléculas de membrana celular, fatores trópicos e tróficos, campos elétricos e atividade neural, nos processos que permeiam o desenvolvimento do sistema nervoso dos vertebrados, onde o axônio de cada neurônio de cada neurônio precisa encontrar o seu trajeto específico para um alvo final onde a formação sináptica ocorrerá (Letourneau *et al.*, 1994; Yamagata *et al.*, 1995; Yamagata & Sanes, 1995; Anton *et al.*, 1999; Skaper *et al.*, 2001; Hynds & Snow, 2002; Gaillard *et al.*, 2005; Wen & Zheng, 2006).

Evidências sugerem que uma das maiores classes de moléculas que possuem atividade promotora do crescimento de neuritos são as constituintes da MEC (Sakaguchi & Radke, 1996; Akins & Biederer, 2006). As funções das moléculas da matriz extracelular no desenvolvimento do SNC vêm sendo identificadas a medida que estudos demonstram que moléculas da MEC, tais como o sulfato de condroitina, participam da formação de redes peri-neuronais. Ensaio feitos em culturas tratadas com condroitinase (ABC) induzem uma redução evidente dos componentes dessas redes. E ainda a remoção das redes peri-neuronais não afeta somente a distribuição de contatos inibitórios peri-somáticos, mas também aumenta a excitabilidade de

interneurônios em cultura, implicando que moléculas da MEC estejam envolvidas na regulação da atividade neuronal (Dityatev *et al.*, 2007). Outros dados indicam que o sulfato de condroitina impede a recuperação de áreas denervadas por lesão. O tratamento com condroitinase possibilita a indução de modificações anatômicas caracterizadas por uma ocupação de terminações em áreas previamente denervadas (Massey *et al.*, 2006).

Outra molécula de matriz extracelular bastante associada ao desenvolvimento do cérebro é a trombospondina, que tem sido relacionada a processos de sinaptogênese no SNC. É secretada por astrócitos e induz a formação de sinapses funcionais ao longo do desenvolvimento tanto no córtex cerebral quanto no colículo superior em desenvolvimento (Christopherson *et al.*, 2005). Além disso, participa de processos de plasticidade em resposta a lesão, mostrando que moléculas da MEC participam tanto de processos de desenvolvimento quanto de eventos de plasticidade induzida por lesão (Tran & Neary, 2006).

Entre as moléculas da MEC envolvidas em processos fisiológicos neuronais pode-se destacar ainda o papel da laminina, integrinas, reelina, proteoglicanas ligadas à heparan sulfato, e mais recentemente, as metaloproteases (Nakagami *et al.*, 2000; Sternlicht & Werb, 2001; Johnson *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2006; Shi & Ethell,

2006; Van Vactor *et al.*, 2006; Gonthier *et al.*, 2007; Qiu & Weeber, 2007).

As interações celulares mais bem estudadas envolvendo a MEC no SNC são de natureza adesiva, mediadas pela ligação entre moléculas de superfície celular específicas e domínios de ligação dos componentes da MEC. A adesão célula- substrato também é necessária para a morfogênese neural, em processos como migração de precursores neurais e na extensão das extremidades dos cones de crescimento e dendritos {Sternlicht, 2001 #14206; Mott, 2004 #14628}.

Dados da literatura sugerem que moléculas que medeiam interações célula-MEC exercem seus efeitos através de vias de segundos mensageiros, como o  $\text{Ca}^{2+}$ , proteínas cinases, fosfatos de inositol, entre outras. Essas interações geram os sinais que regulam diretamente a polimerização dos componentes do citoesqueleto e a associação do citoesqueleto com a membrana celular, produzindo extensão-adesão de lamelipódio e filopódio, fenômeno que gera força mecânica para o crescimento neurítico. Esses sinais podem também agir ao nível nuclear para alterar a expressão gênica de proteínas envolvidas na migração neuronal e morfogênese (Figura 3) (Gaillard *et al.*, 2005; Wen & Zheng, 2006).

Além disso, moléculas da matriz extracelular têm sido relacionadas ao desenvolvimento e plasticidade (Mataga *et al.*, 2002; Berardi *et al.*, 2004; Mataga *et al.*, 2004; Oray *et al.*, 2004). Esses achados correlacionam diretamente a MEC a eventos de plasticidade sináptica.

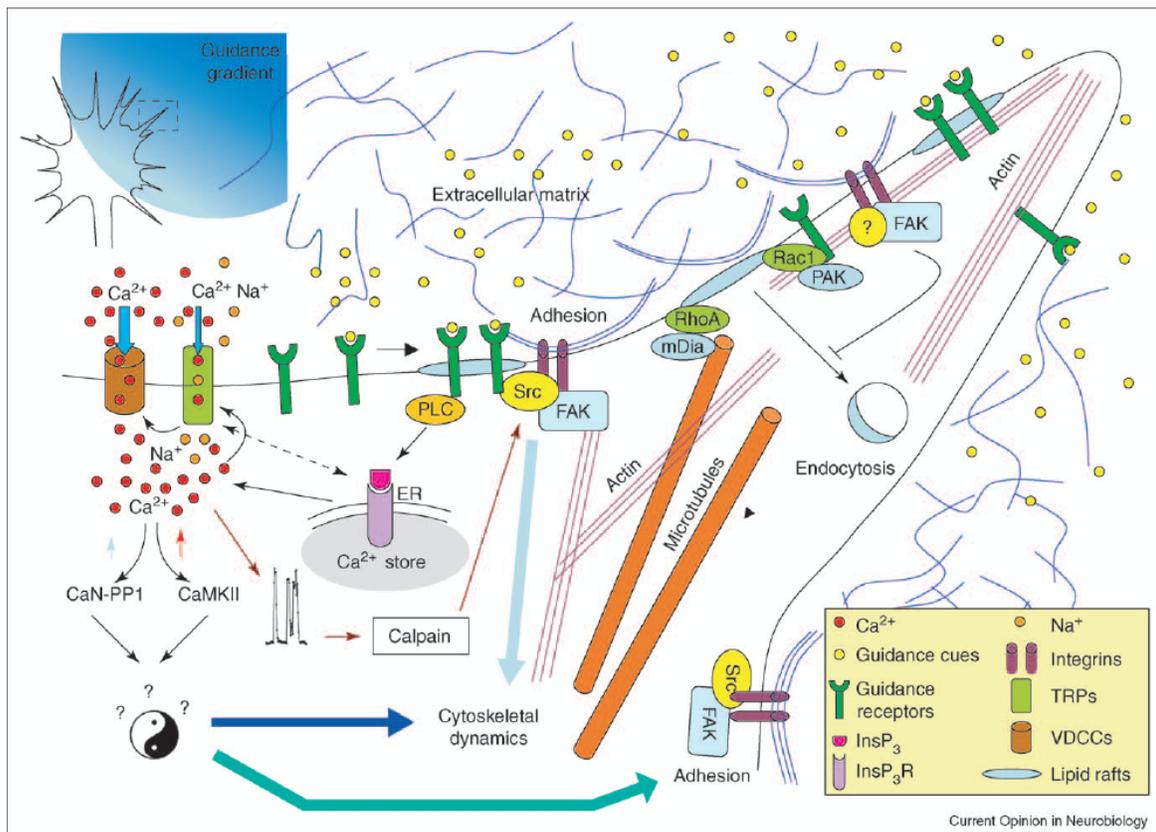


Figura 3: Esquema ilustrando a complexa sinalização que controla a resposta de um cone de crescimento a pistas de orientação a sua migração. Notar as interações com a matriz extracelular mediadas por receptores de membrana celular (integrinas- em lilás) que sinalizam com proteínas intracelulares que controlam a polimerização do citoesqueleto. Observar ainda as vias de sinalização que induzem a fosforilação ou defosforilação de proteínas intracelulares, o equilíbrio entre esses dois eventos induz a estabilização ou desestabilização do neurito. Modificado de Wen & Zheng, 2006.

## 1.5) METALOPROTEASES

### 1.5.1) ASPECTOS GERAIS

Metaloproteases (MMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco que degradam a maior parte das moléculas da matriz extracelular, possibilitando a inativação de moléculas inibitórias ao crescimento axonal, e participam ainda da regeneração induzida por lesão no sistema nervoso central (Sternlicht & Werb, 2001; Kaczmarek *et al.*, 2002; Yong, 2005; Ethell & Ethell, 2007). A primeira identificação de metaloproteases foi descrita em 1962 em estudos que apontavam a atividade de uma enzima que funcionava em pH neutro e que induzia a clivagem do colágeno a fim de possibilitar a remodelação de tecidos (Gross & Lapiere, 1962). Posteriormente, outras MMPs foram identificadas e apresentaram a capacidade de degradar todos os componentes da MEC, cada uma de acordo com seu substrato específico (Sternlicht & Werb, 2001; Mott & Werb, 2004).

A participação de MMPs é bem descrita em processos fisiológicos de angiogênese, implantação do blastocisto, ovulação, remodelação de feridas, metástase e invasão tumoral (Wright & Harding, 2004). Metaloproteases têm sido relacionadas a outras importantes funções neurofisiológicas que incluem direcionamento axonal, remodelamento

sináptico, e fenômenos de potenciação de longa duração (LTP) (Webber *et al.*, 2002; McFarlane, 2003; Hehr *et al.*, 2005; Meighan *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2006; Bozdagi *et al.*, 2007). Szklarczyk e colaboradores (2002) sugerem que o mRNA da MMP-9 tem localização dendrítica, o que fortalece a idéia de que moléculas da MEC contribuam para o ajuste das conexões neurais (Szklarczyk *et al.*, 2002).

A superfamília das metaloproteases inclui as MMPs e as desintegrinas da família das Adams (uma desintegrina e metaloprotease). Até o momento 28 isoformas de metaloproteases de mamíferos já foram descritas, as MMPs de 1 a 28, dentre as quais somente 24 têm seu substrato específico identificado, 23 dessas isoformas já foram descritas em ratos (Parks *et al.*, 2004; Yong, 2005; Ethell & Ethell, 2007). Os diferentes domínios das MMPs permitem que elas sejam subclassificadas em outras categorias como se pode ver na Figura 4. Das isoformas descritas em mamíferos apenas seis são associadas à membrana (MT-MMP) por um domínio transmembrana ou por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI), já a maior parte das MMPs são secretadas (Parks *et al.*, 2004; Yong, 2005; Ethell & Ethell, 2007).

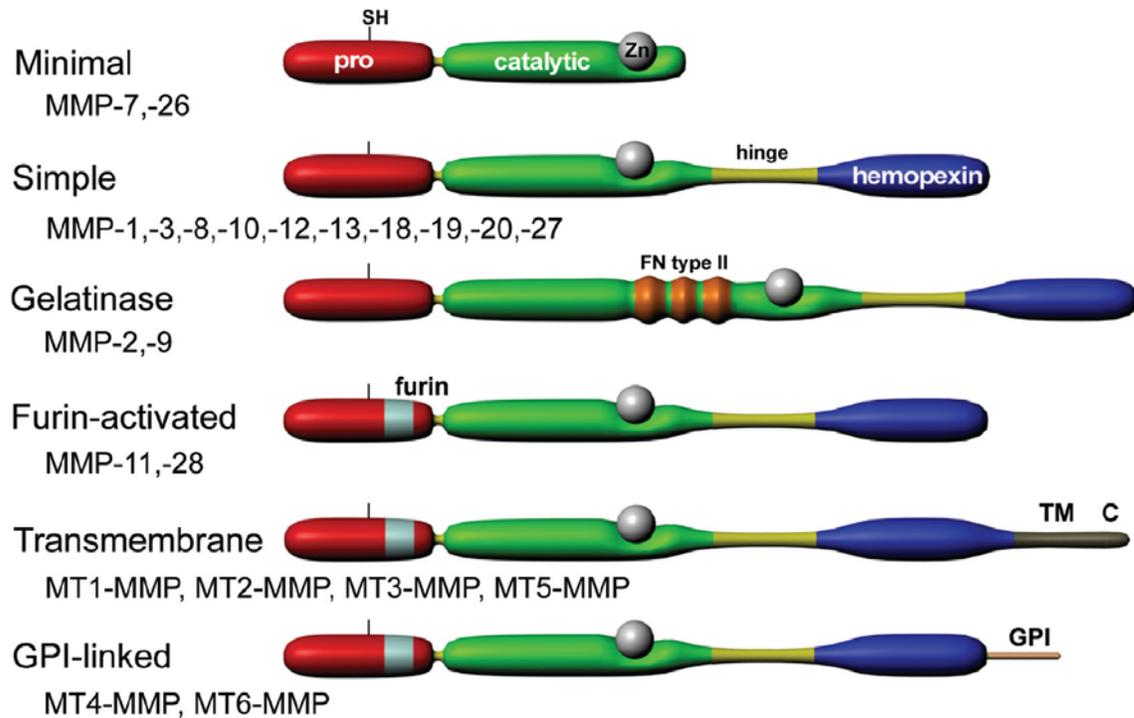


Figura 4: Subdivisão das metaloproteases baseada nos diferentes domínios. Pode ser observada na figura a nomenclatura usual para cada MMP. Pro (pró-domínio); SH (grupo cisteína-tiol); catalytic (domínio catalítico); Zn (zinco no domínio catalítico); hinge (dobradiça); hemopexin (domínio hemopexina); FN type II (inserções da fibronectina tipo II); furin (sítios de clivagem suscetíveis a furina); TM (domínio transmembrana); C (cauda citoplasmática); GPI (ligante de glicosil fosfatidil inositol); MT-MMP (tipo associado a membrana). Os pesos moleculares variam de 28 kDa da MMP-7 até 92 kDa da MMP-9 humana (nas pró-enzimas). Retirado de Ethell & Ethell, 2007.

As MMPs possuem três domínios estruturalmente bem preservados: (1) domínio catalítico, responsável pela hidrólise do substrato; (2) domínio amino-terminal, também conhecido como pró-peptídeo, composto por aproximadamente 80 aminoácidos, responsável pelo estado de latência das enzimas e (3) domínio carboxi-terminal ou domínio hemopexina, ainda de função não totalmente conhecida mas que parece contribuir para a especificidade ao substrato (Ethell & Ethell, 2007).

MMPs podem estar associadas à membrana celular com o objetivo de melhorar a eficácia da proteólise pela sinalização através das MT-MMPs, moléculas de adesão celular, proteoglicanos de superfície celular e integrinas. Acredita-se que MMPs pericelulares sejam os mediadores fisiológicos da degradação e do *turnover* de todas as moléculas da MEC. Desta maneira, peptídeos liberados pela proteólise parcial dessas moléculas poderiam regular a atividade celular. Fatores de crescimento, receptores e moléculas de adesão celular também são substrato para MMPs (Figura 5) (Mott & Werb, 2004). De fato, Lee e colaboradores demonstraram que pró-formas de BDNF e NGF são clivadas e ativadas pelas MMPs -3 e -7 (Lee *et al.*, 2001); formas ativas das MMPs- 2, -3, -7, e particularmente a -9, podem induzir a ativação de TrkB em neurônios corticais cultivados (Vogt *et al.*, 2000). O pró-TNF-alfa também é alvo de várias MMPs,

após a ativação pelas MMPs e liberação deste no cérebro, o TNF-alfa tem importantes efeitos na atividade sináptica (Sternlicht & Werb, 2001).

### 1.5.2) REGULAÇÃO DA ATIVIDADE METALOPROTEASE

MMPs são mantidas nos tecidos sob a forma de zimógenos inativos, denominados pró-MMPs. A atividade das MMPs é altamente regulada através de basicamente três mecanismos: (1) regulação da transcrição gênica (já que muitas MMPs são expressas somente após ativação celular ou estimulação), (2) regulação da atividade pró-enzima (uma vez que são secretadas como zimógenos necessitam de processamento para expor o sítio catalítico) e (3) através da inativação pelas TIMPs (seus inibidores fisiológicos) (Figura 5). Já foram descritas 4 TIMPs, de 1-4, além da  $\alpha$ -2 macroglobulina sérica, que é responsável pela inibição das metaloproteases no sangue e no sistema linfático (Crocker *et al.*, 2004; Parks *et al.*, 2004). As TIMPs -1, -2 e -4 são proteínas secretadas, ao passo que a TIMP -3 está associada à MEC através da conjugação a glicosaminoglicanos sulfatados (Yu *et al.*, 2000; Crocker *et al.*, 2004), para melhor compreensão ver Quadro 1. O desequilíbrio entre a atividade MMPs/TIMP resulta em processos patológicos tais como oncogênese, assim como a proteólise excessiva resulta em várias patologias cerebrais (Crocker *et al.*, 2004; Yong, 2005).

Dentre outros mecanismos adicionais que regulam a atividade metaloprotease, pode-se citar a internalização, e ainda modificações

pós-translacionais (glicosilação, por exemplo), estoque de MMPs em grânulos de neutrófilos, compartimentalização e disponibilidade de substratos.

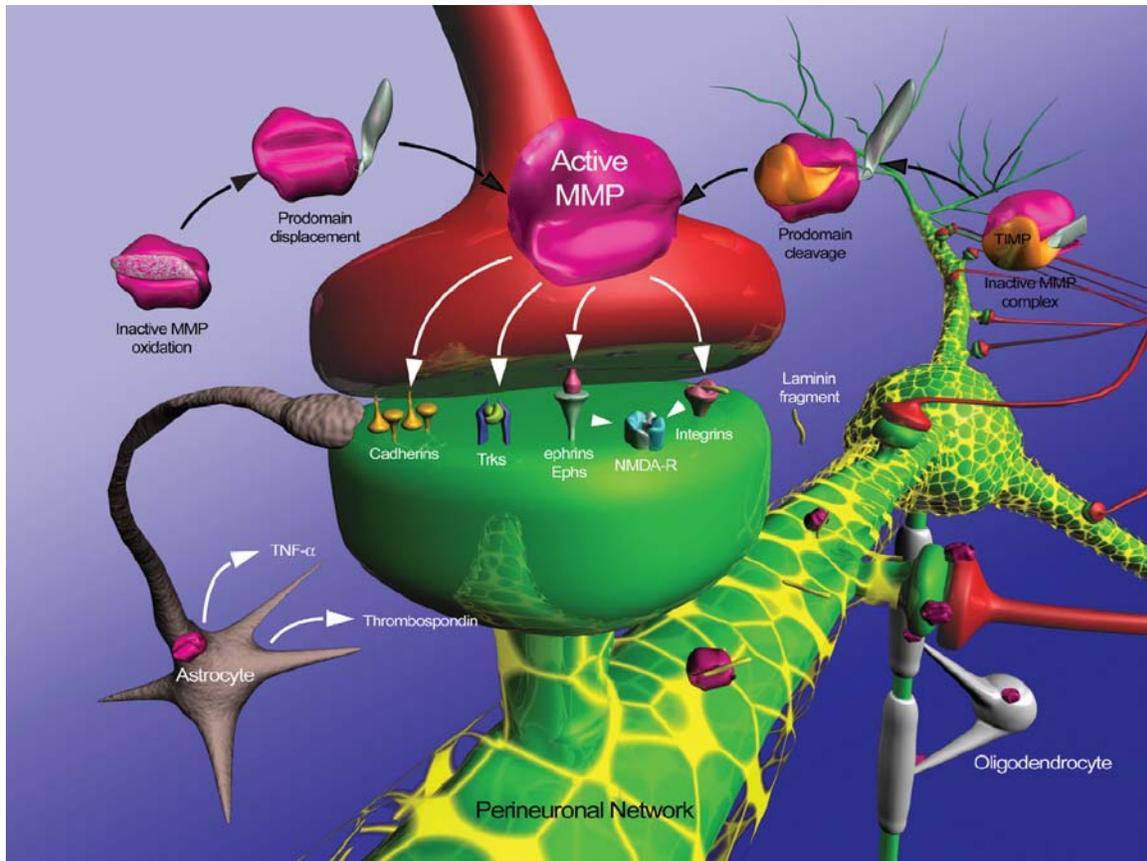


Figura 5: Múltiplos alvos das MMPs nas sinapses. Representação esquemática de uma sinapse excitatória (vermelho), espícula dendrítica pós-sináptica (verde), rede peri-neuronal (mesclado verde e amarelo), astrócitos apresentando terminação peri-sináptica (cinza), prolongamento de um oligodendrócito mielinizante (branco). Podemos observar no canto esquerdo acima uma pró-MMP sendo ativada por troca de um resíduo cisteína que libera o pró-domínio e expõe o sítio catalítico da MMP. Já no canto direito acima, observa-se o complexo inativo TIMP-MMP, que ao se desligar torna a MMP ativa. As moléculas de sinalização sináptica que podem ser reguladas pelas MMPs, incluem: caderinas, BDNF/TrkB, efrinas/Ephs, laminina/integrinas, que podem modificar a atividade do receptor NMDA. MMPs também induzem ativação e liberação de TNF-alfa. Astrócitos secretam trombospondina que inibe a ativação de MMP-2 e MMP-9 e, ainda, aumentam a densidade sináptica. Retirado de Ethell & Ethell, 2007.

<b>TIMP</b>	<b>Tamanho da proteína (kDa)</b>	<b>Localização extracelular</b>	<b>Inibe</b>	<b>Papéis funcionais adicionais</b>
TIMP-1	28.5	secretada	Todas as MMPs, MT1-MMP, ADAM-10	Neurotrofismo Translocação nuclear Ativação de genes imediatos
TIMP-2	21	secretada	Inibe todas as MMPs testadas	Neurotrofismo Ativadora da pro-MMP-2, MT-MMP-1 Inibidor de angiogênese
TIMP-3	24-36	membranar	MMP-1, -2, -3, -7, -9 MP-14 ADAM- 10, -12S, -17 ADAM- TS4, -TS5	Antagonista do VEGF-R2 Estabilização da morte Supressor tumoral
TIMP-4	23	secretada	MMP-1, -2, -3, -7, -9	Não determinado até o momento

Quadro 1: Mostra as características das TIMPs identificadas em mamíferos. (Modificado de Crocker *et al*, 2004).

### **1.5.3) PAPEL DAS MMPs NO DESENVOLVIMENTO, PLASTICIDADE E REGENERAÇÃO DO SNC**

A literatura aponta para o papel das MMPs e TIMPs no SNC durante o seu desenvolvimento, bem como durante processos de plasticidade sináptica. Vaillant e colaboradores (1999) demonstraram que o padrão de expressão de MMPs, bem como de seus inibidores no cerebelo do rato durante o desenvolvimento pós-natal, são fundamentais a formação dessa estrutura (Vaillant *et al.*, 1999). Estes autores mostraram ainda, que a deficiência de MMP-9 produz alterações importantes no crescimento de axônios e no processo de migração, interferindo de maneira significativa no desenvolvimento do cerebelo (Vaillant *et al.*, 2003).

Outros grupos demonstraram que a inibição da atividade proteolítica das MMPs, durante processos de migração celular, culmina na inadequada orientação dos axônios das células ganglionares da retina na direção do seu território alvo. Isso ocorre de tal forma que a inibição dessas moléculas altera os pontos de decisão da rota que estes axônios devem seguir ao longo das vias ópticas (Webber *et al.*, 2002; Hehr *et al.*, 2005). Mais recentemente Gonthier e colaboradores mostraram que metaloproteases participam do desenvolvimento do córtex cerebral através da interação com as semaforinas (Gonthier *et*

*al.*, 2007). Esses dados em conjunto, corroboram a idéia que as MMPs são fundamentais aos processos de desenvolvimento do SNC.

Outras evidências indicam a participação dessas moléculas no processo de estabilização sináptica, como na potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo, de tal forma que a inibição das metaloproteases abole a formação da fase tardia da LTP (L-LTP), tanto em animais jovens quanto em adultos (Nagy *et al.*, 2006). Outros estudos confirmam que a indução de potenciação de longa duração no hipocampo é dependente da atividade metaloprotease relacionada a atividade do receptor NMDA (Bozdagi *et al.*, 2007). Meighan e colaboradores apontam evidências que os mRNAs das MMP-3 e -9 são induzidos no hipocampo durante o aprendizado, e que a indução dessas proteínas pode ser parcialmente bloqueada pelo bloqueio de receptores NMDA (Meighan *et al.*, 2006). Esses dados em conjunto indicam que períodos de aquisição e retenção de memória de novas informações requerem a remodelagem da MEC.

Bilousova e colaboradores (2006) demonstraram que a MMP-7 pode romper a estabilidade das espículas dendríticas maduras resultando em modificações na morfologia destas e na organização do citoesqueleto, de tal forma que a MMP-7 transforma rápida e reversivelmente uma espícula madura em imatura, sendo estas modificações mediadas pela ativação de receptores NMDA (Bilousova

*et al.*, 2006). Monea e colaboradores (2006) identificaram a MT5-MMP nas extremidades dos cones de crescimento dos neurônios em desenvolvimento bem como nas sinapses de neurônios maduros, no cerebelo e hipocampo de ratos, onde regulam a orientação axonal e remodelamento sináptico através de proteólise de caderinas ou de outras moléculas da MEC, bem como de moléculas de adesão celular (Monea *et al.*, 2006).

Metaloproteases estão envolvidas não só em eventos de desenvolvimento e plasticidade sináptica, mas também com processos de regeneração do sistema nervoso central e periférico (Figura 6) (Power *et al.*, 2003; Wells *et al.*, 2003; Demestre *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005; Demestre *et al.*, 2005). Após lesões no SNC a expressão de MMPs é regulada de diversas formas. Uma delas é pela interferência da Interleucina-1 (IL-1), que tem sua expressão aumentada após lesões. Em cultura já foi identificado que a IL-1 aumenta a expressão de MMP-9, já que a região promotora de muitas MMPs contém elementos de ligação para fatores de transcrição regulados pela IL-1 (Gottschall & Deb, 1996; Vecil *et al.*, 2000). A aplicação local de antagonistas de IL-1 reduziu a expressão de MMP-9. Outros mecanismos de regulação envolvem a regulação da TIMP-1 que também contém os elementos de regulação pelos fatores de transcrição da IL-1 (Vecil *et al.*, 2000). A figura 6 mostra a

participação dessas moléculas em diferentes eventos do desenvolvimento e da regeneração.

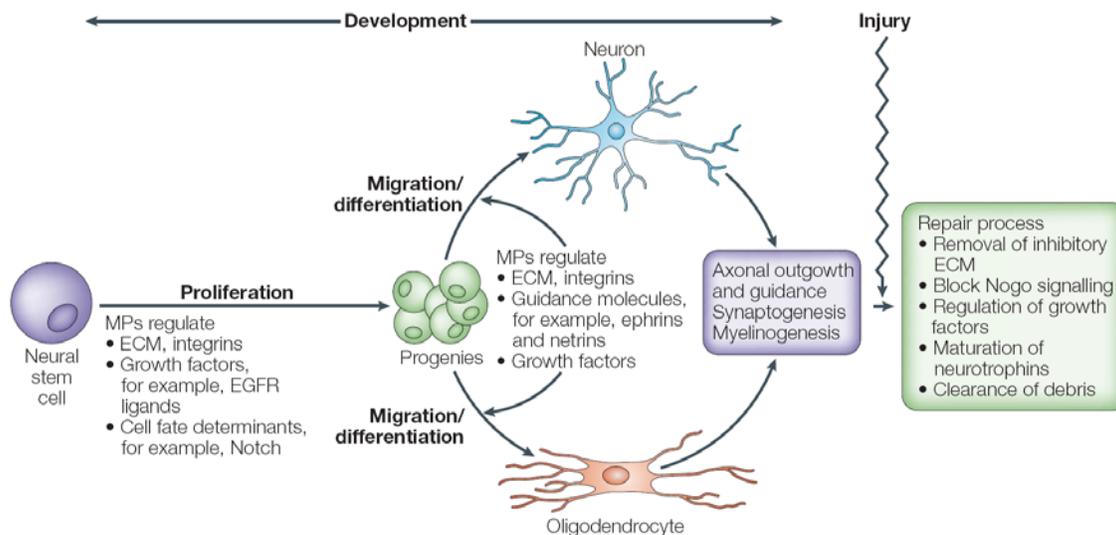


Figura 6: MMPs regulam eventos de desenvolvimento e regenerativos no SNC. A célula representada em lilás mimetiza uma célula-tronco do sistema nervoso, que prolifera (em verde) e migra e em seguida se diferencia em neurônios ou em oligodendrócitos. MMPs regulam esses processos agindo sobre diversas moléculas,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

## 1.6) PROJEÇÕES RETINOTECTAIS COMO MODELO DE PLASTICIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A via retinotectal de vertebrados mamíferos e não-mamíferos tem sido extensamente utilizada como modelo biológico para o estudo da formação de especificidade das conexões neuronais e no estudo da neuroplasticidade durante o desenvolvimento e após lesões do SNC (Lund *et al.*, 1980; Constantine-Paton *et al.*, 1990; Ruthazer & Cline, 2004; Serfaty *et al.*, 2005; Campello-Costa *et al.*, 2006; Ruthazer *et al.*, 2006).

Em roedores, as projeções da retina sofrem um progressivo refinamento entre a primeira e a segunda semana pós-natal quando os axônios retinianos apresentam um padrão morfológico semelhante ao de animais adultos (Land & Lund, 1979; Godement *et al.*, 1984; Jeffery, 1984; Serfaty & Linden, 1994; Itaya *et al.*, 1995). Na Figura 7, é possível observar, através da injeção de um traçador anterógrado, a peroxidase de raiz forte (HRP), que as projeções dos axônios retinotectais ipsolaterais sofrem um processo de regressão seletiva entre os dias pós-natal 0-10, onde são identificados aglomerados de marcação terminal localizados em uma região profunda das camadas visuais do colículo superior (Land & Lund, 1979; Serfaty & Linden, 1994; Serfaty *et al.*, 2005) (Figura 7).

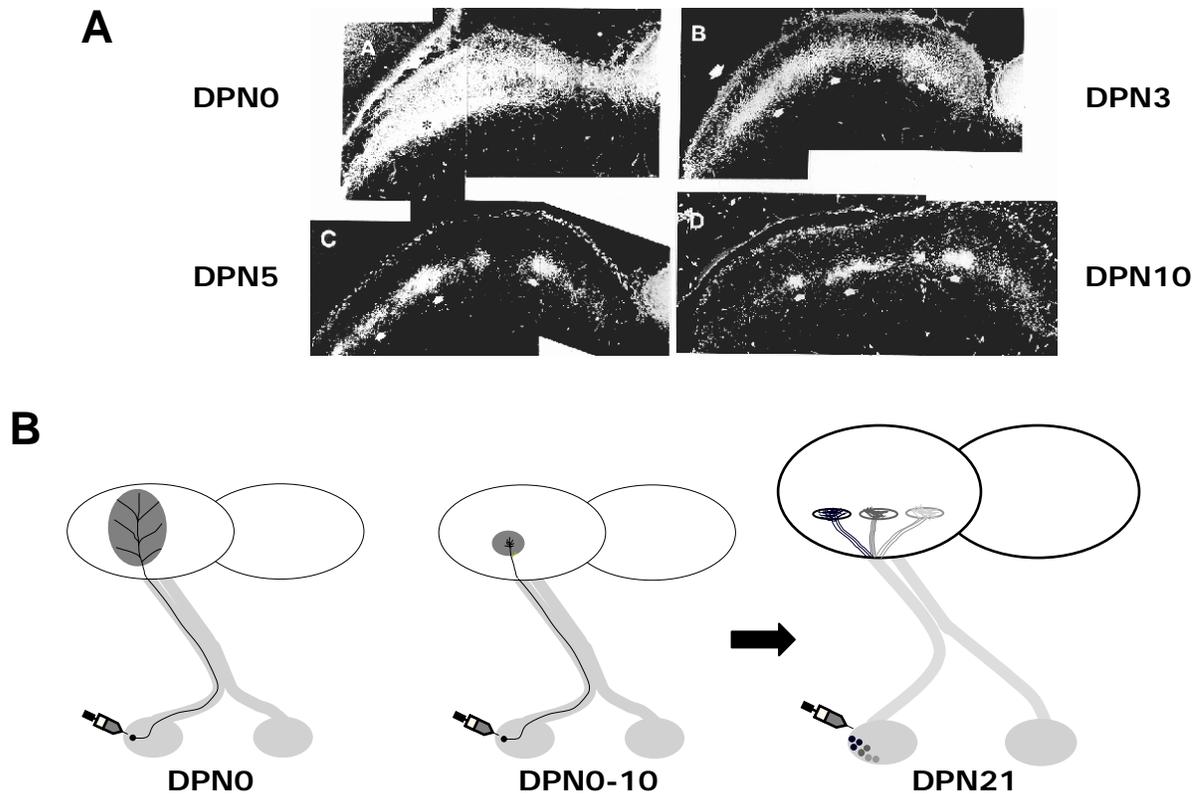


Figura 7: Fotomicrografias da projeção retinotectal ipsolateral marcada com HRP em microscopia de campo escuro mostrando o refinamento laminar topográfico dos axônios retinianos (A). Em A (cortes em plano coronal), animal em DPN0 mostrando a inervação ipsolateral que ocupa toda a extensão dorsoventral (a) do colículo superior. Em DPN3 a projeção ipsolateral está mais restrita a metade ventral do SGS (b). Em DPN5 aparecem os primeiros aglomerados de marcação de HRP na região ventral do SGS (c). Em DPN10 o padrão de marcação é semelhante ao do animal adulto caracterizado pela presença de aglomerados de marcação terminal na borda ventral do SGS (d). Em B, esquema para facilitar a compreensão do refinamento topográfico observado no CS durante o desenvolvimento. Adaptado de Serfaty & Linden, 1994.

As camadas superficiais do CS são um bom modelo de estudo do desenvolvimento sináptico pois são fáceis de identificar em qualquer idade e apresentam padrões sinápticos elaborados que são consistentes com os de animais adultos. Outra vantagem reside no fato da maior parte do desenvolvimento do sistema visual do rato ocorrer no período pós-natal tornando este modelo experimentalmente acessível em qualquer estágio da formação sináptica (Lund & Lund, 1972; Simon & O'Leary, 1992b).

Estudos anteriores mostraram plasticidade da projeção retinotectal ipsolateral após lesões em porções restritas da retina temporal em animais jovens e adultos. Estas lesões induzem a denervação localizada de um setor correspondente no colículo superior contralateral (Lund & Lund, 1976; Frost & Schneider, 1979; Serfaty & Linden, 1991). Nestas condições, as projeções ipsolaterais do olho intacto apresentam respostas plásticas caracterizadas por uma inervação anômala da superfície do colículo (Bastos *et al.*, 1999; Campello-Costa *et al.*, 2000; Serfaty *et al.*, 2005).

Além disso, outros modelos de indução de plasticidade têm sido bastante utilizados quando o objetivo é entender os mecanismos celulares e moleculares que permeiam o comportamento de axônios após uma lesão. A enucleação monocular é capaz de induzir brotamento e reorganização de axônios intactos, não-lesados, da

população ipsilateral no colículo superior contralateral a lesão (Land & Lund, 1979; Lund *et al.*, 1980). Estudo recente aponta que moléculas da matriz extracelular e fatores tróficos participem do brotamento de axônios intactos após denervação do colículo superior por enucleação monocular (Tropea *et al.*, 2003).

## 2) OBJETIVOS

### 2.1) OBJETIVOS GERAIS

Estudar o papel das metaloproteases no sistema visual de ratos *Lister Hooded* e os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento e na reorganização plástica dos axônios retinianos.

### 2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a expressão e a atividade enzimática das metaloproteases no colículo superior de roedores ao longo do desenvolvimento pós-natal.
- Examinar o papel das metaloproteases na reorganização plástica induzida por enucleação monocular em diferentes períodos do desenvolvimento e da idade adulta.
- Investigar o papel das metaloproteases na formação da topografia retinotectal, utilizando bloqueador de MMPs.

### 3) MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos *Lister Hooded* variando entre DPN0 e DPN42 (DPN- dia pós-natal) foram utilizados neste estudo em experimentos de desenvolvimento e de plasticidade induzida por lesão. Todos os procedimentos com animais estão de acordo com as normas do comitê de cuidados de animais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### 3.1) EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA *WESTERN BLOTTING* E ZIMOGRÁFIA

No DPN0, 10, 21 e 42, ratos *Lister Hooded* foram sacrificados pela inalação de clorofórmio, decapitados e tiveram seus colículos superiores dissecados e extraídos para estudos do desenvolvimento das conexões retinotectais em condições normais ou após enucleação monocular. Os colículos superiores foram homogenizados em 100  $\mu$ l de tampão de homogenização (100 mM Tris HCl, pH 7,6; 200mM NaCl; 100 mM  $\text{CaCl}_2$  , 1% Triton-X 100). Os homogenados foram centrifugados a 15000 x g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados para análise. Proteínas foram quantificadas utilizando o

método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

As amostras resultantes foram estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para análise. Cada amostra de 50  $\mu\text{g}$  foi utilizada para investigação por *western blotting* e zimografia. As alíquotas submetidas a *western blotting* receberam tampão de amostra com agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol a 5%) e foram fervidas por 5 minutos antes da utilização.

### **3.2) WESTERN BLOTTING**

Amostras do cóliculo superior foram separadas por SDS/PAGE num gel de acrilamida 10% concentrado e transferidas para membranas PVDF (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). Após o bloqueio dos sítios inespecíficos por 2 horas a temperatura ambiente com 5% de leite Molico desnatado em Tampão tris, pH 7,6 contendo 0,1% Tween 20 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) (TBS-T), as membranas foram incubadas durante uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$  com anticorpo contra metaloprotease-9 obtido em coelho (1:2000, Calbiochem, San Diego, CA, USA). Os anticorpos primários e secundários foram previamente diluídos em TBS-T e leite 5% antes de sua utilização. Após lavagens com TBS-T as membranas foram então incubadas com anticorpo secundário anti- IgG de coelho conjugado a

HRP (1:3000, Amersham Biosciences) em TBS-T durante 2h a temperatura ambiente e reveladas em *hyperfilm* (Amersham) usando kit de quimioluminescência ECL plus (Amersham Biosciences) seguindo as instruções do fornecedor.

### **3.3) ZIMOGRAFIA**

Colículos superiores de animais no DPN0, 10, 21 e 42 foram homogenizados sem a inclusão de inibidores de proteases, e processados como anteriormente descrito (em 3.1). As amostras foram submetidas a zimografia em gel de acrilamida a 10% copolimerizado com 1% de gelatina. As amostras foram preparadas utilizando tampão contendo SDS na ausência de agente redutor. A corrida teve duração total 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 50 mM pH 7,6 contendo 2,5% de triton X-100 por 1 hora, sob agitação, para renaturação das proteínas. Em seguida, os géis foram transferidos para o tampão de lise tris HCl 50 mM pH 7,8 contendo 150 mM NaCl e 5 mM CaCl<sub>2</sub>, a 37<sup>0</sup>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 das metaloproteases foi feita baseada no peso molecular, considerando as formas ativas de cada uma delas, MMP-9 (86 kDa) e MMP-2 (66 kDa), utilizando padrão de peso molecular Bio-Rad.

### **3.4) DENSITOMETRIA**

*Western Blots* e zimogramas foram analisados 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, considerado como 100%.

### 3.5) GRUPOS DE LESÃO

Ratos Lister Hooded no DPN10 foram anestesiados com uma mistura éter/água 1:1 e submetidos a enucleação do olho esquerdo, e mantidos no biotério a diferentes tempos de sobrevivência pós-enucleação. Os olhos foram expostos por meio de uma incisão ao nível do sulco que define as bordas palpebrais. Com o auxílio de uma tesoura de iridectomia a musculatura do olho foi seccionada e o olho foi então removido. Após a remoção do globo ocular, um pedaço de *gel foam* embebido em xilocaína 2% foi inserido na cavidade e as pálpebras seladas com gel de cianoacrilato. Todo o processo durava no máximo 1 minuto.

Após a recuperação da anestesia, os animais eram devolvidos ao biotério. Para detalhamento dos tempos de sobrevivência pós-enucleação ver Quadro 2.

IDADE DOS ANIMAIS	TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA PÓS-ENUCLEAÇÃO						
DPN10	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas

Quadro 2: Mostra os diferentes grupos experimentais pós-enucleação

### 3.6) CONFECÇÃO DO ELVAX COMO FONTE DE LIBERAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

O ELVAX é uma resina industrial composta de acetato de etileno vinil (também conhecido como EVA) e uma de suas aplicações é a possibilidade de usá-lo como fonte de liberação local de drogas e macromoléculas em geral. Vários trabalhos já o utilizaram no SNC, especialmente para promover a liberação de antagonistas de receptores glutamatérgicos ou inibidores de cinases (Cline & Constantine-Paton, 1990b, a; Jablonska *et al.*, 1999; Colonnese *et al.*, 2003). Utilizamos este recurso para promover a liberação intracraniana dos inibidores das MMPs. Para isso, utilizamos a adaptação de um dos protocolos da liberação de macromoléculas via ELVAX descritos por Smith e colaboradores (Smith *et al.*, 1995) detalhado a seguir.

Esferas de ELVAX foram lavadas com trocas diárias de álcool etílico 95% durante 5 a 7 dias sob agitação constante. Ao final deste período os glóbulos foram secos e posteriormente submetidos à dissolução em diclorometano (100mg/ml) sob agitação durante 5 a 10 minutos. Após a dissolução completa acrescentamos 10 $\mu$ l/ml da respectiva droga que é um inibidor de MMPs (250mg/ml ou 1000mg/ml de DM-43 diluído em PBS pH 7,3) ao ELVAX diluído que

era, então, homogeneizado em um agitador de tubos durante 1 minuto. Ao final desta etapa os tubos contendo a mistura Elvax/Diclorometano/Droga foram rapidamente imersos em uma mistura de gelo seco/acetona, por 30 minutos, para que houvesse o congelamento e repolimerização do ELVAX.

Os cilindros de ELVAX, já repolimerizados, foram então transferidos para um congelador a  $-4^{\circ}\text{C}$  onde eram mantidos por pelo menos 5 dias para permitir a evaporação do diclorometano. Após este período, as amostras eram liofilizadas sob vácuo por uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$  a fim de garantir a remoção do diclorometano e água. As amostras de ELVAX eram, então, armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os cilindros de ELVAX eram finalmente incluídos em meio de inclusão (OCT) e cortados a espessura de  $120\mu\text{m}$  em criostato. Os cortes de ELVAX permaneceram a  $-20^{\circ}\text{C}$  desde o momento da criomicrotomia até o momento do implante nos animais.

### **3.7) DM-43**

DM-43 é um inibidor de metaloproteases extraído e seqüenciado do gambá *Didelphis marsupialis*, daí a sigla DM, e o 43 deve-se ao seu peso molecular. DM-43 é uma glicoproteína ácida, cujo ponto

isoelétrico é em torno de 3.5, e foi caracterizado por Perales e colaboradores (Neves-Ferreira *et al.*, 2002; Perales *et al.*, 2005).

DM-43 apresenta capacidade de inibir as atividades letal, hiperalgésica e edematogênica do veneno da *Bothrops jararaca*. A inibição ocorre via formação de complexo não-covalente, onde o domínio metaloprotease das enzimas parece ter papel essencial a interação com a DM-43, já que em ensaios usando a jararagina-C, isto é fragmentos da jararagina desprovidos do domínio metaloprotease, não foi observada interação entre essas moléculas. Corroborando esta hipótese foi visto que a DM-43 interage de maneira eficaz com a botrolisina, enzima que só possui o domínio metaloprotease. Análises estequiométricas indicam que um monômero de inibidor se liga a uma molécula de metaloprotease (Neves-Ferreira *et al.*, 2002).

A identificação, sequenciamento e caracterização da DM-43, mostra que esta molécula apresenta 37% de identidade com a  $\alpha$ 1B-glicoproteína, uma proteína plasmática humana de função desconhecida. Possui três domínios tipo-imunoglobulina homólogos aos domínios da  $\alpha$ 1B-glicoproteína e ambas as proteínas pertencem à superfamília gênica das imunoglobulinas (Neves-Ferreira *et al.*, 2002).

Sabendo-se do potente papel inibidor da DM-43 sobre as metaloproteases, neste trabalho investigamos o seu papel na inibição

das MMPs no colículo superior de roedores nos experimentos de implante subpial de Elvax.

### **3.8) IMPLANTE SUBPIAL DE ELVAX**

Para a realização da cirurgia de implante de ELVAX os animais foram previamente anestesiados em solução de éter e água destilada, na proporção de 1:1, associada à indução de hipotermia no intuito de mantê-los mais tempo sob anestesia. Todo o procedimento cirúrgico não durou mais do que 5 minutos e foi realizado com o animal repousado sobre uma placa fria.

Com o auxílio de lâmina de bisturi de ponta fina (nº 11) foi feita uma abertura longitudinal da pele da cabeça seguida de uma craniotomia usando a sutura coronal como ponto de incisão. Desta forma, uma pequena janela foi aberta, expondo a superfície do mesencéfalo já que em DPN0 os colículos superiores ainda não foram recobertos pelo córtex. Uma fatia de ELVAX, contendo veículo (PBS, pH 7,3) ou DM-43 (250 ou 1000 mg/ml), foi então implantada sobre os colículos superiores e deslizada em direção frontal, sob o córtex. Após o fechamento da janela óssea e fechamento da pele com gel de cianoacrilato, os animais foram colocados em uma câmara aquecida

em banho-maria, a 37°C, por 30 minutos, e retornavam ao biotério após a completa recuperação da anestesia.

### **3.9) UTILIZAÇÃO DE TRAÇADOR**

Utilizamos a peroxidase da raiz forte (HRP tipo VI- Sigma) como traçador neuroanatômico. Este é um traçador comumente empregado para o estudo das projeções visuais. Neste procedimento, a peroxidase é transportada de forma anterógrada pelos axônios das células ganglionares da retina até os núcleos visuais mesencefálicos. Os animais de todos os grupos experimentais foram anestesiados em uma solução de éter e água destilada na proporção de 1:1. Após anestesia, foi feita uma pequena incisão no limbo do olho direito com auxílio de uma lâmina de bisturi # 11. Através desta incisão, foi introduzida a ponta de uma microseringa Hamilton® contendo 4,5µl de uma solução de HRP 30%, DMSO 2% em NaCl 0,9%. Cerca de 18h após a injeção o traçador atinge o colículo superior. Assim, após 24h, os animais foram sacrificados pela inalação de clorofórmio e submetidos à perfusão com soluções fixadoras de aldeídos.

### 3.10) PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após serem sacrificados os animais foram submetidos a perfusão através do coração com solução salina contendo heparina (NaCl 0,9% + heparina 0,1%) durante 5 minutos e em seguida com solução fixadora de *Karnowski* (paraformaldeído 1% e glutaraldeído 2% diluídos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) durante 20 minutos. Imediatamente após a fixação os cérebros foram removidos e transferidos para uma solução crioprotetora de sacarose 20% em tampão fosfato 0,1 M pH7,4 onde foram mantidos durante pelo menos 24h.

No grupo de animais submetidos ao implante de ELVAX inspecionamos a presença da fatia de ELVAX sobre o colículo superior no momento da remoção do cérebro. Em todos os animais utilizados neste estudo as fatias estavam dispostas corretamente sobre a superfície dos colículos. Tais fatias foram removidas antes dos cérebros serem transferidos para a solução crioprotetora.

Após a crioproteção os cérebros foram congelados em gelo seco a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos, e então, transferidos e mantidos em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . Este material foi encaminhado ao criostato e mantido a uma temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos antes do início da criomicrotomia. Foram

realizadas secções coronais de 40  $\mu\text{m}$  e todos os cortes referentes ao colículo superior foram recolhidos.

### **3.11) HISTOQUÍMICA PARA HRP**

Os cortes foram recolhidos em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 e mantidos a 4°C durante 24h. Após esse período foram lavados em 3 trocas de 30 segundos com água milliQ e submetidos a reação histoquímica de acordo com o protocolo de Mesulam (Mesulam, 1978). Os cortes contidos em cada cuba foram então pré-incubados em uma solução com 10ml de tampão acetato 0,2M pH 3,3, 185ml de água milliQ, 180mg de nitroprussiato de sódio e 10mg de tetrametilbenzidina dissolvidos em 2ml de álcool absoluto por 20 minutos. Após este período, acrescentou-se 40 $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrogênio a 30% diluídos em 4ml de água milliQ por mais 20 minutos. A seguir os cortes foram lavados por 1h em 6 trocas de tampão acetato 0,05M, pH 3,3, e montados em lâminas previamente gelatinizadas. As mesmas foram então mantidas ao ar livre durante a secagem por uma pernoite. Após este período, as lâminas foram desidratadas em etanol durante 5 segundos, clarificadas em duas trocas de xilol durante 10 minutos e montadas com lamínulas utilizando Entelan (Merk) como meio de montagem.

### 3.12) ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Analizamos o padrão de distribuição de axônios retinotectais ipsolaterais durante o desenvolvimento normal. Utilizamos neste estudo material proveniente de animais que apresentavam um padrão de marcação com as seguintes características:

- Marcação homogênea no colículo contralateral. Este parâmetro demonstra a distribuição homogênea de traçador após a injeção intraocular;
- Pouco *background* na reação histoquímica, o que revela a ausência de marcação inespecífica;
- Visualização de fibras e campos terminais no *stratum griseum superficiale* (SGS) ipsolateral à injeção do traçador;

O material observado foi analisado e fotografado em microscopia de campo escuro. As imagens foram digitalizadas através de câmera digital *Sound Vision* acoplada a um microscópio óptico *Zeiss*. Todas as imagens foram gravadas no computador com a definição máxima em formato TIFF. Após digitalização, utilizamos o programa *Scion Image* versão beta 4.0.2 para quantificação dos dados obtidos.

### 3.13) QUANTIFICAÇÃO DE AGLOMERADOS DE MARCAÇÃO TERMINAL E DE FIBRAS ESPARSAS IPSOLATERAIS NAS CAMADAS VISUAIS DO CS

O programa *Scion Image* foi utilizado para a quantificação da distribuição de fibras e terminais nos grupos de animais tratados com inibidor da metaloprotease (DM-43), e animais tratados com veículo (PBS).

Este programa foi configurado para atribuir, a *pixels*, valores de 0 a 255 com base na intensidade de marcação de forma que 0 corresponde a *pixels* negros e 255 aos *pixels* brancos. Desta forma, procedemos a análise da densidade óptica das camadas superficiais do CS, notadamente na metade ventral do *stratum griseum superficiale*, incluindo a densidade óptica da marcação terminal e marcação de fibras.

Para a aplicação desta metodologia de quantificação foram utilizados cortes coronais seqüenciais do terço anterior do CS (situados entre 200 e 600 $\mu$ m após o início do colículo), região esta caracterizada por ser o principal alvo das projeções retinianas ipsolaterais.

### 3.14) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os gráficos foram confeccionados através do programa *Graph Pad Prism* versão 3.0 onde utilizamos como teste estatístico a análise de variância (*One-way ANOVA*) com pós-teste de *Tukey* para realizar a comparação grupo a grupo entre três ou mais grupos experimentais. Utilizamos o teste t não- pareado para fazer a comparação simples entre dois grupos no caso dos animais submetidos ao implante de ELVAX. Consideramos como significativos valores com  $p < 0,05$ . Nos histogramas estão representados a média e o erro padrão da média (SEM). O número de amostras de cada grupo experimental (n) está apresentado na legenda de cada gráfico.

## **4) RESULTADOS**

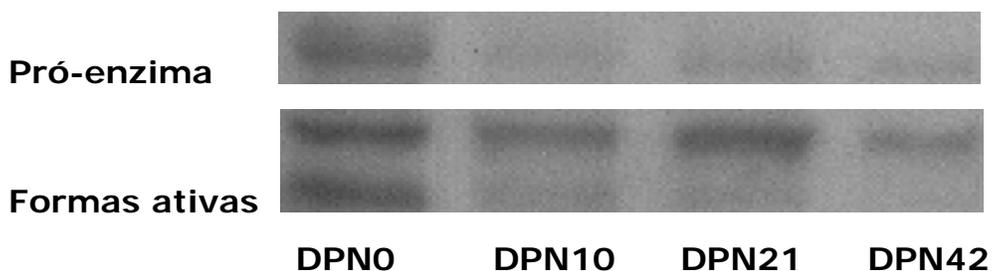
### **4.1) EXPRESSÃO DA MMP-9 NO CS DE ROEDORES DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

O desenvolvimento de axônios retinotectais é caracterizado por um crescimento inicial de colaterais seguido de uma seletiva eliminação de axônios e terminais de regiões topograficamente inapropriadas. Simultaneamente, observa-se formação de árvores axonais ipsolaterais conectadas à região mais ventral do colículo superior, e de terminais contralaterais ocupando toda a região rostro-caudal e dorso-ventral desta estrutura. A maior parte deste processo de desenvolvimento ocorre nas duas primeiras semanas pós-natal e é crucial para o desenvolvimento da topografia entre os axônios retinianos e seus alvos pós-sinápticos (Serfaty & Linden, 1994).

Decidimos avaliar a expressão da metaloprotease-9 (também conhecida como gelatinase B, ou 92 kDa gelatinase/ colagenase tipo IV) no colículo superior em desenvolvimento, em homogenados das camadas superficiais dessa estrutura. Utilizamos amostras de colículos superiores nos DPN0, 10, 21 e 42. Análises, tanto das formas ativas e da pró-enzima, foram identificadas no DPN0 com uma subsequente diminuição no DPN10, um período que antecede a abertura dos olhos.

A expressão de ambas as formas foi observada até o DPN42 (Figura 8).

(A)



(B)

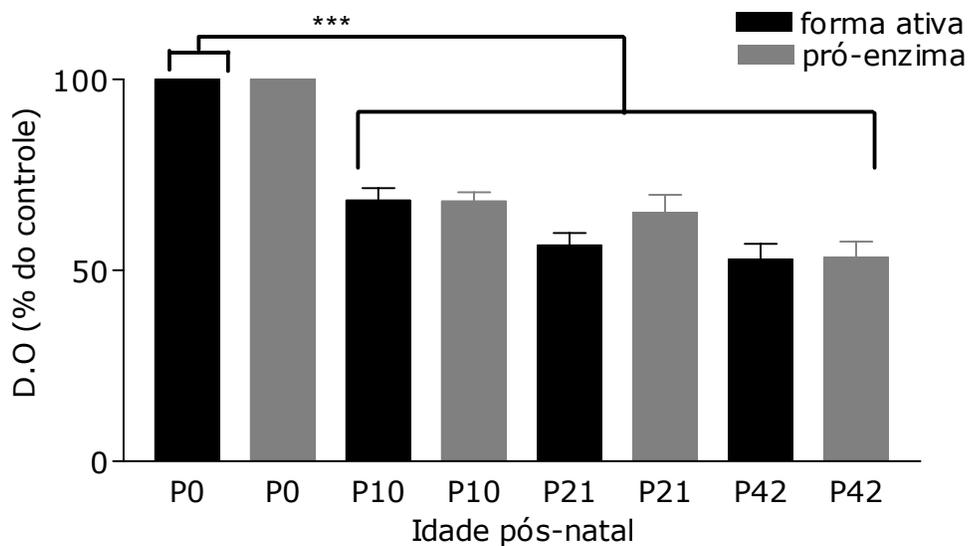


Figura 8: *Western blotting* para MMP-9 no CS de roedores, durante diferentes estágios do desenvolvimento. Observar decaimento da expressão das duas formas da MMP-9 durante o desenvolvimento (A). Quantificação das bandas da pró-enzima (92 kD) e da MMP-9 ativa (86 kD) (n= 4 para todas as idades). (B)- \*\*\*- p< 0.001. D.O (densidade ótica; u.a (unidades arbitrárias)).

Estes resultados sugerem que durante o período crítico do desenvolvimento retinotectal, onde se observa um extenso remodelamento sináptico que resulta na eliminação de axônios transitórios e na elaboração de conexões topograficamente organizadas, observa-se uma grande expressão da MMP-9 tanto na sua forma ativa quanto na de zimógeno sugerindo um papel desta molécula de matriz extracelular no desenvolvimento destas conexões.

#### **4.2) ANÁLISE ZIMOGRÁFICA DA ATIVIDADE GELATINASE DA METALOPROTEASE-9 NO COLÍCULO SUPERIOR EM DESENVOLVIMENTO E NO ANIMAL ADULTO**

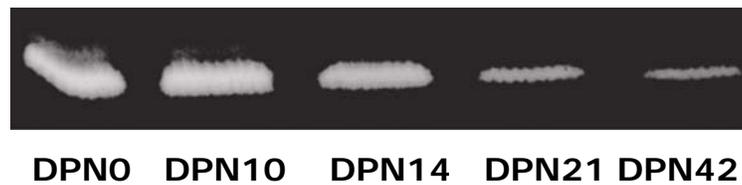
Como detectamos a expressão precoce da MMP-9 (forma ativa e pró-enzima) decidimos avaliar se esta proteína estaria ativa durante as duas primeiras semanas pós-natal onde se observa maior remodelamento dos axônios retinotectais. A avaliação da atividade gelatinase da MMP-9 no colículo superior em desenvolvimento foi identificada baseada no seu peso molecular (86 kDa). Zimogramas indicam níveis elevados da atividade gelanolítica da MMP-9 nas duas primeiras semanas pós-natais, sendo a atividade mais expressiva no DPN0, seguido por uma significativa diminuição da atividade

metaloprotease-9 após a terceira semana do desenvolvimento. A atividade gelatinase é pouco detectável no DPN42 (Figura 9).

Esses resultados são compatíveis com o processo de formação e eliminação de sinapses que se observa neste núcleo visual subcortical, de tal forma que se identifica uma diminuição na atividade metaloprotease nesta estrutura ao final do período crítico (DPN21).

Portanto, nossos dados sugerem que há ativação das MMPs durante processos dinâmicos que são parte da função sináptica normal, e que a expressão da MMP-9 tanto na sua forma ativa quanto inativa, decai durante o desenvolvimento, corroborando e estendendo os resultados obtidos pelo *western blotting*.

(A)



(B)

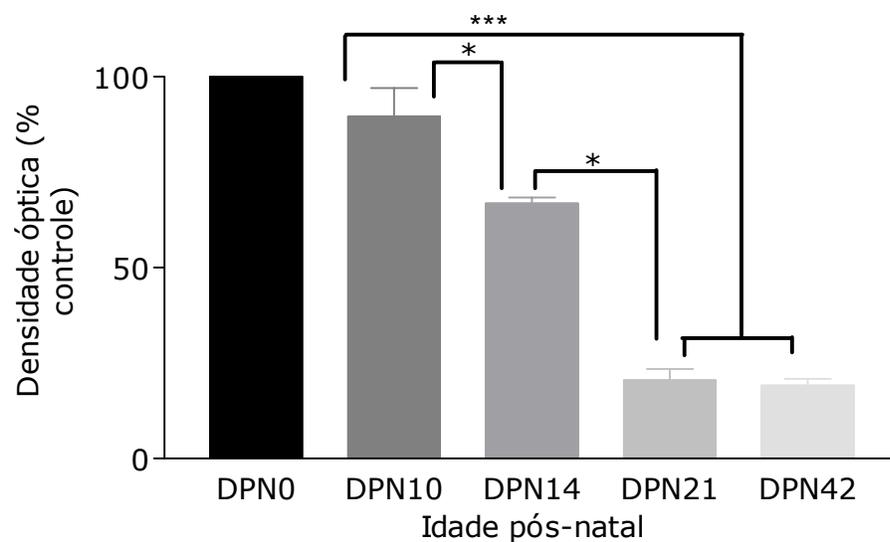


Figura 9- Detecção da atividade enzimática da metaloprotease-9 durante o desenvolvimento das projeções retinotectais entre DPN0 e DPN42. Para cada estágio, 50  $\mu$ g de proteína foi aplicado no gel de eletroforese. (A) Bandas de atividade gelatinase (MMP-9) ao longo do desenvolvimento. (B)- quantificação da zimografia pelo programa *Scion Image* (n=4 para todas as idades). DPN (dia pós-natal). \*\*\* representa  $p < 0.001$ ; \* representa  $p < 0.05$ .

### **4.3) EXPRESSÃO E ATIVIDADE DA MMP-9 NÃO SÃO AFETADAS PELA ATIVIDADE ELÉTRICA EVOCADA**

O ajustamento de sintonia fina das conexões visuais é observado no período de abertura dos olhos, em função do início da estimulação visual. Dados da literatura mostram que a estimulação visual que ocorre durante o período de abertura dos olhos coincide com a maturação das subunidades do receptor NMDA. A troca das subunidades desse receptor de NR2B para NR2A reflete a potenciação sináptica que ocorre neste período que contribui para o refinamento destas conexões em seu alvo apropriado (Lu & Constantine-Paton, 2004).

Estudamos a atividade de MMP-9 no CS de roedores durante o período de abertura dos olhos, a fim de detectar se seríamos capazes de encontrar alterações na atividade desses zimógenos durante esta pequena janela do desenvolvimento, crucial à correta formação da topografia retinotectal. Nossos resultados indicam que durante o período de abertura dos olhos não se observa uma alteração na expressão (Figura 10), ou na atividade (Figura 11) da MMP-9 no colículo superior em desenvolvimento.

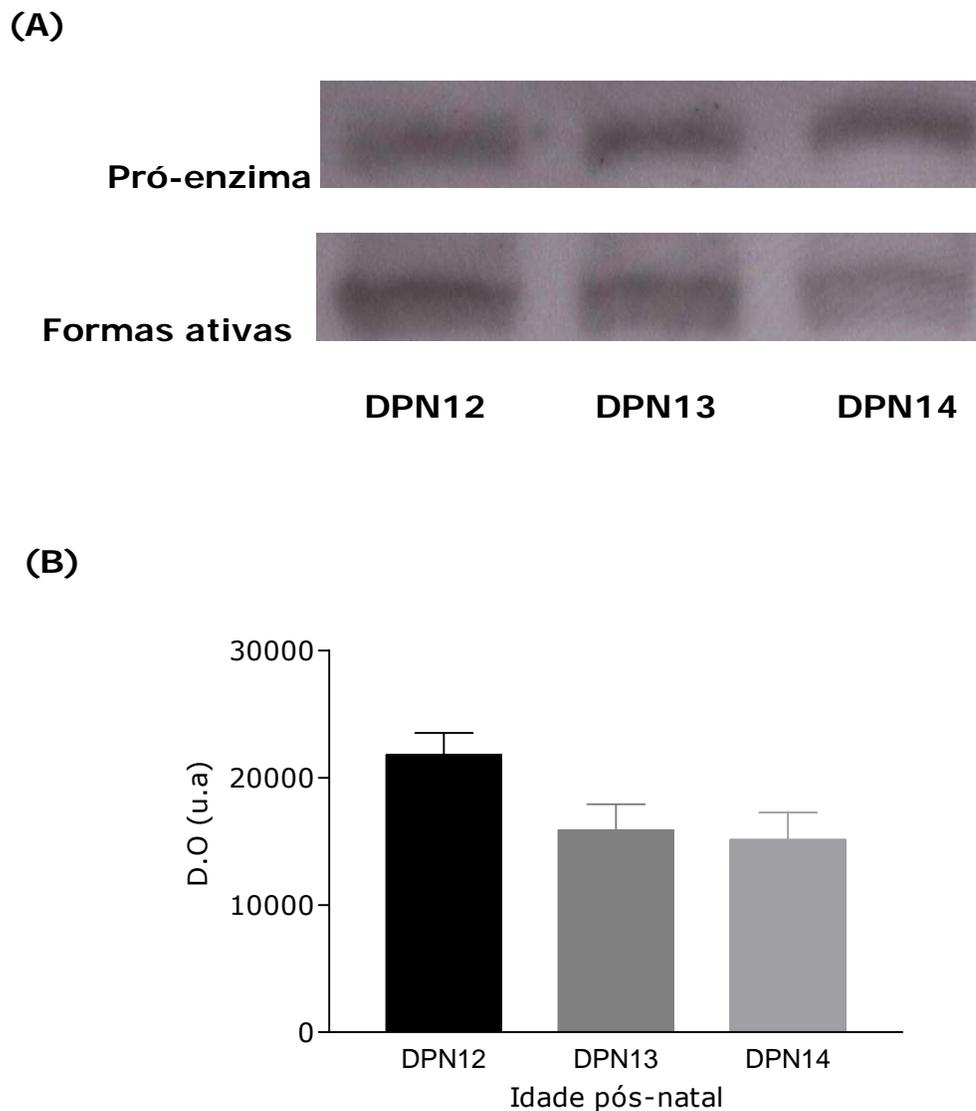
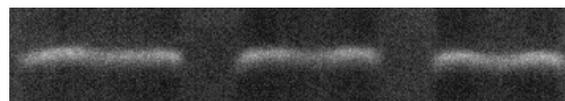


Figura 10: Detecção da expressão da MMP-9 durante o período de abertura dos olhos- (A)- expressão da metaloprotease-9 entre DPN12-14. Para cada estágio, 50 µg de proteína foi aplicado no gel de eletroforese. (B)- quantificação da expressão pelo programa *Scion Image*, n=4 para todas as idades estudadas.

(A)



DPN12      DPN13      DPN14

(B)

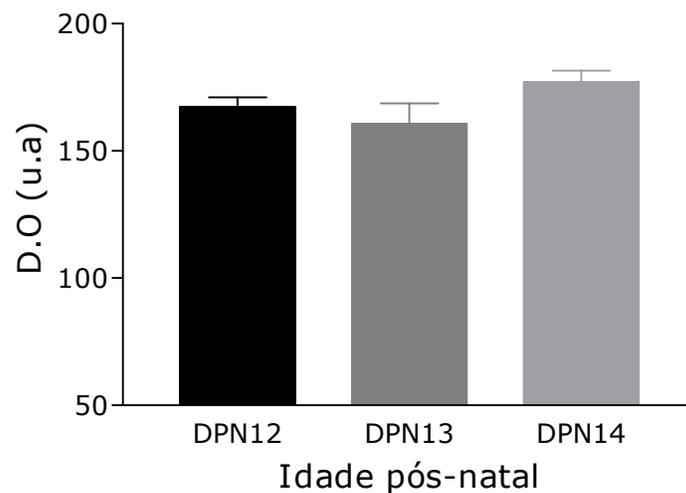


Figura 11: Detecção da atividade enzimática da metaloprotease-9 durante o período de abertura dos olhos, entre DPN12-14. Para cada estágio, 50  $\mu$ g de proteína foi aplicado no gel de eletroforese incorporado com gelatina.(A) Bandas de atividade gelatinase (MMP-9) (B)- quantificação da zimografia pelo programa *Scion Image*, n=4 para todas as idades estudadas.

#### **4.4) EFEITO DA ENUCLEAÇÃO MONOCULAR SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MMP-9 NO CS DE ROEDORES**

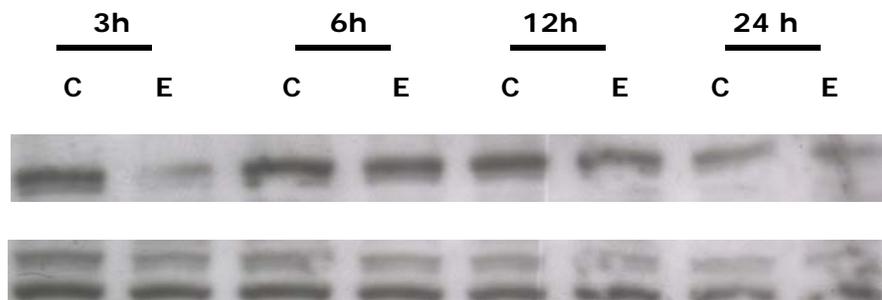
A enucleação monocular induz brotamento e reorganização de axônios intactos da população ipsolateral no colículo superior contralateral a lesão (Lund *et al.*, 1973; Land & Lund, 1979). Investigamos se a enucleação monocular no DPN10, dentro do período crítico do desenvolvimento, seria capaz de modular a expressão e a atividade da MMP-9 no CS denervado pela remoção de aferentes do olho contralateral.

A fim de correlacionar a atividade enzimática da MMP-9 observada durante o desenvolvimento normal com um papel no remodelamento neural induzido por lesões, traçamos um experimento onde os animais sofreram uma enucleação monocular no DPN10, em seguida tiveram sobrevida de 3 a 96 horas pós-lesão. Os animais foram então sacrificados e tiveram seus colículos superiores removidos. Para cada animal, o colículo ipsolateral à enucleação foi usado como controle (CS controle), já que este colículo sofre uma denervação mínima provocada pela remoção dos aferentes ipsolaterais. Por outro lado o CS contralateral à enucleação sofre uma denervação maciça, capaz de induzir uma

reorganização dos axônios da projeção ipsolateral do olho remanescente. Tanto os CS controle quanto os CS deaferentados foram processados da mesma forma.

Os *imunoblottings* apontam para um aumento, discreto, porém significativo, da expressão das formas ativas da MMP-9 seis horas após a lesão. Os resultados mostram ainda níveis constantes até 96 horas pós-lesão tanto para as formas ativas quanto para as inativas (Figuras 12 e 13).

(A)



(B)

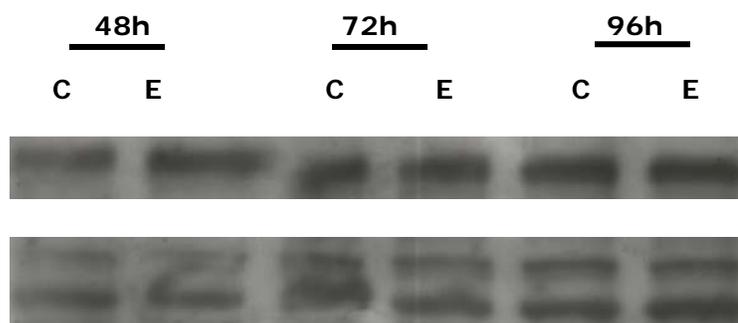


Figura 12: Detecção da expressão da metaloprotease-9 no CS de animais que sofreram o processo de enucleação monocular no DPN10 e tiveram até 96 horas de sobrevivência. (A) géis representando os períodos pós-lesão de 3–24 horas de sobrevivência, o gel de cima representa a forma inativa da MMP-9 e o de baixo as formas ativas da MMP-9. (B) géis representando os períodos pós-lesão de 48–96 horas de sobrevivência, a banda de cima representa a forma inativa da MMP-9 e a de baixo as formas ativas da MMP-9. Abreviaturas: C- controle interno da lesão; E- colículo denervado pela enucleação monocular.

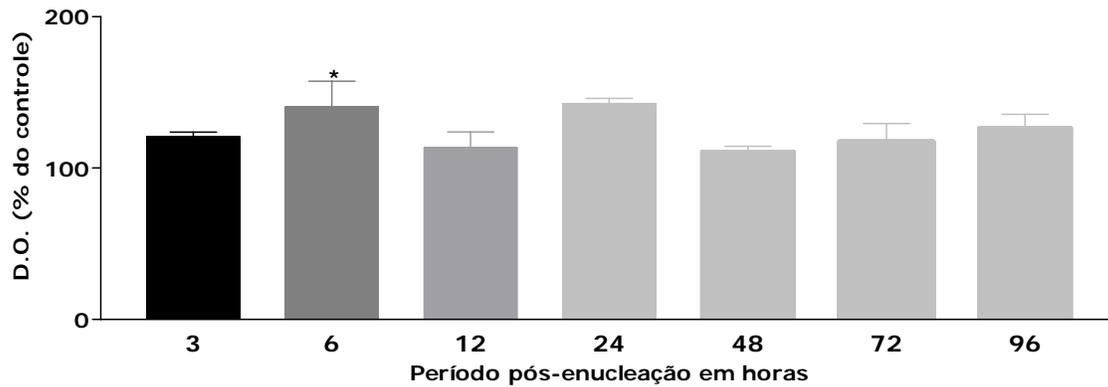
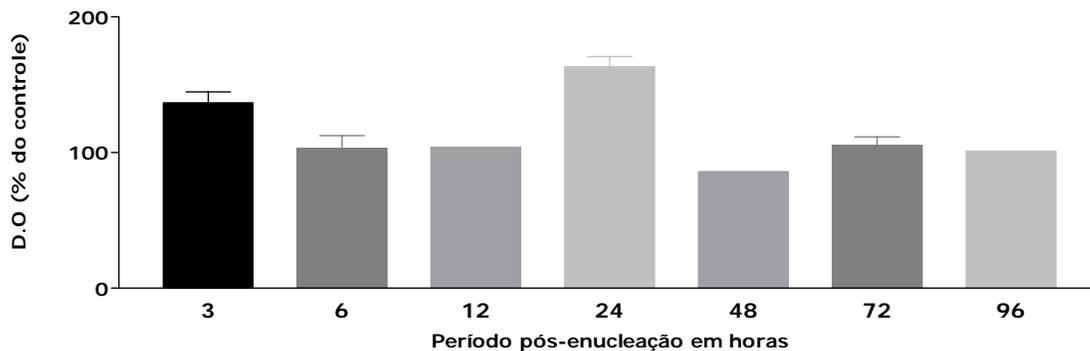
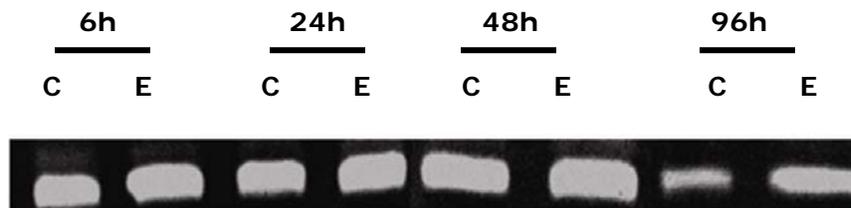
**(A)****(B)**

Figura 13: Quantificação da expressão da metaloprotease-9 no CS de animais que sofreram o processo de enucleação monocular no DPN10 e tiveram até 96 horas de sobrevida. (A) quantificação das formas ativas indica que a enucleação monocular aumenta a expressão MMP-9, 6 horas pós-lesão no colículo deaferentado (E) quando comparado ao CS controle (C). (B) quantificação das formas inativas indica que a enucleação monocular não altera a expressão MMP-9 pós-lesão no colículo deaferentado (E) quando comparado ao CS controle (C). n=6 para todas as idades.\* representa  $p < 0.05$ .

Zimogramas de colículos superiores controle e denervados pela lesão apontam para um aumento da atividade metaloprotease-9 iniciando 24 horas após a lesão e atingindo um pico 96 horas pós-lesão (Figura 14). Este tempo de ativação pós-lesão é compatível com o descrito por Serfaty e colaboradores (2005) em animais jovens onde se observou, após lesão de retina temporal contralateral, uma rápida indução de plasticidade com brotamento das terminações axonais intactas dentro da área denervada pela lesão (Serfaty *et al.*, 2005).

Este resultado sugere que a atividade da MMP-9 além de ser regulada nas camadas visuais do CS ao longo do desenvolvimento, pode ser modulada em modelos de plasticidade induzida por lesões.

(A)



(B)

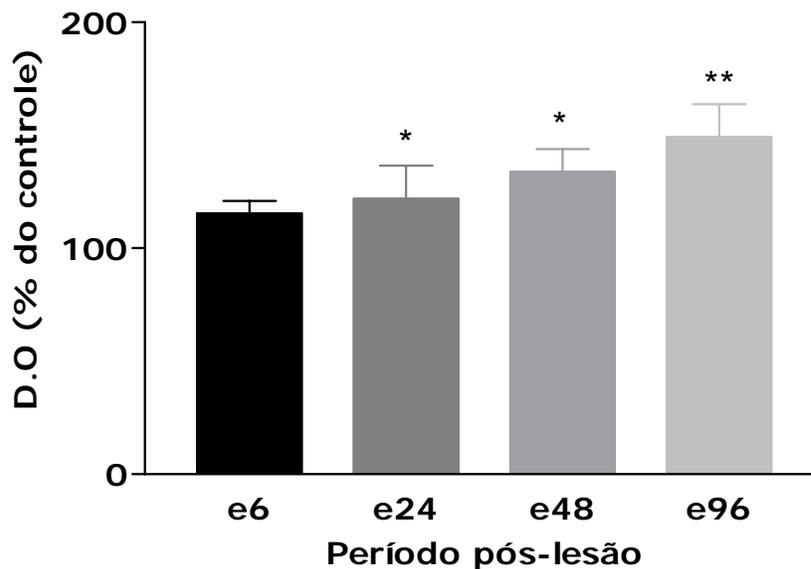


Figura 14: Detecção da atividade enzimática da metaloprotease-9 no CS de animais que sofreram o processo de enucleação monocular no DPN10 e tiveram até 96 horas de sobrevivência. Observar que a enucleação monocular aumenta a atividade MMP-9 24 horas pós-lesão no colículo deaferentado (E) quando comparado ao CS controle (C). (A) Zimograma das amostras dos colículos de animais que sofreram o processo de enucleação monocular no DPN10 e tiveram até 96 horas de sobrevivência (B) quantificação da zimografia pelo programa *Scion Image*,  $n=6$  para todas as idades. \* representa  $p<0.01$ ; \*\* $p<0.01$ .

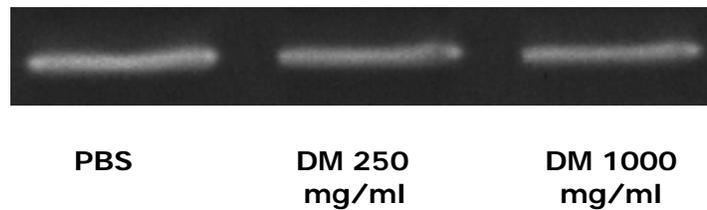
#### **4.5) INIBIÇÃO DA ATIVIDADE METALOPROTEASE INDUZ ALTERAÇÕES NO PADRÃO DE REFINAMENTO TOPOGRÁFICO RETINOTECTAL**

Durante o desenvolvimento topográfico das projeções visuais centrais, gradientes moleculares percebidos pelos receptores nos cones de crescimento interagem com moléculas atrativas/repulsivas e disparam cascatas de sinalização intracelular que culminam com modificações na orientação dos cones de crescimento e morfologia dos mesmos. Trabalhos recentes correlacionam a atividade e expressão de metaloproteases nestes processos que culminam com o desenvolvimento das vias visuais (McFarlane, 2003; Hehr *et al.*, 2005).

Baseados nestes estudos avaliamos o papel da inibição das MMPs na formação da topografia retinotectal. Para tanto utilizamos o DM-43, um inibidor de MMPs em implantes de Elvax, em idades precoces do desenvolvimento, do DPN0 ao DPN7, período onde ocorre a maior parte da eliminação de axônios transitórios.

A análise zimográfica dos colículos superiores de animais tratados com DM-43, em comparação com colículos de animais controle, mostraram uma inibição da atividade gelatinase entre DPN0-7, mostrando que a DM-43 foi liberada a partir do Elvax (Figura 15).

(A)



(B)

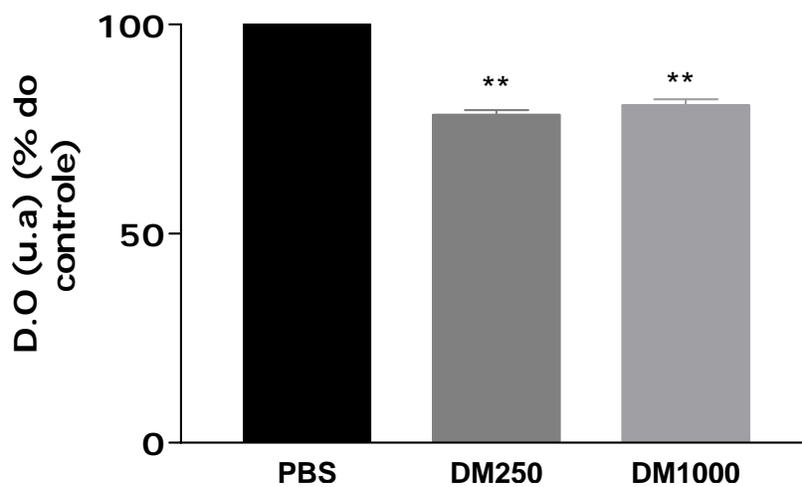


Figura 15: Inibição da atividade MMP-9 no CS após o implante de Elvax contendo DM-43 ou PBS. Em A observamos as bandas de zimografia e em B a análise densitométrica da inibição da atividade gelatinase *in vivo*. n= 3, em 3 diferentes géis, para cada tratamento. \*\* representa  $p < 0,01$ .

O estudo anterógrado da distribuição de marcação terminal após injeções intraoculares de HRP mostrou, nos animais que receberam implantes de Elvax contendo PBS (veículo), um padrão homogêneo de distribuição de aglomerados de marcação terminal no eixo médio-lateral do colículo (Figura 16 A), característico de animais normais nesta fase do desenvolvimento (Serfaty & Linden, 1994). Por outro lado, animais que receberam implantes contendo um inibidor de metaloproteases (DM-43) apresentaram um padrão irregular de distribuição da marcação terminal ao longo do eixo médio-lateral do colículo. Nestes animais, os aglomerados de marcação apresentam maior densidade na metade lateral e menor densidade na metade medial do núcleo, caracterizando um padrão assimétrico de distribuição topográfica (Figura 16 B). Estes dados sugerem, ainda, que o bloqueio da atividade MMP esteja induzindo o amadurecimento precoce dos aglomerados de terminais retinotectais, em regiões laterais do CS, o que poderia estar associado a uma redução na capacidade de crescimento/arborização ou aumento da repulsão destes axônios em regiões mediais do colículo.

Em outro grupo experimental, implantamos o Elvax contendo veículo ou DM-43 no DPN7 com sobrevida até o DPN14, período do desenvolvimento onde a atividade elétrica espontânea das células ganglionares da retina está associada à formação de laminação nos

núcleos visuais subcorticais. Nestes animais, não encontramos alterações topográficas significativas entre grupos controle e experimentais, que apresentaram um padrão similar de distribuição de terminais retinotectais ipsolaterais (dados não mostrados).

Em conjunto, os dados sugerem que as metaloproteases devem ser importantes em um período precoce do desenvolvimento dessas conexões, onde a formação do mapa topográfico depende exclusivamente de interações moleculares com o microambiente e pistas repulsivas/atrativas

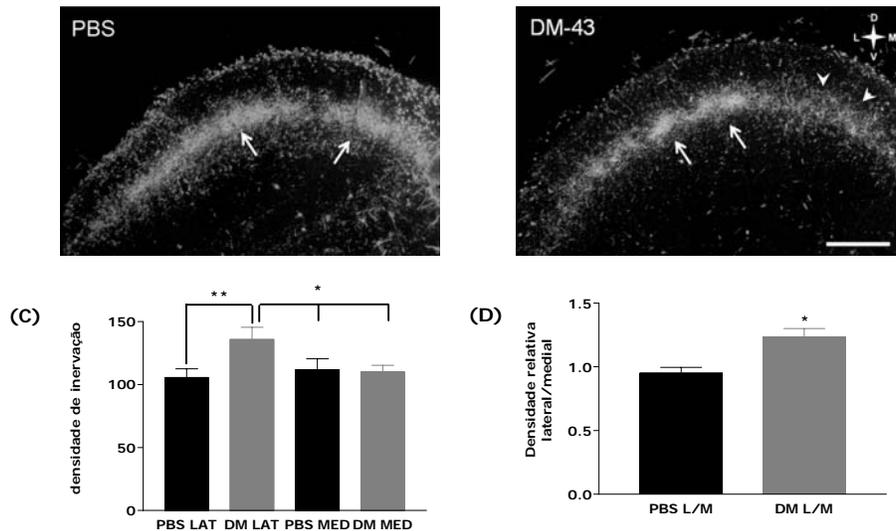


Figura 16: Modificações neuroanatômicas induzidas por DM-43 (inibidor de MMPs), na formação de aglomerados no colículo superior em desenvolvimento. Marcação terminal de HRP nos animais tratados com veículo (A) e com DM-43 (B), e a análise dos valores de densidade óptica (C e D). Nos ratos tratados com PBS, os aglomerados de axônios (setas) são uniformemente distribuídos ao longo do eixo médio-lateral do CS. Animais que receberam implantes de Elvax contendo DM-43 (1000 mg/ml) mostram um padrão assimétrico de formação de aglomerados com uma densidade aumentada na região lateral do CS (setas) e um padrão típico de fibras na região medial do CS (cabeças de setas). D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral. Barra de calibração: 200 $\mu$ .

## **5) DISCUSSÃO**

Nossos resultados mostram que durante o desenvolvimento das vias retinotectais observa-se grande expressão e atividade da MMP-9, sugerindo um papel desta protease durante fases de grande reorganização plástica do SNC durante o desenvolvimento normal e após lesões do SNC. Este estudo mostrou ainda que o bloqueio da atividade MMP-9 durante o desenvolvimento resulta numa distorção do mapa topográfico retinotectal ipsolateral. Portanto, os dados mostram que a atividade metaloprotease é importante não só como elemento permissivo para a reorganização plástica, mas também exerce um papel instrutivo na formação de topografia no sistema visual.

### **5.1) PROTEÓLISE DE MATRIZ, REMODELAMENTO AXONAL E SINAPTOGÊNESE**

A proteólise da matriz extracelular é importante em processos de plasticidade funcional e estrutural. Metaloproteases na sua forma ativa, pode agir de duas maneiras: induzindo 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, disparando cascatas intracelulares de sinalização. A segunda maneira 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).

Evidências recentes apontam para o papel das metaloproteases em vários estágios da sinaptogênese e plasticidade (Yong, 2005; Bilousova *et al.*, 2006; Monea *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2006; Bozdagi *et al.*, 2007). Neste trabalho trazemos evidências para um papel da MMP-9 na formação do mapa retinotectal durante uma fase de intensa reorganização axonal. Identificamos que a expressão tanto das formas ativas quanto inativas da MMP-9 são mais evidentes nas duas primeiras semanas pós-natais, assim como a atividade biológica da MMP-9 identificada por zimografia. Durante os estágios iniciais do desenvolvimento essa alta detecção de MMP-9 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 retinotectal, na primeira e segunda semana pós-natal. Acreditamos que a MMP-9 possa estar envolvida em vários processos do desenvolvimento incluindo a eliminação seletiva de axônios e formação de sinapses. Szklarczyk e colaboradores (2002) sugerem que o mRNA da MMP-9 tem localização dendrítica, o que fortalece a idéia de que moléculas da MEC

contribuem para o ajuste dinâmico das conexões neurais (Szkłarczyk *et al.*, 2002).

Nossos dados estão de acordo com os descritos por Vaillant e colaboradores (1999) que demonstraram que o pico de expressão e atividade enzimática das MMPs-3 e -9 ocorre no período da ontogênese do cerebelo, entre DPN3-DPN10, quando se observa migração, diferenciação celular e intensa sinaptogênese. Essas metaloproteases estariam, portanto, participando na formação da estrutura laminar altamente organizada característica do cerebelo. Além disso, foi demonstrado que, provavelmente, as MMPs-3 e -9 estariam envolvidas na migração de precursores cerebelares causando proteólise local e desta forma, modificando a sinalização celular pela presença ou ausência de moléculas da MEC em diferentes regiões do cerebelo. Este estudo demonstrou, ainda, uma drástica diminuição na atividade de MMP-9 em DPN15, período onde se observa a diminuição da taxa de migração celular (Vaillant *et al.*, 1999). Além disso, Ayoub e colaboradores (2005) mostraram que os níveis dos mRNAs das MMP-2, -9 diminuem no cerebelo em desenvolvimento entre o DPN3-6, embora a atividade proteolítica ainda persista, e por volta do DPN9 tanto expressão quanto a atividade diminuem (Ayoub *et al.*, 2005).

## 5.2) MODULAÇÃO DAS MMPs POR ATIVIDADE NEURAL

A abertura dos olhos e o início da estimulação sensorial visual são necessários ao ajustamento de sintonia fina observados nas conexões visuais. Lu & Constantine-Paton (2004) demonstraram que a estimulação sensorial visual que ocorre durante o período de abertura dos olhos coincide com a maturação das subunidades do receptor NMDA. Num período precoce que sucede a abertura dos olhos, 6 horas após este evento, há a detecção de correntes mediadas por receptores NMDA que contenham a subunidade NR2B, bem como a ativação de sinapses silenciosas. Após as primeiras 24 horas após a abertura dos olhos há indução da troca das subunidades deste receptor que muda de NR2B para NR2A. E esta mudança reflete a potenciação sináptica que ocorre neste período que consolida o refinamento destas conexões em seu alvos apropriados (Lu & Constantine-Paton, 2004).

MMPs tem sido relacionadas a potenciação e depressão de longa duração (LTP) no SNC (Yong, 2005; Bilousova *et al.*, 2006; Monea *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2006; Bozdagi *et al.*, 2007). A participação de MMPs no processo de formação de LTP é dependente da ativação de receptores NMDA e integrinas. Desta forma, períodos de aquisição e retenção de memória de novas informações requerem a remodelagem da MEC bem como a participação das moléculas de adesão celular.

Essa regulação mediada por MMP-9 ocorre especificamente em resposta a ativação via receptor NMDA, que pode ser gerada em neurônios, glia, ou em ambos os tipos celulares, visto que cada um deles expressa este tipo de receptor e é capaz de sintetizar a MMP-9 (Conti *et al.*, 1997; Szklarczyk *et al.*, 2002; Arai *et al.*, 2003). Outros estudos mostram que o mRNA das MMP-3 e -9 são induzidos no hipocampo durante o aprendizado, e que a indução dessas proteínas pode ser parcialmente bloqueada pelo bloqueio de receptores NMDA (Meighan *et al.*, 2006).

Mriganka Sur (2004) demonstrou que a privação monocular induz alterações rápidas nas espículas dendríticas, e que as modificações sinápticas observadas após este processo necessitam da participação de moléculas da matriz extracelular na zona binocular do córtex visual. Estas modificações são lâmina-específicas e ainda, esta plasticidade estrutural conta com a participação do ativador tecidual de plasminogênio (tPA) que converte plasminogênio em plasmina, e esta por sua vez, degrada moléculas da MEC tornando o ambiente mais permissivo a modificações sinápticas uso-dependentes (Oray *et al.*, 2004).

Baseados nessas informações estudamos a MMP-9 no CS de roedores durante o período de abertura dos olhos, a fim de detectar se existiriam possíveis alterações na expressão e/ou atividade dessa

molécula durante esta pequena janela do desenvolvimento. Neste período é que se dá o pico de ativação de receptores do tipo NMDA, que participam do processo de estabilização e seleção sináptica uso-dependente.

Nossos resultados indicam que a abertura dos olhos não altera de forma significativa o padrão de expressão e atividade da MMP-9. É possível que tanto a expressão quanto a atividade da MMP-9 estejam sendo estimuladas ao máximo pela atividade elétrica espontânea das células ganglionares da retina, que constitui uma importante pista instrutiva para a formação de padrões de conexão no sistema visual (Stellwagen & Shatz, 2002; Chandrasekaran *et al.*, 2005). Além disso, nossos resultados mostram que a MMP-9 possa estar atuando no refinamento da topografia retinotectal numa janela temporal que antecede a abertura dos olhos, onde a participação de moléculas de adesão/repulsão é mais evidente.

### **5.3) MODULAÇÃO DE METALOPROTEASES NA PLASTICIDADE DO SNC**

A enucleação monocular, assim como lesões parciais de retina, têm sido utilizadas como modelos de reorganização plástica no SNC por induzir brotamento e reorganização dos axônios intactos

pertencentes à população de axônios ipsolaterais no colículo superior (Lund *et al.*, 1980; Serfaty *et al.*, 2005).

Estudamos o efeito da enucleação monocular sobre a expressão e atividade da MMP-9 nas camadas visuais do colículo superior. Encontramos um discreto aumento na expressão da isoforma ativa da MMP-9 6 horas pós-lesão, sem alterações na expressão da isoforma inativa. A análise dos zimogramas aponta para um aumento progressivo da atividade gelatinase da MMP-9 iniciando 6 horas pós-lesão, até 96 horas após a deaferentação. Esses resultados estão de acordo com dados descritos por Szklarczyk e colaboradores (2002). Estes autores observaram, 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). Também foi demonstrado que tanto a atividade quanto a expressão das MMPs -2,-3 e -9 são reguladas para cima no nervo óptico em regeneração após esmagamento, quando comparados aos nervos não lesados, num período de até 8 dias pós-lesão (Ahmed *et al.*, 2005).

Nossos resultados também confirmam dados anteriores do nosso grupo (2005) que mostraram indução de brotamento de terminais axonais nas camadas superficiais do CS observada 24 horas após uma lesão na retina temporal contralateral no dia pós-natal 10, (Serfaty *et*

*al.*, 2005). Esse resultado nos sugere que em fases precoces após lesões que a MMP-9 atue como um fator que induz a quebra de moléculas inibitórias ao crescimento axonal em fases precoces após lesões, permitindo dessa forma, que axônios intactos brotem dentro da área denervada nas camadas visuais do colículo superior.

De fato, tem sido mostrado que o tratamento com condroitinase ABC, uma outra protease da matriz extracelular, resulta em aumento do brotamento de terminais axonais retinianos no colículo superior após denervação (Tropea *et al.*, 2003). Além disso, o período crítico no córtex visual tem sido relacionado a atividade proteolítica do tPA, uma outra protease da matriz extracelular (Mataga *et al.*, 2004; Oray *et al.*, 2004; Hensch, 2005).

Portanto, acreditamos que a proteólise de moléculas da MEC, pela MMP-9 no colículo superior possa ter um papel permissivo/indutor do remodelamento axonal e sinaptogênese induzida pela deaferentação assim como durante o desenvolvimento normal destas conexões.

#### 5.4) PAPEL DAS MMPs NO DESENVOLVIMENTO DE ESPECIFICIDADE TOPOGRÁFICA NO SISTEMA VISUAL

Recentemente foi demonstrado que a inibição da atividade proteolítica das MMPs, durante processos de crescimento e migração axonal, culmina com a inadequada orientação dos axônios das células ganglionares da retina em direção ao seu território alvo. Isso ocorre de tal forma que a inibição dessas moléculas altera os pontos de decisão da rota que estes axônios devem tomar, nas vias visuais, a fim de formar conexões apropriadas no *tectum* óptico (Hehr *et al*, 2005, Webber *et al*, 2002). Hehr *et al* (2005) demonstraram que os axônios das células ganglionares da retina que migram em direção ao *tectum* óptico do *Xenopus laevis* tem três pontos que determinam a orientação da migração e a região apropriada onde vão estabelecer conexões estáveis com seus alvos. Demonstraram, pela primeira vez, que a inibição das MMPs causa defeitos no reconhecimento do alvo pelos axônios em migração, embora não iniba a habilidade dos axônios de fazerem uma nova escolha em que alvo se estabelecer (Hehr *et al.*, 2005). Além disso, outros trabalhos indicam que a inibição da atividade da metaloprotease-9 afeta a migração, crescimento axonal no cerebelo em desenvolvimento (Vaillant *et al.*, 2003), confirmado em animais nocaute para MMP-2 e -9 (Luo, 2005).

Os axônios retinotectais ipsolaterais de roedores se organizam em discretos aglomerados de marcação terminal na borda ventral das camadas superficiais do CS, um padrão que emerge a partir de conexões difusas observadas em animais recém-nascidos. A partir da segunda semana pós-natal, observa-se que os terminais ipsolaterais se agrupam na face ventral do *stratum griseum superficiale* (SGS), formando aglomerados de fibras e terminais distribuídos de forma regular ao longo do eixo latero-medial na metade anterior do colículo superior (Serfaty & Linden, 1994). A distribuição topográfica dos aglomerados de terminações ipsolaterais corresponde à localização de células ganglionares localizadas na crescente temporal da retina. Desta forma, a distribuição dorso-ventral da crescente temporal imprime uma organização latero-medial dos axônios retinotectais.

Decidimos avaliar o papel funcional da MMP-9 no refinamento da topografia retinotectal *in vivo*. Seguindo um protocolo de implante de Elvax contendo veículo (PBS) ou DM-43 (inibidor de MMPs), no DPN0 com sobrevida até o DPN7, período onde encontramos significativa expressão e atividade biológica da MMP-9. Com a inibição da MMP-9 observamos um rompimento da formação da topografia latero-medial nas camadas superficiais do CS, de tal forma que foi evidente a inibição da formação de aglomerados de marcação terminal na região medial do colículo. Estes dados ainda sugerem que possa ocorrer um

favorecimento da formação dos aglomerados localizados na região lateral do CS.

Metaloproteases clivam, além das moléculas da matriz extracelular, receptores de membrana celular (Ethell & Ethell, 2007). Um desses receptores que pode ser clivado pelas MMPs são as efrinas B, que têm sido relacionadas à organização topográfica no eixo médio-lateral do desenvolvimento retinotectal (Schmitt *et al.*, 2006). Além disso, recentemente foi demonstrado que MMPs são elementos-chave em cascatas de sinalização (Georgakopoulos *et al.*, 2006), e tem implicações no desenvolvimento neural, sinaptogênese, orientação axonal e plasticidade sináptica (Klein, 2004). Por conta desses dados poderíamos esperar que o bloqueio da MMP-9 poderia induzir alterações do mapa, como o descrito neste trabalho.

Nossos dados mostram que embora a análise da densidade óptica não mostre diferenças significativas entre região medial do colículo superior dos animais tratados com DM-43 quando comparados aos animais tratados com veículo, a análise qualitativa mostra claramente que ocorre uma expressiva redução da formação de aglomerados de terminais em comparação aos controles tratados com veículo. Nos animais tratados com DM-43, é possível ainda, visualizar na região medial um nítido predomínio de marcação de fibras sobre a marcação de terminais. Provavelmente a análise da densidade óptica

de *pixels* não discrimina entre marcação terminal e marcação de fibras.

A análise da distribuição de marcação de aglomerados de terminais na metade lateral do CS mostra tanto na análise qualitativa quanto na análise quantitativa da densidade óptica um predomínio significativo da marcação de aglomerados de terminais nos animais tratados com DM-43 em relação aos controles nesta região do colículo.

Tomados em conjunto nossos dados indicam que a MMP-9 desempenha um papel na estabilização das sinapses retinotectais durante o período crítico do refinamento topográfico, e que o bloqueio agudo da atividade dessas moléculas, modifica a formação do mapa na via retinotectal dentro da primeira semana do desenvolvimento pós-natal.

Além disso, nossos dados sugerem que a atividade MMP-9 deve induzir reorganização após lesão no sistema nervoso central, onde deve estar contribuindo para o rearranjo desta circuitaria.

## 6) CONCLUSÕES

1) A atividade e a expressão da MMP-9 diminui durante o curso do desenvolvimento das projeções retinotectais, o que contribui para a hipótese de que esta molécula participe dos processos de eliminação e estabilização sináptica de conexões centrais.

2) A enucleação monocular é capaz de induzir tanto o aumento da expressão quanto da atividade da MMP-9, indicando a participação desta molécula em eventos de reorganização sináptica.

3) A inibição de MMPs induz a alteração do mapa topográfico retinotectal nos eixos médio-lateral, rompendo a organização topográfica neste núcleo subcortical.

## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED Z., DENT R.G., LEADBEATER W.E., SMITH C., BERRY M. & LOGAN A. (2005). Matrix metalloproteases: degradation of the inhibitory environment of the transected optic nerve and the scar by regenerating axons. *Molecular and cellular neurosciences* 28, 64-78.
- AKINS M.R. & BIEDERER T. (2006). Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Current opinion in neurobiology* 16, 83-89.
- 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.
- ARAI K., LEE S.R. & LO E.H. (2003). Essential role for ERK mitogen-activated protein kinase in matrix metalloproteinase-9 regulation in rat cortical astrocytes. *Glia* 43, 254-264.
- AYOUB A.E., CAI T.Q., KAPLAN R.A. & LUO J. (2005). Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. *The Journal of comparative neurology* 481, 403-415.
- BASTOS E.F., MARCELINO J.L., AMARAL A.R. & SERFATY C.A. (1999). Fluoxetine-induced plasticity in the rodent visual system. *Brain research* 824, 28-35.

**BERARDI N., PIZZORUSSO T. & MAFFEI L. (2004).** Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse. *Neuron* 44, 905-908.

**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. *Journal of neurochemistry* 97, 44-56.

**BINNS K.E. (1999).** The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the superior colliculus. *Progress in neurobiology* 59, 129-159.

**BLISS T.V. & COLLINGRIDGE G.L. (1993).** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

**BOULANGER L.M. & SHATZ C.J. (2004).** Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews* 5, 521-531.

**BOZDAGI O., NAGY V., KWEI K.T. & HUNTLEY G.W. (2007).** In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *Journal of neurophysiology*.

**BRADFORD M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

BROWN R.E. & MILNER P.M. (2003). The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse. *Nature reviews* 4, 1013-1019.

CAMPELLO-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*.

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. *Journal of neurobiology* 44, 371-381.

CHANDRASEKARAN A.R., PLAS D.T., GONZALEZ E. & CRAIR M.C. (2005). Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse. *J Neurosci* 25, 6929-6938.

CHANDRASEKARAN A.R., SHAH R.D. & CRAIR M.C. (2007). Developmental homeostasis of mouse retinocollicular synapses. *J Neurosci* 27, 1746-1755.

CHRISTOPHERSON K.S., ULLIAN E.M., STOKES C.C., MULLOWNEY C.E., HELL J.W., AGAH A., LAWLER J., MOSHER D.F., BORNSTEIN P. & BARRES B.A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421-433.

CLINE H. (2003). Sperry and Hebb: oil and vinegar? *Trends in neurosciences* 26, 655-661.

CLINE H.T. & CONSTANTINE-PATON M. (1990a). The differential influence of protein kinase inhibitors on retinal arbor morphology and eye-specific stripes in the frog retinotectal system. *Neuron* 4, 899-908.

CLINE H.T. & CONSTANTINE-PATON M. (1990b). NMDA receptor agonist and antagonists alter retinal ganglion cell arbor structure in the developing frog retinotectal projection. *J Neurosci* 10, 1197-1216.

COHEN-CORY S. (2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science (New York, NY)* 298, 770-776.

COLONNESE M.T., SHI J. & CONSTANTINE-PATON M. (2003). Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation of NMDA currents, but does not affect AMPA/kainate currents. *Journal of neurophysiology* 89, 57-68.

CONSTANTINE-PATON M. (1990). NMDA receptor as a mediator of activity-dependent synaptogenesis in the developing brain. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 55, 431-443.

CONSTANTINE-PATON M., CLINE H.T. & DEBSKI E. (1990). Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annual review of neuroscience* 13, 129-154.

CONTI F., MINELLI A., DEBIASI S. & MELONE M. (1997). Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Molecular neurobiology* 14, 1-18.

- COWEY A. & PERRY V.H. (1979). The projection of the temporal retina in rats, studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung* 35, 457-464.
- CROCKER S.J., PAGENSTECHER A. & CAMPBELL I.L. (2004). The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res* 75, 1-11.
- CROWLEY J.C. & KATZ L.C. (2000). Early development of ocular dominance columns. *Science (New York, NY)* 290, 1321-1324.
- CROWLEY J.C. & KATZ L.C. (2002). Ocular dominance development revisited. *Current opinion in neurobiology* 12, 104-109.
- 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. *Current opinion in neurobiology* 12, 93-99.
- DEMESTRE M., ORTH M., WELLS G.M., GEARING A.J., HUGHES R.A. & GREGSON N.A. (2005). Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. *Neuropathology and applied neurobiology* 31, 545-555.

- DEMESTRE M., WELLS G.M., MILLER K.M., SMITH K.J., HUGHES R.A., GEARING A.J. & GREGSON N.A. (2004). Characterisation of matrix metalloproteinases and the effects of a broad-spectrum inhibitor (BB-1101) in peripheral nerve regeneration. *Neuroscience* 124, 767-779.
- DITYATEV A., BRUCKNER G., DITYATEVA G., GROSCHE J., KLEENE R. & SCHACHNER M. (2007). Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Developmental neurobiology* 67, 570-588.
- DITYATEV A., FRISCHKNECHT R. & SEIDENBECHER C.I. (2006). Extracellular matrix and synaptic functions. *Results and problems in cell differentiation* 43, 69-97.
- DITYATEV A. & SCHACHNER M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature reviews* 4, 456-468.
- DITYATEV A. & SCHACHNER M. (2006). The extracellular matrix and synapses. *Cell and tissue research* 326, 647-654.
- DRAGER U.C. & OLSEN J.F. (1980). Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *The Journal of comparative neurology* 191, 383-412.
- DZWONEK J., RYLSKI M. & KACZMAREK L. (2004). Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS letters* 567, 129-135.

**EHRlich I., Klein M., Rumpel S. & Malinow R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4176-4181.**

**EHRlich I. & Malinow R. (2004). Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci* 24, 916-927.**

**ETHELL I.M. & ETHELL D.W. (2007). Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: Synaptic functions and targets. *J Neurosci Res*.**

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

**GAILLARD S., NASARRE C., GONTHIER B. & BAGNARD D. (2005). [The cellular and molecular basis of axonal growth]. *Revue neurologique* 161, 153-172.**

**GEORGAKOPOULOS A., LITTERST C., GHERSI E., BAKI L., XU C., SERBAN G. & ROBAKIS N.K. (2006). Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. *The EMBO journal* 25, 1242-1252.**

**GODEMENT P., SALAUN J. & IMBERT M. (1984). Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *The Journal of comparative neurology* 230, 552-575.**

GONTHIER B., NASARRE C., ROTH L., PERRAUT M., THOMASSET N., ROUSSEL G., AUNIS D. & BAGNARD D. (2007). Functional interaction between matrix metalloproteinase-3 and semaphorin-3C during cortical axonal growth and guidance. *Cereb Cortex* 17, 1712-1721.

GOTTSCHALL P.E. & DEB S. (1996). Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* 3, 69-75.

GROSS J. & LAPIERE C.M. (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1014-1022.

HEBB D.O. (1949). The organisation of behaviour.

HEHR C.L., HOCKING J.C. & MCFARLANE S. (2005). Matrix metalloproteinases are required for retinal ganglion cell axon guidance at select decision points. *Development (Cambridge, England)* 132, 3371-3379.

HEIDUSCHKA P. & THANOS S. (2000). Restoration of the retinofugal pathway. *Progress in retinal and eye research* 19, 577-606.

HENSCH T.K. (2004). Critical period regulation. *Annual review of neuroscience* 27, 549-579.

HENSCH T.K. (2005). Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Current topics in developmental biology* 69, 215-237.

HERING H. & SHENG M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature reviews* 2, 880-888.

HIMANEN J.P. & NIKOLOV D.B. (2003). Eph signaling: a structural view. *Trends in neurosciences* 26, 46-51.

HOFER S.B., MRSIC-FLOGEL T.D., BONHOEFFER T. & HUBENER M. (2006). Prior experience enhances plasticity in adult visual cortex. *Nature neuroscience* 9, 127-132.

HORNG S.H. & SUR M. (2006). Visual activity and cortical rewiring: activity-dependent plasticity of cortical networks. *Progress in brain research* 157, 3-11.

HU B., NIKOLAKOPOULOU A.M. & COHEN-CORY S. (2005). BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. *Development (Cambridge, England)* 132, 4285-4298.

HUBERMAN A.D., SPEER C.M. & CHAPMAN B. (2006). Spontaneous retinal activity mediates development of ocular dominance columns and binocular receptive fields in v1. *Neuron* 52, 247-254.

HYNDS D.L. & SNOW D.M. (2002). A semi-automated image analysis method to quantify neurite preference/axon guidance on a patterned substratum. *Journal of neuroscience methods* 121, 53-64.

- ISA T. & SAITO Y. (2001). The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection. *Neuroscience research* 41, 107-113.
- ITAYA S.K., FORTIN S. & MOLOTCHNIKOFF S. (1995). Evolution of spontaneous activity in the developing rat superior colliculus. *Can J Physiol Pharmacol* 73, 1372-1377.
- JABLONSKA B., GIERDALSKI M., KOSSUT M. & SKANGIEL-KRAMSKA J. (1999). Partial blocking of NMDA receptors reduces plastic changes induced by short-lasting classical conditioning in the SI barrel cortex of adult mice. *Cereb Cortex* 9, 222-231.
- JEFFERY G. (1984). Retinal ganglion cell death and terminal field retraction in the developing rodent visual system. *Brain research* 315, 81-96.
- JOHNSON K.G., TENNEY A.P., GHOSE A., DUCKWORTH A.M., HIGASHI M.E., PARFITT K., MARCU O., HESLIP T.R., MARSH J.L., SCHWARZ T.L., FLANAGAN J.G. & VAN VACTOR D. (2006). The HSPGs Syndecan and Dallylike bind the receptor phosphatase LAR and exert distinct effects on synaptic development. *Neuron* 49, 517-531.
- KACZMAREK L., LAPINSKA-DZWONEK J. & SZYMCZAK S. (2002). Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *The EMBO journal* 21, 6643-6648.
- KASAI H., MATSUZAKI M., NOGUCHI J., YASUMATSU N. & NAKAHARA H. (2003). Structure-stability-function

- relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences* 26, 360-368.
- KATZ L.C. & CROWLEY J.C. (2002). Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nature reviews* 3, 34-42.
- KATZ L.C. & SHATZ C.J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science (New York, NY)* 274, 1133-1138.
- KLEIN R. (2004). Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Current opinion in cell biology* 16, 580-589.
- KNOLL B. & DRESCHER U. (2002). Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends in neurosciences* 25, 145-149.
- LAND P.W. & LUND R.D. (1979). Development of the rat's uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies. *Science (New York, NY)* 205, 698-700.
- LEE R., KERMANI P., TENG K.K. & HEMPSTEAD B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science (New York, NY)* 294, 1945-1948.
- LEMKE G. & REBER M. (2005). Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 551-580.

- LETOURNEAU P.C., CONDIC M.L. & SNOW D.M. (1994). Interactions of developing neurons with the extracellular matrix. *J Neurosci* 14, 915-928.
- LINDEN R. & PERRY V.H. (1983). Massive retinotectal projection in rats. *Brain research* 272, 145-149.
- 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.
- LU W. & CONSTANTINE-PATON M. (2004). Eye opening rapidly induces synaptic potentiation and refinement. *Neuron* 43, 237-249.
- LUND R.D., CUNNINGHAM T.J. & LUND J.S. (1973). Modified optic projections after unilateral eye removal in young rats. *Brain, behavior and evolution* 8, 51-72.
- LUND R.D., LAND P.W. & BOLES J. (1980). Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: an HRP study in adults. *The Journal of comparative neurology* 189, 711-720.
- LUND R.D. & LUND J.S. (1972). Development of synaptic patterns in the superior colliculus of the rat. *Brain research* 42, 1-20.
- LUND R.D. & LUND J.S. (1976). Plasticity in the developing visual system: the effects of retinal lesions made in young rats. *The Journal of comparative neurology* 169, 133-154.

LUO J. (2005). The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. *Cerebellum (London, England)* 4, 239-245.

MAJEWSKA A.K., NEWTON J.R. & SUR M. (2006). Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo. *J Neurosci* 26, 3021-3029.

MAJEWSKA A.K. & SUR M. (2006). Plasticity and specificity of cortical processing networks. *Trends in neurosciences* 29, 323-329.

MALENKA R.C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78, 535-538.

MALENKA R.C. (2003). Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003, 1-11.

MALINOW R. & MALENKA R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience* 25, 103-126.

MASSEY J.M., HUBSCHER C.H., WAGONER M.R., DECKER J.A., AMPS J., SILVER J. & ONIFER S.M. (2006). Chondroitinase ABC digestion of the perineuronal net promotes functional collateral sprouting in the cuneate nucleus after cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 26, 4406-4414.

- MATAGA N., MIZUGUCHI Y. & HENSCH T.K. (2004). Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron* 44, 1031-1041.
- MATAGA N., NAGAI N. & HENSCH T.K. (2002). Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7717-7721.
- MCFARLANE S. (2003). Metalloproteases: carving out a role in axon guidance. *Neuron* 37, 559-562.
- MCLAUGHLIN T., HINDGES R. & O'LEARY D.D. (2003). Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Current opinion in neurobiology* 13, 57-69.
- 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. *Journal of neurochemistry* 96, 1227-1241.
- MEISTER M., WONG R.O., BAYLOR D.A. & SHATZ C.J. (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science (New York, NY)* 252, 939-943.
- MELLITZER G., XU Q. & WILKINSON D.G. (2000). Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins. *Current opinion in neurobiology* 10, 400-408.

- MESULAM M.M. (1978). Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26, 106-117.
- 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 M.P. & SMITH S.J. (2006). Evidence from in vivo imaging that synaptogenesis guides the growth and branching of axonal arbors by two distinct mechanisms. *J Neurosci* 26, 3604-3614.
- MEYER R.L. (1998). Roger Sperry and his chemoaffinity hypothesis. *Neuropsychologia* 36, 957-980.
- MIZE R.R. & LO F. (2000). Nitric oxide, impulse activity, and neurotrophins in visual system development(1). *Brain research* 886, 15-32.
- MOLOTCHNIKOFF S. & ITAYA S.K. (1993). Functional development of the neonatal rat retinotectal pathway. *Brain Res Dev Brain Res* 72, 300-304.
- MONEA S., JORDAN B.A., SRIVASTAVA S., DESOUZA S. & ZIFF E.B. (2006). Membrane localization of membrane type 5 matrix metalloproteinase by AMPA receptor binding protein and cleavage of cadherins. *J Neurosci* 26, 2300-2312.

- MOTT J.D. & WERB Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current opinion in cell biology* 16, 558-564.
- MRSIC-FLOGEL T.D., HOFER S.B., CREUTZFELDT C., CLOEZ-TAYARANI I., CHANGEUX J.P., BONHOEFFER T. & HUBENER M. (2005). Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves. *J Neurosci* 25, 6921-6928.
- MU Y. & POO M.M. (2006). Spike timing-dependent LTP/LTD mediates visual experience-dependent plasticity in a developing retinotectal system. *Neuron* 50, 115-125.
- MURPHY T.H. (2003). Activity-dependent synapse development: changing the rules. *Nature neuroscience* 6, 9-11.
- 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.
- NAKAGAMI Y., ABE K., NISHIYAMA N. & MATSUKI N. (2000). Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation. *J Neurosci* 20, 2003-2010.
- NEVES-FERREIRA A.G., PERALES J., FOX J.W., SHANNON J.D., MAKINO D.L., GARRATT R.C. & DOMONT G.B. (2002). Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. *The Journal of biological chemistry* 277, 13129-13137.

- ORAY S., MAJEWSKA A. & SUR M. (2004). Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron* 44, 1021-1030.
- 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.
- PARSONS M.J., BENCA R.M., BROWNFIELD M.S. & BEHAN M. (2001). Age-associated changes in the serotonergic system in rat superior colliculus and pretectum. *Brain research bulletin* 55, 435-444.
- PAWLAK R., NAGAI N., URANO T., NAPIORKOWSKA-PAWLAK D., IHARA H., TAKADA Y., COLLEN D. & TAKADA A. (2002). Rapid, specific and active site-catalyzed effect of tissue-plasminogen activator on hippocampus-dependent learning in mice. *Neuroscience* 113, 995-1001.
- PENN A.A. & SHATZ C.J. (1999). Brain waves and brain wiring: the role of endogenous and sensory-driven neural activity in development. *Pediatr Res* 45, 447-458.
- PERALES J., NEVES-FERREIRA A.G., VALENTE R.H. & DOMONT G.B. (2005). Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1013-1020.
- PFEIFFENBERGER C., YAMADA J. & FELDHEIM D.A. (2006). Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *J Neurosci* 26, 12873-12884.

POWER C., HENRY S., DEL BIGLIO M.R., LARSEN P.H., CORBETT D., IMAI Y., YONG V.W. & PEELING J. (2003). Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Annals of neurology* 53, 731-742.

QIU S. & WEEBER E.J. (2007). Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses. *Journal of neurophysiology* 97, 2312-2321.

QIU S., ZHAO L.F., KORWEK K.M. & WEEBER E.J. (2006). Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *J Neurosci* 26, 12943-12955.

RAKIC P. (1981). Development of visual centers in the primate brain depends on binocular competition before birth. *Science (New York, NY)* 214, 928-931.

RASHID T., UPTON A.L., BLENTIC A., CLOSSEK T., KNOLL B., THOMPSON I.D. & DRESCHER U. (2005). Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 47, 57-69.

RUTHAZER E.S., AKERMAN C.J. & CLINE H.T. (2003). Control of axon branch dynamics by correlated activity in vivo. *Science (New York, NY)* 301, 66-70.

RUTHAZER E.S. & CLINE H.T. (2004). Insights into activity-dependent map formation from the retinotectal system: a

- middle-of-the-brain perspective. *Journal of neurobiology* 59, 134-146.
- RUTHAZER E.S., LI J. & CLINE H.T. (2006). Stabilization of axon branch dynamics by synaptic maturation. *J Neurosci* 26, 3594-3603.
- SAKAGUCHI D.S. & RADKE K. (1996). Beta 1 integrins regulate axon outgrowth and glial cell spreading on a glial-derived extracellular matrix during development and regeneration. *Brain Res Dev Brain Res* 97, 235-250.
- SANCHEZ A.L., MATTHEWS B.J., MEYNARD M.M., HU B., JAVED S. & COHEN CORY S. (2006). BDNF increases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo. *Development (Cambridge, England)* 133, 2477-2486.
- SAVINO W., ARZT E. & DARDENNE M. (1999). Immunoneuroendocrine connectivity: the paradigm of the thymus-hypothalamus/pituitary axis. *Neuroimmunomodulation* 6, 126-136.
- SAVINO W. & DARDENNE M. (2000). Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine reviews* 21, 412-443.
- SCHMIDT J.T. (1985). Selective stabilization of retinotectal synapses by an activity-dependent mechanism. *Fed Proc* 44, 2767-2772.
- SCHMITT A.M., SHI J., WOLF A.M., LU C.C., KING L.A. & ZOU Y. (2006). Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* 439, 31-37.

SEEDS N.W., BASHAM M.E. & FERGUSON J.E. (2003). Absence of tissue plasminogen activator gene or activity impairs mouse cerebellar motor learning. *J Neurosci* 23, 7368-7375.

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 research bulletin* 66, 128-134.

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.

SHAMY J.L., BUCKMASTER C.A., AMARAL D.G., CALHOUN M.E. & RAPP P.R. (2007). Reactive plasticity in the dentate gyrus following bilateral entorhinal cortex lesions in cynomolgus monkeys. *The Journal of comparative neurology* 502, 192-201.

SHATZ C.J. (1992a). The developing brain. *Sci Am* 267, 60-67.

SHATZ C.J. (1992b). How are specific connections formed between thalamus and cortex? *Current opinion in neurobiology* 2, 78-82.

- SHATZ C.J. (1996). Emergence of order in visual system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 602-608.
- SHI Y. & ETHELL I.M. (2006). Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *J Neurosci* 26, 1813-1822.
- SIMON D.K. & O'LEARY D.D. (1992a). Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J Neurosci* 12, 1212-1232.
- SIMON D.K. & O'LEARY D.D. (1992b). Influence of position along the medial-lateral axis of the superior colliculus on the topographic targeting and survival of retinal axons. *Brain Res Dev Brain Res* 69, 167-172.
- SKAPER S.D., MOORE S.E. & WALSH F.S. (2001). Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Progress in neurobiology* 65, 593-608.
- SMITH A.L., CORDERY P.M. & THOMPSON I.D. (1995). Manufacture and release characteristics of Elvax polymers containing glutamate receptor antagonists. *Journal of neuroscience methods* 60, 211-217.
- STELLWAGEN D. & SHATZ C.J. (2002). An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity. *Neuron* 33, 357-367.

- STERNLICHT M.D. & WERB Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 463-516.
- SUR M. & RUBENSTEIN J.L. (2005). Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science (New York, NY)* 310, 805-810.
- 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.
- TRAN M.D. & NEARY J.T. (2006). Purinergic signaling induces thrombospondin-1 expression in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9321-9326.
- TROPEA D., CALEO M. & MAFFEI L. (2003). Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and chondroitinase ABC on retinal fiber sprouting after denervation of the superior colliculus in adult rats. *J Neurosci* 23, 7034-7044.
- VADAY G.G., FRANITZA S., SCHOR H., HECHT I., BRILL A., CAHALON L., HERSHKOVIZ R. & LIDER O. (2001). Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. *Journal of leukocyte biology* 69, 885-892.

- VADAY G.G. & LIDER O. (2000). Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *Journal of leukocyte biology* 67, 149-159.
- 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.
- VAILLANT C., MEISSIREL C., MUTIN M., BELIN M.F., LUND L.R. & THOMASSET N. (2003). MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Molecular and cellular neurosciences* 24, 395-408.
- VAN VACTOR D., WALL D.P. & JOHNSON K.G. (2006). Heparan sulfate proteoglycans and the emergence of neuronal connectivity. *Current opinion in neurobiology* 16, 40-51.
- VECIL G.G., LARSEN P.H., CORLEY S.M., HERX L.M., BESSON A., GOODYER C.G. & YONG V.W. (2000). Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 61, 212-224.
- VOGT K., MELLOR J., TONG G. & NICOLL R. (2000). The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 26, 187-196.
- WANG K.H., MAJEWSKA A., SCHUMMERS J., FARLEY B., HU C., SUR M. & TONEGAWA S. (2006). In vivo two-photon

- imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 126, 389-402.
- 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.
- WELLS J.E., RICE T.K., NUTTALL R.K., EDWARDS D.R., ZEKKI H., RIVEST S. & YONG V.W. (2003). An adverse role for matrix metalloproteinase 12 after spinal cord injury in mice. *J Neurosci* 23, 10107-10115.
- WEN Z. & ZHENG J.Q. (2006). Directional guidance of nerve growth cones. *Current opinion in neurobiology* 16, 52-58.
- WILLSHAW D. (2006). Analysis of mouse EphA knockins and knockouts suggests that retinal axons programme target cells to form ordered retinotopic maps. *Development (Cambridge, England)* 133, 2705-2717.
- WRIGHT J.W. & HARDING J.W. (2004). The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Progress in neurobiology* 72, 263-293.
- YAMAGATA M., HERMAN J.P. & SANES J.R. (1995). Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci* 15, 4556-4571.
- YAMAGATA M. & SANES J.R. (1995). Lamina-specific cues guide outgrowth and arborization of retinal axons in the optic

tectum. *Development (Cambridge, England)* 121, 189-200.

**YONG V.W. (2005).** Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature reviews* 6, 931-944.

**YU W.H., YU S., MENG Q., BREW K. & WOESSNER J.F., JR. (2000).** TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry* 275, 31226-31232.

**ZHANG L.I., TAO H.W., HOLT C.E., HARRIS W.A. & POO M. (1998).** A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature* 395, 37-44.

# 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](#)