

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

Henrique Rocha Mendonça

**MODULAÇÃO DA GAP-43 FOSFORILADA
DURANTE O DESENVOLVIMENTO E NA
PLASTICIDADE RETINOTECTAL**

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

Orientadora: Prof. Dra. Paula Campello Costa Lopes



**NITERÓI
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

HENRIQUE ROCHA MENDONÇA

**MODULAÇÃO DA GAP-43 FOSFORILADA DURANTE O DESENVOLVIMENTO
E NA PLASTICIDADE RETINOTECTAL**

**Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Neurociências, do Instituto de Biologia
da Universidade Federal Fluminense,
como parte dos requisitos necessários
à obtenção do Grau de Mestre em
Neurociências.**

Orientadora: Profa. Dra. Paula Campello Costa Lopes

Niterói

2009

HENRIQUE ROCHA MENDONÇA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Aprovada em julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Paula Campello-Costa – Orientador
Universidade Federal Fluminense

Profa. Dra. Priscilla Oliveira Silva
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Roberto Paes de Carvalho
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Alfred Sholl Franco
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Niterói, 2009

AGRADECIMENTOS

Nesse momento gostaria de agradecer a todas as pessoas que gostam de mim, que me incentivaram e me ajudaram a desenvolver esse trabalho. Sem a ajuda de vocês, essa realização não seria completa...

Primeiramente, quero agradecer à Sheila, minha namorada, meu amor, minha companheira, minha parceira, minha revisora, minha dupla... que me ajudou em todos os passos dessa caminhada, desde os experimentos, à escrita, às noites sem dormir...

Estou devendo, também, muitos agradecimentos aos meus pais, que me incentivam sempre na minha carreira e me ajudaram como nunca (ou como sempre?) na fase final dessa dissertação.

Continuando pela família, não posso me esquecer também da Nanci, responsável por encher meu bucho! Afinal de contas, saco vazio não pára em pé!! Consegui, Nanci! Jesus atendeu às nossas orações...

Aqui vai um agradecimento especial à minha orientadora, Paulinha, sempre muito amiga e presente, que sofreu como nunca (ou como sempre?) com minha desorganização. Muito obrigado... Sem uma orientadora como você, esse trabalho não seria possível.

À Minha revisora, Dri, que fez o possível e o impossível para que esse trabalho ficasse tinindo!

Aos amigos do laboratório. Não sabia que eu ia conseguir uma turma tão legal como essa. Aninha, Pablo, Pat Rung, Pat Velasco, Felipe, Bruna, Michele, Renata, Juliana, Rachel, Grasi, Daiane, Vanessa, Lívia, Priscilla, Cláudio, Tita, Maria....

E agradeço a você, que teve/terá a paciência de ler o meu trabalho...

Espero que goste.

Muitas pessoas,
Inteligentes por nascimento,
Ficaram burras por excesso de leitura

Rubem Alves

SUMÁRIO

1 ORGANIZAÇÃO DOS SISTEMAS SENSORIAIS, p. 15

1.1 O SISTEMA VISUAL, p. 18

1.2 O COLÍCULO SUPERIOR, p. 21

1.3 DESENVOLVIMENTO DA VIA RETINO-COLICULAR, p. 26

1.4 PERÍODO CRÍTICO, p. 32

1.5 PLASTICIDADE NEURAL NO SISTEMA RETINOCOLICULAR, p. 35

1.6 GAP-43, p. 44

2 OBJETIVOS, p. 55

3 METODOLOGIA, p. 56

3.1 ANIMAIS, p. 56

3.2 TRATAMENTO SISTÊMICO, p. 57

3.3 ENUCLEAÇÃO MONOCULAR, p. 57

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA WESTERN BLOT, p. 58

3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS, p. 59

3.6 WESTERN BLOT, p. 59

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS, p. 61

5 RESULTADOS, p. 62

5.1 ONTOGÊNESE DA GAP-43p NAS CAMADAS SUPERFICIAIS DO COLÍCULO SUPERIOR, p. 62

5.2 EFEITO DA ENUCLEAÇÃO MONOCULAR DENTRO DO PERÍODO CRÍTICO NA EXPRESSÃO DE GAP-43p NAS CAMADAS VISUAIS DO COLÍCULO SUPERIOR, p. 66

5.3 EFEITO DA ENUCLEAÇÃO MONOCULAR FORA DO PERÍODO CRÍTICO NA EXPRESSÃO DE GAP-43P NAS CAMADAS VISUAIS DO COLÍCULO SUPERIOR, p. 68

5.4 BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO RETRÓGRADA ALTERA A EXPRESSÃO DE GAP-43p NAS CAMADAS SUPERFICIAIS DO COLÍCULO SUPERIOR, p. 70

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM DAPIRIDAMOL NA EXPRESSÃO DE GAP-43p NAS CAMADAS VISUAIS DO COLÍCULO SUPERIOR, p. 72

6 DISCUSSÃO, p. 74

6.1 GAP-43 fosforilada e desenvolvimento retinotectal, p. 75

6.2 GAP-43 fosforilada e plasticidade induzida por enucleação monocular, p. 81

6.3 GAP-43 fosforilada e plasticidade induzida pelo bloqueio de mensageiros retrógrados, p. 87

6.4 GAP-43 fosforilada e plasticidade induzida por adenosina, p. 93

7 CONCLUSÕES, p. 97

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 98

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Representação de mapas topográficos, *p. 17*
- Figura 2** Representação das projeções retinotectais no colículo superior de ratos, *p. 19*
- Figura 3** Esquema da laminação no colículo superior em corte coronal., *p. 21*
- Figura 4** Morfologia dos neurônios do colículo superior de mamíferos, *p. 23*
- Figura 5** Orientação topográfica dos axônios retinotectais ao longo da via visual, *p. 27*
- Figura 6** Orientação topográfica das projeções retinotectais mediada por gradiente de efrinas, *p. 29*
- Figura 7** Ondas retinianas e eliminação de axônios ectópicos, *p. 30*
- Figura 8** Fotomicrografia de campo escuro ilustrando a progressiva restrição topográfica das projeções retinotectais ipsolaterais no terço anterior do colículo superior A-D, *p. 36*
- Figura 9** Fotomicrografia de campo escuro ilustrando a reorganização das projeções retinotectais do olho intacto após lesão de retina (LR) contralateral LR no DPNO com 2 dias de sobrevivência (A), *p. 37*
- Figura 10** Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes coronais do colículo superior de animais submetidos ao tratamento intraperitoneal com salina ou com Narg, *p. 39*
- Figura 11** Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes do colículo superior de animais submetidos ao tratamento intraperitoneal entre os dias DPN 20 – 27 com salina (A,C) ou Mepacrina (B,D), *p. 40*
- Figura 12** Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes em orientação parasagital do colículo superior de animais submetidos a dietas controle (A) ou restrita (B) em triptofano, *p. 41*
- Figura 13** Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes em orientação parasagital do colículo superior de animais DPN14 tratados com EHNA, *p. 42*

- Figura 14** Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes do colículo superior de animais submetidos ao ELVAX contendo PBS ou DM-43 e animais submetidos a injeção intraocular com PBS ou IL-2. *p. 43*
- Figura 15** Esquema ilustrando o modelo de enucleação monocular. *p. 58*
- Figura 16** Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior durante o desenvolvimento. *p. 65*
- Figura 17** Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior após enucleação monocular dentro do período crítico. *p. 67*
- Figura 18** Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior após enucleação monocular fora do período crítico. *p. 69*
- Figura 19** Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior após tratamento com inibidores da síntese de mensageiros retrógrados. *p. 71*
- Figura 20** Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior após tratamento com dipiridamol. *p. 73*
- Figura 21** Correlação entre o estado de reorganização morfológica das projeções retinotectais e os níveis de expressão de GAP-43p. *p.96*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A1	Receptor de Adenosina A1
A2	Receptor de Adenosina A2
A2a	Receptor de Adenosina A2a
AA	Ácido Araquidônico
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
AtT-20	Linha celular derivada da pituitária anterior de camundongos
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPA	Alfa-Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazol Propionato
AMPAr	Receptor AMPA
ARPP 19	Fosfoproteína Regulada por AMPc-19
ATP	Adenosina Trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CA	Corno de Amon
CAMKII	Cinase Ativada por Cálcio/Calmodulina
CAP-23	Proteína Ativadora de Catabolismo 23
CGR	Célula Ganglionar da Retina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CS	Colículo Superior
D1	Receptor de Dopamina 1
DAG	Diacilglicerol
DIP	Dipiridamol
DPN	Dia Pós-Natal
E	Dia Embrionário
EHNA	Eritro-9 (2-Hidroxi-3-Nonil) Adenina
ELVAX	Etilenovinilacetato
ENU	Enucleado
Eph	Efrina
ERK	Proteína cinase ativada por mitógenos

F-actina	Actina filamentosa
GABA	Ácido Gama-Amino-Butírico
G-actina	Actina Globular
GAP-43	Proteína Associada à Crescimento 43 kd
GAP-43p	Isoforma Fosforilada da GAP-43
GMP	Guanosina Monofosfato
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HRP	Peroxidase de Rábano Silvestre
HuD	Proteína D da Família Hu
IL-2	Interleucina-2
IP3	Inositol Trifosfato
L-NAME	L Nitroarginina Metil Ester
LR	Lesão de Retina
LTP	Potenciação de longa duração
MAP-2	Proteína Associada a Microtúbulo do tipo 2
MEPA	Mepacrina
MK801	Antagonista do Receptor NMDA
Não-M e Não-P	Células Ganglionares do Tipo Não-Magnocelular e Não-Parvocelular
Narg	L-Nitro-arginina
NCAM-180	Molécula de Adesão Celular Neural -180
NGF	Fator de Crescimento do Nervos
NGL	Núcleo Genuculado Lateral
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMDAr	Receptor NMDA
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NR2a	Subunidade 2a do Receptor NMDA
NR2b	Subunidade 2b do Receptor NMDA
OD	Olho Direito
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PIP2	Fosfatidil Inositol Bifosfato

PKC	Proteína Cinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PSA	Ácido Polisiático
PSD-95	Proteína de Densidade Pós-Sináptica de 95 kd
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA-m	Ácido Ribonucléico mensageiro
SAI	<i>Stratum Album Intermediale</i>
SAP	<i>Stratum Album Profundum</i>
SDF-1	Fator derivado de Célula do Estroma
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SGI	<i>Stratum Griseum Intermediale</i>
SGP	<i>Stratum Griseum Profundum</i>
SGS	<i>Stratum Griseum Superficiale</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SO	<i>Stratum Opticum</i>
SZ	<i>Stratum Zonale</i>
TBS-T	Salina Tamponada com Tris + Twen
Tipo M	Células Ganglionares do Tipo Magnocelular
Tipo P	Células Ganglionares do Tipo Parvocelular
TrkB	Receptor Tirosina Cinase B
ZT	Zona Terminal

RESUMO

O sistema visual de ratos apresenta uma organização retinotópica precisa, que se desenvolve, durante as duas primeiras semanas pós-natais, a partir de projeções difusas. Esse mapa retinotópico preciso é gerado e mantido por atividade elétrica correlacionada pré- e pós-sináptica, o que pode ser atribuído a sinalização retrógrada e neuromodulação. Previamente, nosso grupo mostrou que tanto lesões de retina quanto inibição de degradação de adenosina ou mensageiros retrógrados, como o óxido nítrico e o ácido araquidônico, induzem arborização dos axônios retinotectais ipsolaterais pela superfície do colículo superior. O fenômeno de crescimento axonal é, freqüentemente, associado a reorganização do cone de crescimento e aumento na expressão da isoforma fosforilada da proteína associada ao crescimento de 43 kd (GAP-43p). No presente trabalho, estudamos a expressão da GAP-43p e o curso temporal de sua modulação durante o desenvolvimento normal de ratos pigmentados e após diferentes manipulações indutoras de plasticidade. Para isso, as camadas superficiais de ratos *Lister hooded* foram estudadas sob diferentes abordagens: (1) durante o desenvolvimento normal. (2) Após diferentes intervalos de sobrevida após enucleação monocular no décimo ou vigésimo primeiro dia pós-natal (DPN). (3) Após injeções intraperitoneais diárias de inibidores de mensageiros retrógrados óxido nítrico e ácido araquidônico (com Narg 50mg/kg, entre DPN 9-12; com quinacrina 40mg/kg após o entre DPN20-27, respectivamente). E (4), após tratamento intraperitoneal diário com um bloqueador do transportador de adenosina (com dipiridamol 50mg/kg entre DPN 9-12, entre DPN20-27). Os animais controles receberam a mesma dinâmica de tratamento, porém com injeção de seus veículos correspondentes (salina ou óleo de oliva). Posteriormente, as camadas visuais do colículo superior foram extraídas e submetidas a análise por *western blot*. Nossos resultados demonstram que a GAP-43p é regulada durante o desenvolvimento, com maior expressão antes da abertura dos olhos. A enucleação monocular induz aumento na expressão da GAP-43p. Em DPN10 um grande aumento foi observado 24 horas após a lesão. Nenhuma diferença foi detectada depois de 48 horas da lesão. Esses resultados são corroborados pela análise do curso temporal da plasticidade retinotectal induzida por lesão de retina, sendo mais rápida dentro do período crítico que após o mesmo. O grupo tratado com dipiridamol apresentou aumento na expressão da GAP-43p dentro do período crítico, mas sem alterações após seu término. Além disso, animais submetidos ao tratamento com Narg apresentaram decréscimo na expressão de GAP-43p, enquanto o tratamento com quinacrina levou a um aumento na expressão da GAP-43p. Em conjunto, esses dados sugerem que a modulação da expressão da GAP-43p é um evento importante que pode estar associado à arborização axonal nesses modelos de plasticidade retinotectal e à manutenção de sua conectividade.

ABSTRACT

The rat visual system presents a precise retinotopic organization, that develops, from diffuse projections, within the first two weeks after birth. This precise retinotopic map is generated and maintained by acoplated pre- and post-synaptic activity, which could be related to retrograde signaling and neuromodulation. Previously, our group showed that both retinal lesions and the inhibition of adenosine degradation or retrograde messengers synthesis, such as nitric oxide (NO) and arachidonic acid (AA), induces expansion of uncrossed retinotectal axons toward the superior colliculus surface. The axon growth phenomena is frequently associated to reorganization of growth cone and phospho-Growth associated protein 43 (GAP-43p) up-regulation. In this context, we decided to study pGAP-43 expression and time-course modulation of this protein during the normal development and after different retinotectal induced-plasticity models. To achieve these goals, *Lister Hooded* rats were studied during normal development, submitted to monocular enucleation at the 10th and 21th post-natal days (PND), daily injections of adenosine transport blockade with dypiridamole (50mg/kg, ip) or retrograde messengers inhibitors (with L-Narg 50 mg/kg, ip. within the critical period; with quinacrine 40mg/kg, ip. after de critical period). Control animals were treated with vehicle (saline or olive oil). Afterwards, the visual layers of superior colliculus were extracted and submitted to western blot analysis. Our results show that GAP-43p is regulated during development, with higher levels before eye-opening. Monocular enucleation induces an up-regulation in pGAP-43. At PND10 the great increase was observed 24 hours after lesion. No difference was detected 48 hours after-lesion. On the other hand, at PND21 the increase was obtained one week after lesion. These results are in agreement with the retinal lesion induced retinotectal plasticity time-course, which are faster inside the critical period than afterwards. The dypiridamole-treated group presented an increase in its expression within the critical period, but no alteration afterwards. Moreover, animals submitted to L-Narg treatment presented a decrease in pGAP-43 expression, whereas quinacrine treatment leads to an up-regulation in pGAP-43. Taken together, these data suggest that the modulation of pGAP-43 expression is an important event that could be associated with the sprouting observed in these models of retinotectal plasticity and its connectivity maintenance.

1 ORGANIZAÇÃO DOS SISTEMAS SENSORIAIS

Os sistemas sensoriais, apesar de serem responsáveis pela criação de sensações originadas por diferentes formas de energia (energia eletromagnética, mecânica, térmica e química), empregam estratégias comuns para cumprir suas tarefas. Todos eles utilizam receptores específicos para responder aos estímulos do ambiente, integram a informação transmitida simultaneamente por diferentes receptores, transformam o sinal recebido do ambiente em uma resposta eletro-química nos neurônios, transmitem a informação para centros neurais hierarquicamente superiores, comparam o resultado com experiências prévias e integram a resposta com outras modalidades sensoriais. As informações geradas pelos sistemas sensoriais têm como principal função a percepção (Hudspeth e Logothetis, 2000). Além desta, os sistemas sensoriais também auxiliam no controle dos movimentos e na regulação das funções dos órgãos internos (Bagasteiro, e colaboradores. 2005).

Cada modalidade sensorial possui uma classe de receptores específica para realizar a etapa chamada transdução, que consiste na transformação de sinais físicos variados em resposta eletro-química pelos neurônios. Essa resposta eletro-química diferencia os estímulos através da variação de suas propriedades, tais como frequência de disparo de potencial eletrotônico e a população de neurônios ativada. Uma população de neurônios será ativada se o estímulo for apresentado dentro de seu campo receptivo, sendo modulada por sua intensidade (Butts e colaboradores, 2007; Desbordes e colaboradores, 2008). As informações codificadas pelos neurônios são levadas por vias neuronais paralelas aos centros encefálicos superiores, respeitando as relações qualitativas ou espaciais das

estruturas sensoriais periféricas, de forma a construir mapas topográficos (Callaway, 2005). Nos centros superiores, especialmente nos córtices, as vias paralelas dos sistemas sensoriais convergem e são combinadas para gerar a resposta perceptiva (Meienbrock e colaboradores, 2007).

A organização das vias sensoriais gera a formação de mapas topográficos, caracterizados pela representação da superfície receptora no tecido neural. Estes mapas apresentam características distintas. Há os mapas contínuos, onde a topografia representa as relações espaciais dos receptores periféricos, como no caso do mapa retino-colicular; e os mapas discretos, baseados em informações qualitativas desses receptores, como observado no mapa glomerular olfatório (Figura 1). Todos os mapas sensoriais têm se enquadrado em uma dessas categorias ou a ambas. Os mapas visuais e auditivos são predominantemente contínuos, enquanto os olfatórios e gustativos, discretos. O mapa somato-sensorial tem componentes de ambas as categorias: possui uma representação contínua da superfície corporal, mas possui um arranjo qualitativo discreto no córtex de barril (Luo e Flanagan, 2007).

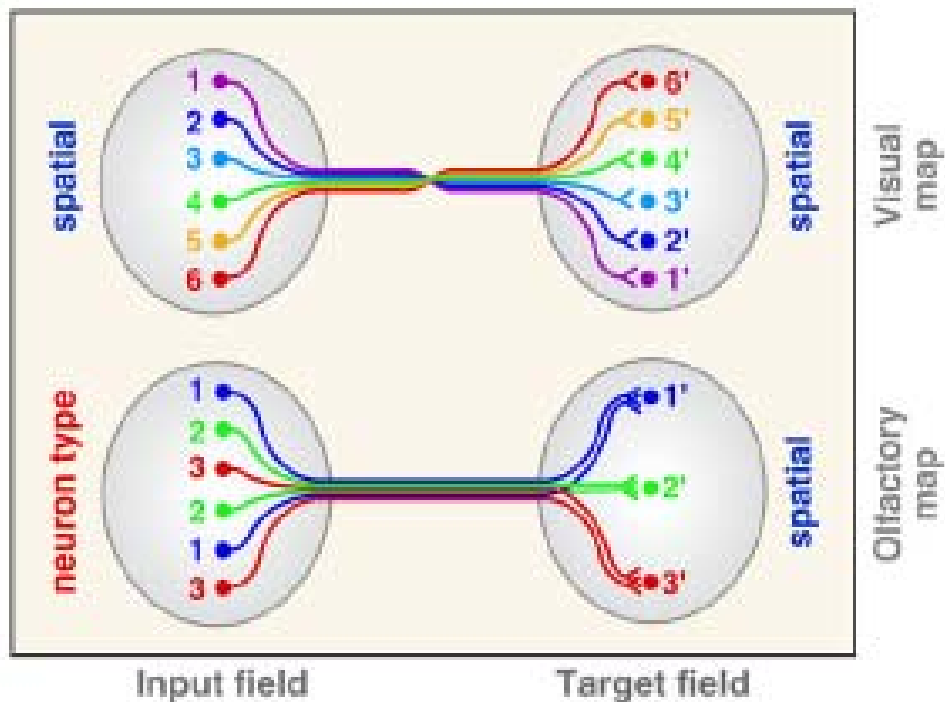


Figura 3: Esquema da laminação no colículo superior em corte coronal.

A linha pontilhada delimita as camadas de processamento visual na região dorsal e as camadas profundas de processamento auditivo, motor e integração de informações. *stratum griseum superficiale* (SGS), *stratum opticum* (SO), *stratum griseum intermediale* (SGI), *stratum album intermediale* (SAI), *stratum griseum profundum* (SGP) e *stratum album*

Esses mapas neurais correspondem a uma estratégia do sistema nervoso de aproveitar o componente espacial como forma de codificação da informação (Goodhill, 2007). Um exemplo interessante dessa codificação espacial pode ser observado pela detecção auditiva de retardo auricular na oliva superior, onde neurônios são topograficamente distribuídos de forma que sua posição corresponde a um sensor de retardo inter-auricular, indicando a posição da fonte do som no plano horizontal (Overholt, e colaboradores, 1992).

1.1 O Sistema Visual

A primeira estrutura nervosa do sistema visual que participa da transdução sensorial é a retina, que possui um alto padrão de organização baseado em camadas celulares intercaladas por camadas de contatos sinápticos que também apresentam uma organização intralaminar. As células responsáveis pela transdução da energia luminosa em sinal eletro-químico são os fotorreceptores. Fotorreceptores mais sensíveis à luz localizam-se, predominantemente, na retina periférica (bastonetes), enquanto que os menos sensíveis à luz (cones), na retina central. Os fotorreceptores comunicam-se diretamente com as células bipolares, responsáveis por passar a informação para as células ganglionares da retina (CGR), que são as únicas células retinianas que disparam potenciais de ação, sendo a única eferência retiniana.

As células bipolares da retina central comunicam-se com poucas células ganglionares e as da retina periférica com muitas, o que confere maior discriminação à retina central. Há três classes de células ganglionares em humanos: as do *tipo M*, as do *tipo P* e as *não-M* e *não-P*. As células M apresentam campos receptivos maiores e conduzem potenciais de ação mais rápido que as outras classes, que por sua vez, apresentam relação centro-periferia de oposição de cores.

Nas camadas plexiformes (de contatos sinápticos) ocorrem modificações na resposta, como amplificação do sinal e oposição centro-periferia. Os axônios das células ganglionares da retina de cada olho se reúnem formando o nervo óptico, que se dirige ao quiasma óptico (Yang , 2004).

No quiasma óptico, em primatas, ocorre decussação parcial das fibras de forma que projeções da retina nasal decussam para o tracto óptico contralateral, enquanto que os axônios da retina temporal permanecem do lado ipsolateral. Por outro lado, em roedores, a decussação é quase total, onde 95% das fibras de um olho cruzam para o tracto óptico contralateral e 5% permanecem do mesmo lado (Figura 2). O tracto óptico dirige-se, então, para alvos como o colículo superior (CS) e o núcleo geniculado lateral do tálamo (NGL) (Zhu e Julien, 1999).

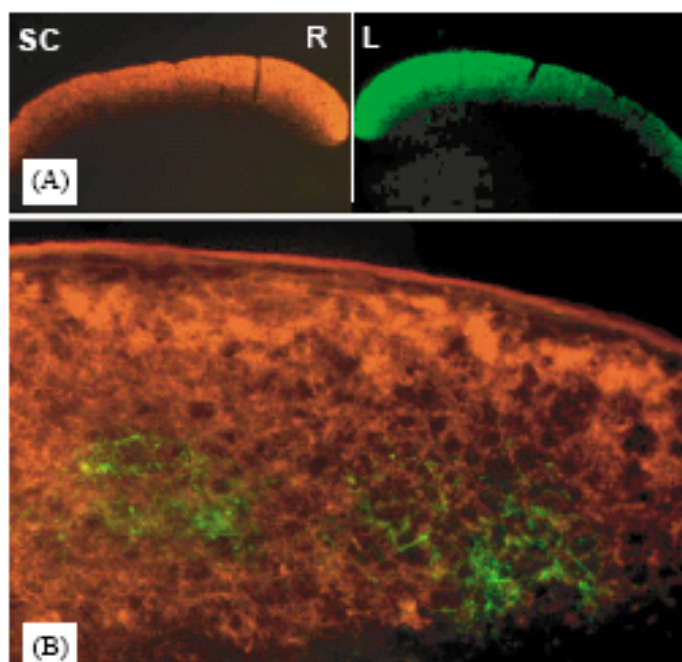


Figura 2: Representação das projeções retinotectais no colículo superior de ratos. (A) Pequeno aumento ilustra a marcação das projeções provenientes da retina após injeção intraocular de marcadores fluorescentes no olho contralateral. (B) A marcação contralateral representada em vermelho e a marcação das projeções ipsolaterais em verde. Notar a sobreposição destas projeções no alvo (Isenmann e colaboradores, 2003).

O colículo superior é uma estrutura com a função principal de direcionar os órgãos sensoriais da cabeça a objetos de interesse, e será abordado com mais detalhes na próxima seção deste trabalho (May, 2006).

A via de projeções envolvida com a percepção visual passa pelo núcleo geniculado lateral. Esse núcleo é altamente organizado: Possui uma estrutura dividida em camadas topograficamente organizadas, respeitando a posição dos fotorreceptores na retina, sendo que cada camada recebe aferências de neurônios que processam informações de qualidades visuais distintas (células M, P e não-M e não-P) e segregadas por olho. Além disso, cada NGL recebe aferências referentes ao campo visual do lado oposto. Via radiação óptica, a maior parte dos neurônios do NGL, projeta-se para o córtex visual primário (Iwai e Kawasaki, 2009).

O córtex visual primário é a principal estrutura responsável pela percepção visual. É uma estrutura altamente organizada, possuindo laminação com organização topográfica, e organizações transversais intra-laminares, como as colunas de dominância ocular. Projeções que trazem informações de qualidades distintas projetam-se para lâminas diferentes da camada IV e III do córtex estriado. Na camada III, as informações que vieram segregadas e paralelas desde a retina começam a convergir. As informações dos dois olhos se convergem para gerar a sensação de profundidade, células de qualidades diferentes comunicam-se, os campos receptivos se unem para gerar células sensíveis à barras, formas, direção de movimento, o que culmina na percepção visual (Ross e colaboradores, 2000).

1.2 O Colículo Superior:

O colículo superior é uma estrutura multissensorial que participa da via visual, e sua principal função é direcionar os órgãos sensoriais da cabeça, como os olhos, orelhas, boca e vibrissas a objetos de interesse (Helmet e Keller, 2007). Tem sido descrito recentemente, uma função de suas camadas mais superficiais na percepção visual envolvida com *blindsight* (Girman e Lund, 2007). Sua grande importância para ratos é demonstrada pela robustez das projeções trigêmiotectais (May, 2006).

Como toda estrutura sensorial da via visual, o colículo superior apresenta uma organização altamente compartimentalizada em sete camadas. As três camadas superficiais (*Stratum Zonale-SZ*, *Stratum Griseum Superficiale-SGS* e *Stratum Ópticum-SO*) representam as camadas visuais do colículo superior, enquanto que as outras quatro (*Stratum Griseum Intermediale-SGI*, *Stratum Album Intermediale-SAI*, *Stratum Griseum Profundum-SGP* e *Stratum Album Profundum-SAP*), representam o colículo profundo, uma região multisensorial efetora (Iling, 1996) (Figura 3).

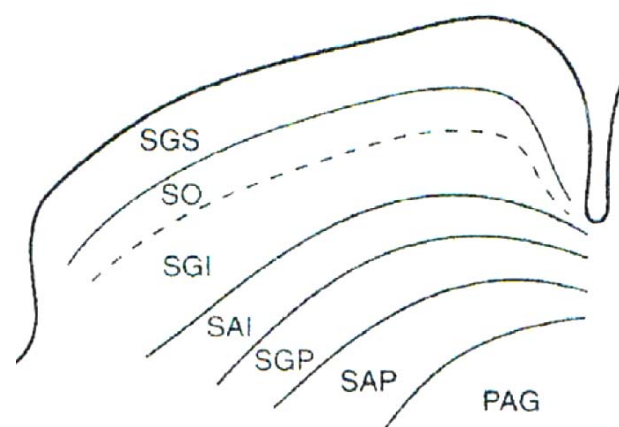


Figura 3: Esquema da laminação no colículo superior em corte coronal. A linha pontilhada delimita as camadas de processamento visual na região dorsal e as camadas profundas de processamento auditivo, motor e integração de informações. *stratum griseum superficiale* (SGS), *stratum opticum* (SO), *stratum griseum intermediale* (SGI), *stratum album intermediale* (SAI), *stratum griseum profundum* (SGP) e *stratum album profundum* (SAP). O *stratum zonale* não está representado. Mais ventralmente, encontra-se a substância cinzenta periaquedutal (PAG). (Parsons e colaboradores., 2001).

O *Stratum Zonale* (SZ) é uma camada muito pequena e com poucas e pequenas células marginais que orientam seus dendritos para a porção superior do *Stratum Griseum Superficiale* com sensibilidade à direção de movimentos lentos (Mooney e colaboradores, 1985).

O *Stratum Griseum Superficiale* (SGS) é a camada que recebe a maior parte dos *inputs* visuais provenientes da retina, do córtex estriado e de áreas associadas. Divide-se em duas subcamadas: A camada inferior contém células maiores, enquanto que a superior é mais espessa e contém células esféricas (Figura 4). As células dessa subcamada possuem: (i) propriedades elaboradas, independentes do córtex estriado, como percepção de contornos, estrias e seletividade de orientação, (ii) campos receptivos complexos sem oposição centro-perifera e (iii) segregação figura/plano-de-fundo, participando no processo de percepção visual (Girman e Lund, 2007). São observadas células horizontais, com caráter de interneurônios, envolvidos em sinapses dendro-dendríticas, responsivas a alvos brilhantes estacionários, sem seletividade de direção; células com campos receptivos pequenos e células com campos receptivos grandes, que estendem seus dendritos pela superfície do colículo, sendo responsivas a movimentos rápidos; e células estreladas, que são interneurônios inibitórios, sensíveis à direção de movimentos lentos, envolvidas no efeito supressor de um estímulo distrator (Mooney e colaboradores, 1985; Mize, 1988. Isa e Saito, 2001) (Figura 4).

O *Stratum Ópticum* (SO) é uma camada com poucas células, ocupada por fibras provenientes da retina e córtex que se dirigem às camadas superficiais do colículo superior (Mooney e colaboradores, 1985; May, 2006) (Figura 4).

O *Stratum Griseum Intermediale* (SGI) é a primeira camada profunda do colículo superior. Divide-se em duas subcamadas, sendo a superficial com mais células que a profunda, esta última, dominada por fibras rostro-caudais. São encontradas muitas células multipolares, que variam em tamanho e orientação dendrítica horizontal ou vertical (até o SGS), sendo as últimas as principais formadoras do feixe pré-dorsal, a principal eferência do colículo superior. Encontra-se também, pequenas células horizontais, com perfil de interneurônios (Isa e Saito, 1999) (Figura 4).

O *Stratum Album Intermediale* (SAI) contém numerosas fibras que vão da direção dorso-medial para a ventro-lateral (Redgrave e colaboradores, 1986).

O *Stratum Griseum Profundum* (SGP) é a última camada celular do colículo superior e o *Stratum Album Profundum* (SAP) é a camada mais interna do CS, composta por fibras (May, 2006).

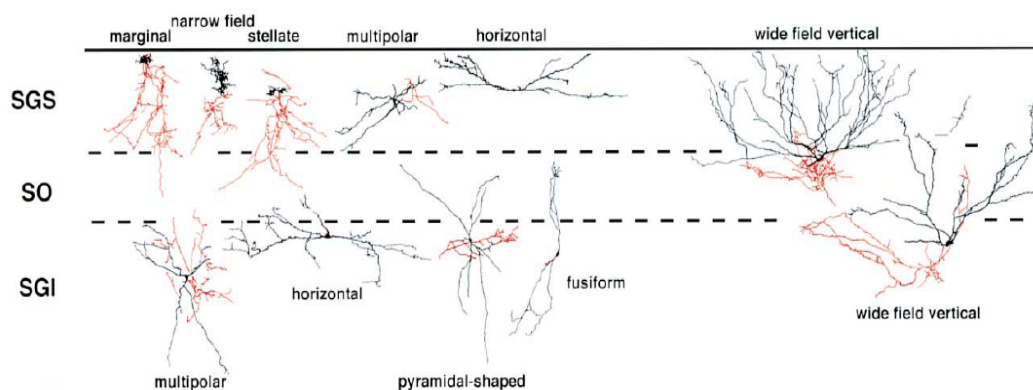


Figura 4: Morfologia dos neurônios do colículo superior de mamíferos. 6 sub-classes de neurônios nas camadas superficiais (células marginais, estreladas, multipolares, horizontais e verticais) e 5 sub-classes nas camadas intermediária (células multipolares, horizontais, em forma piramidal, fusiforme e verticais) estão ilustradas. Soma e dendritos aparecem em preto e axônio em vermelho. (Isa e Saito, 2001)

As camadas superficiais do CS comunicam-se com outras estruturas mesencefálicas que auxiliam em importantes funções visuais. Dentre estas, o complexo pré-tectal auxilia na detecção de movimentos (Taylor e colaboradores, 1986; Usunoff e colaboradores, 2007). O núcleo parabigeminal, através de projeções colinérgicas para as regiões do SGS e SGI, diminuem o limiar de ativação das células do SGI, facilitando o disparo de comandos sacádicos dirigidos pelo SGS (Chevalier e Mana, 2000; Kobayashi e colaboradores, 2001; Sooksawate e colaboradores, 2008). Além disso, observa-se comunicação com os núcleos da rafe, que enviam projeções serotoninérgicas axo-axônicas para o SGS suprimindo o *input* excitatório retiniano (González e colaboradores, 2008; Serfaty e colaboradores, 2008; Penedo e colaboradores., 2009). Há também conexão com o núcleo geniculado lateral levando informações que favorecem a visão discriminativa (Conley e Friederich-Ecsy, 1993) e com o complexo pulvinar/lateral posterior, levando informações para o direcionamento de atenção visual (Sugita e colaboradores, 1983). Aferências noradrenérgicas provenientes do lócus ceruleus atingem o SGS e suprimem a resposta de suas células à estimulação visual (Zhang e colaboradores, 1999).

Outra projeção visual que chega ao CS é proveniente do córtex. Células corticais e retinianas projetam-se para populações diferentes no colículo superior, com as retinianas terminando em posição superior às corticais (Boka e colaboradores, 2006, Girman e Lund, 2007). Células corticais da camada V das áreas 17 e 18 de Broadman projetam-se para o SGS de forma retinotópica, havendo também projeções para regiões profundas, como SGI. Áreas visuais extra-estriatais projetam-se para SGS e SO (Harvey e Worthigton, 1990). Especula-se que essa projeção cortico-tectal glutamatérgica auxilie em

características complexas dos neurônios coliculares, como seletividade de direção e binocularidade (Ogasawara, 1984).

Nas camadas profundas, supõe-se que haja uma área de fixação ocular rostral e uma área sacádica caudal, que se inibem mutuamente (Munoz e Istvan, 1998). De fato, Munoz e Fecteau (2002) mostraram que há células no SGI rostral de macacos que respondem à fixação ao invés de responderem a movimentos sacádicos. Essas camadas recebem aferências de outras modalidades sensoriais, integram essas informações com a informação visual e enviam comandos motores para o movimento dos olhos e da cabeça (May, 2006).

As informações auditivas vêm de estruturas subcorticais que se projetam para o SGI ipsilateral, em uma maneira topográfica, de forma que se encaixa no mapa visual por volta do dia pós-natal 27(DPN27) (Vachon-Presseau e colaboradores, 2009). Terminações somatossensoriais também formam um mapa no CS nas camadas SGI e SGP, e esse mapa tem o atributo interessante de ser a representação do corpo do ponto de vista visual, de forma que possa se encaixar topograficamente ao mapa visual. Dessa forma, as patas são representadas adjacentes ao campo visual inferior e as vibrissas no ponto onde cortam o campo visual (McHaffie e colaboradores, 1989). As informações de sistemas sensoriais diferentes chegam ao SGI em paralelo e permanecem segregadas em aglomerados. Porém, os amplos campos dendríticos das células multipolares, que formam o feixe pré-dorsal, integram essas informações, somam com a informação visual obtida pelos seus dendritos verticais interlaminares, e enviam a resposta motora para os núcleos efetores responsáveis pelos movimentos sacádicos dos olhos e pelos movimentos da cabeça através do feixe pré-dorsal via SAI (May, 2006).

Ao mesmo tempo, conexões tecto-tectais (glutamatérgicas e GABAérgicas) conectam os dois colículos superiores de forma espelhada regulando o nível e a região de ativação de cada colículo, o que parece ser fundamental para o tipo de resposta evocada (Olivier e colaboradores, 2000).

1.3 Desenvolvimento da Via Retino-Colicular:

Durante o desenvolvimento do sistema visual de ratos, as CGRs são geradas no período entre o 14º e o 22º dia embrionário (Reese e Colello, 1992). Seus cones de crescimento chegam ao quiasma óptico no dia embrionário 15 (E15), em E16 alcançam a margem anterior do colículo superior e em E17 inicia-se a sinaptogênese com seus alvos no SGS (Horsburgh e Sefton, 1986; Lund e Lund, 1976). A sinaptogênese acontece lentamente, de forma que poucas sinapses estão presentes durante a primeira semana, sendo o pico de sinaptogênese imediatamente anterior ao fenômeno de abertura dos olhos, no DPN 14, continuando a acontecer até DPN 30 (Warton e McCart, 1983).

Ao chegarem ao colículo superior, os axônios das CGRs dirigem seus axônios para as células do SGS em sítios topograficamente organizados. Assim, células do eixo nasal-temporal da retina projetam-se para o eixo caudal-rostral do colículo superior e projeções do eixo-dorsal ventral retinianas terminam no eixo lateral-medial do CS (Debski e Cline, 2002) (Figura 5). Projeções ipsolaterais estabilizam-se em uma camada mais ventral do SGS que as projeções contralaterais, ficando dessa forma, dois mapas visuais sobrepostos, olho-independentes (May, 2006)

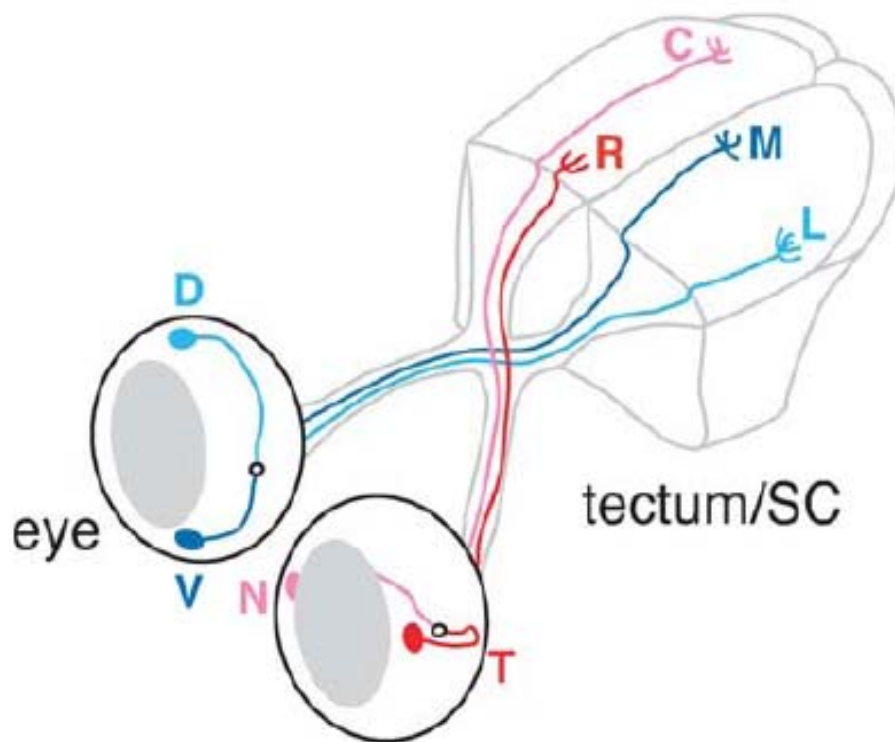


Figura 5: Orientação topográfica dos axônios retinotectais ao longo da via visual. Os axônios das células ganglionares formam os nervos ópticos e decussam na altura do quiasma óptico. Através do tracto óptico as células ganglionares da retina atingem regiões apropriadas dentro do colículo superior, estabelecendo conexões apropriadas seguindo a organização retina temporal -> tecto rostral; retina nasal -> tecto caudal; retina dorsal -> tecto lateral; retina ventral -> tecto medial; D= dorsal. V= ventral. N= nasal. T= temporal. R= rostral. C= caudal. M= medial. L= lateral. (Lemke e Reber, 2005)

A organização das células no eixo ântero-posterior do colículo superior é gerada por gradientes de moléculas de atração-repulsão expressas diferencialmente no colículo e nas regiões correspondentes da retina. As moléculas presentes no alvo pertencem à família das Efrinas-A, enquanto que seus receptores são os receptores Eph-A, presentes nos axônios das CGR. Os receptores na retina obedecem a um gradiente que aumenta a expressão em seu pólo temporal, enquanto que seus ligantes no colículo superior tem sua expressão gradativamente maior na direção do pólo posterior (figura 6) (McLaughlin e O'Leary, 2005). A resposta primária da ligação entre Eph-A e seu ligante é a

repulsão do axônio, porém a ligação da efrina-A com seu receptor Eph-A apresenta uma dualidade de resposta, visto que baixas concentrações de efrina-A induzem atração das CGR. Dessa forma, os gradientes do ligante e do seu receptor determinarão o papel atrativo ou repulsivo da molécula (Yates e colaboradores, 2001).

A organização das projeções retinotectais no eixo médio-lateral depende do contra-gradiente de efrinas-B e receptores Eph-B. A maior expressão de receptores Eph-B é encontrada mais próxima a retina ventral e ao colículo lateral, enquanto que maior expressão de efrinas-B é observada na retina dorsal e no colículo medial (Figura 6) (Chilton e colaboradores, 2006). De forma semelhante à efrina-A, baixas concentrações de efrinas-B são atrativas enquanto que altas concentrações são repulsivas. A sinalização via efrina-B não interfere com o direcionamento dos axônios primários, participando apenas do processo de arborização látero-medial em direção à sua zona terminal (ZT). Um axônio primário que cresce lateralmente à sua ZT é atraído para o pólo medial, enquanto que outro que cresce medialmente é repelido para a lateral na sua direção de fixação (McLaughlin e colaboradores, 2003). Todas as árvores axonais do animal são formadas por essa arborização intersticial latero-medial. Supõe-se que a sinalização por receptor Eph-B funcione como um sensor de densidade de ligante, de forma que quando encontra a concentração ótima induz a expressão de moléculas de adesão celular e integrinas que fixam o terminal sináptico (McLaughlin e O'Leary, 2005).

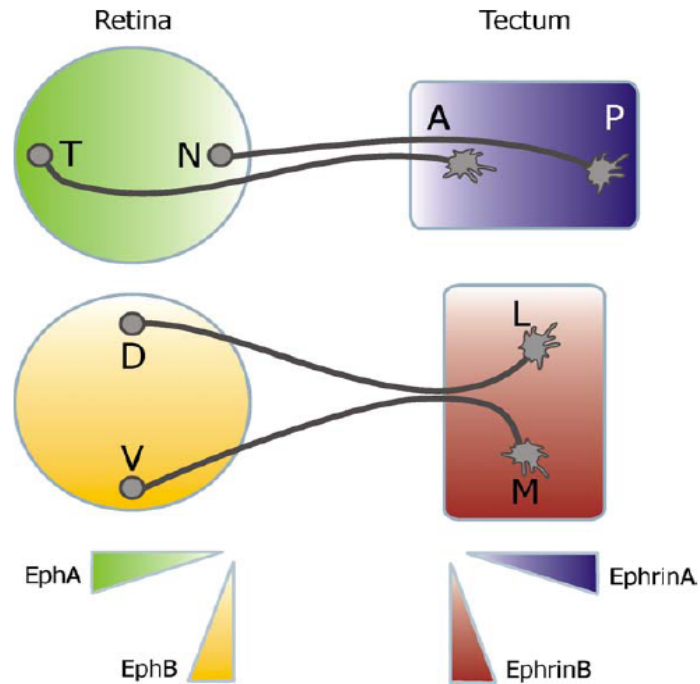


Figura 6: Orientação topográfica das projeções retinotectais mediada por gradiente de efrinas. Axônios da retina temporal crescem e estabelecem conexões na região anterior do colículo enquanto axônios nasais se projetam para regiões mais caudais. Células da região ventral da retina conectam-se com células na região medial do colículo superior e a retina dorsal com o colículo lateral. Essa orientação é guiada através da interação de receptores Eph A e EphB aos ligantes efrinas A e B, respectivamente (Chilton, 2006).

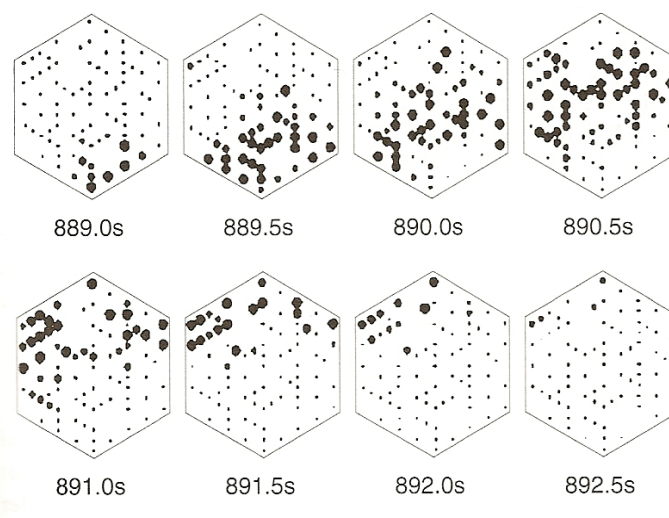
Nem todos os ramos axonais gerados pela arborização intersticial alcançam sua zona terminal apropriada. Dessa forma, ocorre um refinamento sináptico mediado por morte celular natural e eliminação de ramos axonais ectópicos (Isenmann e colaboradores, 2003).

Existem duas fases de morte celular natural das células ganglionares da retina. A primeira ocorre durante seu período de gênese e a segunda durante a primeira semana pós-natal, devido à competição por sítios sinápticos e fatores tróficos presentes nas células alvo do colículo superior (Bahr, 2000).

A eliminação de ramos axonais ectópicos ocorre durante as duas primeiras semanas pós-natal e envolve atividade elétrica espontânea correlacionada

mediada pelo fenômeno conhecido como ondas retinianas (Figura 7A) (Meister *et al*, 1991) Essa atividade elétrica é gerada inicialmente através de sinapses elétricas e sinapses colinérgicas comandadas por células amácrinas (Figura 7B). Essas sinapses comunicam células amácrinas e CGRs (Zheng e colaboradores, 2004). Em uma fase posterior, com a maturação de células bipolares, as ondas retinianas passam a ser mediadas por transmissão glutamatérgica (Figura 7B). Posteriormente, o sistema GABAérgico e glicinérgico modulam negativamente a propagação dessas ondas, encerrando sua atividade (Zhou e Zhao, 2000). A íntima anatomia das conexões faz com que células ganglionares vizinhas, que respondem à mesma região do campo visual, ativem sincronicamente a mesma célula alvo no colículo superior, enquanto que células distantes disparam de forma dessincronizada e por isso são segregadas (Figura 7) (McLaughlin e colaboradores, 2003). A ativação entre os dois olhos também ocorre de maneira independente, sem correlação temporal e espacial, o que permite a segregação ocular desenvolvida em todos os níveis hierárquicos do sistema visual (Iwai e Kawasaki, 2009; Torborg e Feller, 2005).

A



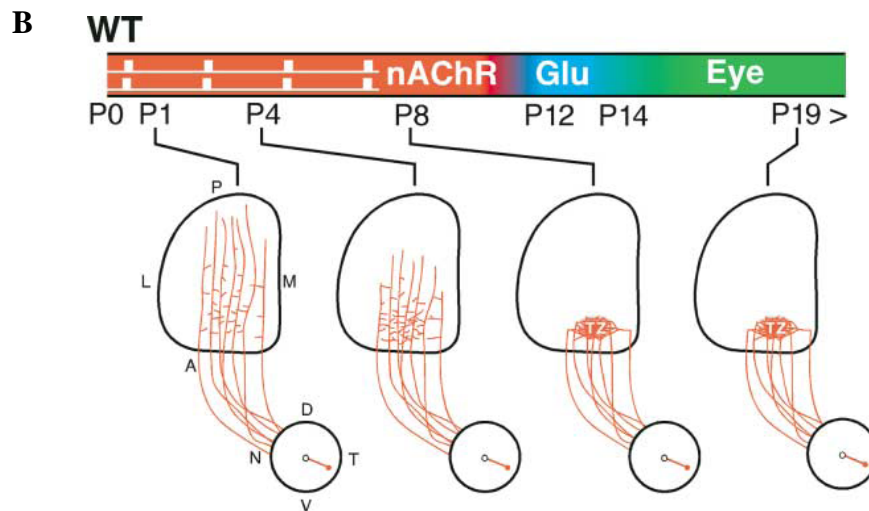


Figura 7: Ondas retinianas e eliminação de axônios ectópicos. A atividade elétrica espontânea correlacionada na retina (A), inicialmente, colinérgica (P0-12) e depois glutamatérgica (P12-14) guia a eliminação de ramos ectópicos e estabilização dos axônios retinianos na zona terminal correspondente no colículo superior (Meister e colaboradores, 1991; McLaughlin e colaboradores, 2003).

Em contrapartida, a experiência visual já mostrou ser importante para funções multissensoriais do colículo. Animais mantidos no escuro (*dark rearing*) não formam o mapa auditivo (roedores) (Withington-Wray e colaboradores, 1990), nem fazem a integração multissensorial (gatos) (Wallace e colaboradores, 2004). Além disso, pessoas cegas desde o nascimento apresentam déficits na localização sonora no plano vertical. (Zwiers e colaboradores, 2001). Prichard e colaboradores (2007) mostra que ratos submetidos à *dark rearing* continuado desde o nascimento apresentam déficit de inervação retiniana no SO, o que pode estar mediando a perda das funções multissensoriais, visto que as células verticais desta região medeiam a comunicação entre as camadas visuais e multissensoriais do CS. Outros trabalhos de *dark rearing* precoce prolongado em roedores mostraram que a ausência da atividade visual promove um aumento nos campos receptivos dos neurônios no SGS, o que parece representar falha na manutenção das projeções retino-coliculares, e conseqüente inespecificidade

(Binns e Salt, 1997; Carrasco e colaboradores, 2005). Essa falha na manutenção das projeções retinianas pode estar associada à falta de fenômenos moleculares pós-sinápticos como a potenciação de longa duração (LTP) que acontece a partir da abertura dos olhos: aumento da PSD-95 nos dendritos de visão central, aumento no número de sinapses silentes, aparecimento de corrente mediada por AMPA e aumento da razão de corrente AMPA/NMDA (Lu e Constantine-Paton, 2004).

1.4 Período Crítico:

O período crítico corresponde a uma etapa no desenvolvimento onde os circuitos cerebrais estão sendo formados e estabelecidos, em um processo influenciado por experiência e atividade elétrica, e inclui ainda, uma janela posterior onde esses circuitos são capazes de se reorganizar em resposta a um desequilíbrio no sistema, como privação sensorial ou lesão. Cada circuito cerebral apresenta um período crítico específico, sendo controlado pela expressão diferencial de moléculas ao longo do desenvolvimento. Além disso, o período crítico de uma determinada área só poderá ser iniciado quando suas aferências já estiverem estabelecendo sinapses, e seu encerramento se dá com a maturação das mesmas. Portanto, o rato nasce em pleno período crítico do sistema retino-colicular, que inicia sua sinaptogênese em E17, período este, que dura, aproximadamente até o final da terceira semana pós-natal (Hooks e Chen, 2007).

Recentemente, tem sido demonstrado que a regulação dos períodos críticos depende principalmente do equilíbrio entre excitação/inibição. Por

exemplo, no córtex visual, o sistema GABAérgico promove o início do período crítico e a manutenção da atividade GABAérgica determina o fechamento deste período (Hooks e Chen, 2007). O equilíbrio excitação-inibição parece estar envolvido também com o período crítico do colículo superior, visto que correntes GABAérgicas estão presentes nesse período, e aumentam no final do período crítico, com a maturação da subunidade do receptor GABA_A. Essa maturação é atingida em resposta à ativação glutamatérgica, com a chegada dos aferentes corticais, de modo que o período crítico entra em seu processo de encerramento. Simultaneamente, acontece uma troca nas subunidades dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA, de NR2b para NR2a, de modo que os canais passam a ficar menos tempo abertos, dificultando o estabelecimento de novas sinapses uma vez que essa troca requer maior sincronização de atividade elétrica (Shi e colaboradores, 1997; Aamodt e colaboradores, 2000). O início do período crítico depende do ácido polisiálico (PSA), que regula negativamente a inervação GABAérgica perissomática. O PSA é expresso em níveis intermediários em DPN3 e desaparece durante o período crítico do colículo superior (Cristo e colaboradores, 2007; Tsuji e colaboradores, 1997).

A modulação por sistemas de neurotransmissores/neuromoduladores também influencia o equilíbrio excitação-inibição. Nas camadas visuais do colículo superior, a adenosina age sobre receptores A₁ inibitórios no início do desenvolvimento, o que promove uma menor estabilidade do sistema retino-tectal. Subsequentemente, receptores A_{2a} têm sua expressão aumentada promovendo uma maior estabilização dessas conexões e contribuindo para o fim de seu período crítico (Gomes e colaboradores, submetido). A transmissão serotoninérgica de projeções originadas nos núcleos da rafe também contribui

para os períodos críticos. A serotonina inibe a transmissão sináptica das projeções retinianas no colículo superior, deixando o sistema mais maleável (Serfaty e colaboradores, 2008; Malayev e Debski, 1998).

Outro importante regulador do período crítico é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A estimulação visual aumenta a expressão de BDNF no CS, o qual por sua vez, estimula a indução de ramos axonais e suprime a inibição GABAérgica (Cohen-Cory, 1999; Pollock e Frost, 2003; Frost e colaboradores, 2001; Grantyn e colaboradores, 2002). A matriz extracelular também contribui para o fim do período crítico. Proteoglicanos de sulfato de condroitin formam redes perineuronais que inibem a plasticidade neural (Tropea e colaboradores, 2003). Manipulações nessas moléculas são capazes de regular a expressão e duração do período crítico.

Foi demonstrado na literatura que manipulações sensoriais também podem modular os períodos críticos. O *dark rearing* atrasa o início do período crítico e o prolonga, provavelmente via redução da inibição GABAérgica (Fagiolini e colaboradores, 1994; Pallas e Razak, 2006). Por outro lado, o enriquecimento ambiental também modula os períodos críticos, por promover maior expressão de BDNF e TrkB (Currie e colaboradores, 2006).

1.5 Plasticidade Neural no Sistema Retinocolicular:

A plasticidade neural é caracterizada por mudanças adaptativas na estrutura e função do sistema nervoso em resposta à estimulação ou a alterações no seu microambiente interno. Os fenômenos plásticos se dividem em dois grandes grupos: a plasticidade natural, que ocorre durante o desenvolvimento dos circuitos cerebrais; e a plasticidade induzida, que ocorre com intervenções nos padrões de estimulação ou manipulações no microambiente do sistema nervoso. Normalmente, ambos os tipos de plasticidade são preferencialmente expressos durante o período crítico de cada estrutura cerebral. Dessa forma, a janela favorável à plasticidade induzida no córtex visual primário (dominância ocular) é entre o 21º e o 35º dias pós-natal e no sistema retino-colicular é do dia do nascimento até DPN 21 (Fagiolini e colaboradores, 1994; Serfaty e colaboradores, 2005).

A plasticidade natural do CS ocorre durante as três primeiras semanas pós-natais. Ao nascimento, os axônios das CGRs inervam de maneira difusa todo o eixo ântero-posterior (Figura 8E), médio-lateral e todas as lâminas das camadas visuais do CS (Figura 8A) (Serfaty e Linden, 1994; Serfaty e colaboradores, 2005). Posteriormente, vai ocorrendo uma eliminação dos ramos ectópicos das projeções posteriores numa sequência rostro-lateral para caudo-medial, sendo que as projeções ipsolaterais ficam confinadas ao terço rostral do colículo superior (Figura 8F) (Serfaty e Linden, 1994). Essa eliminação também promove o refinamento laminar, de modo que as projeções ipsolaterais restringem-se em aglomerados delimitados na borda ventral do SGS (Serfaty e Linden, 1994; Serfaty e colaboradores, 2005) (Figura 8D).

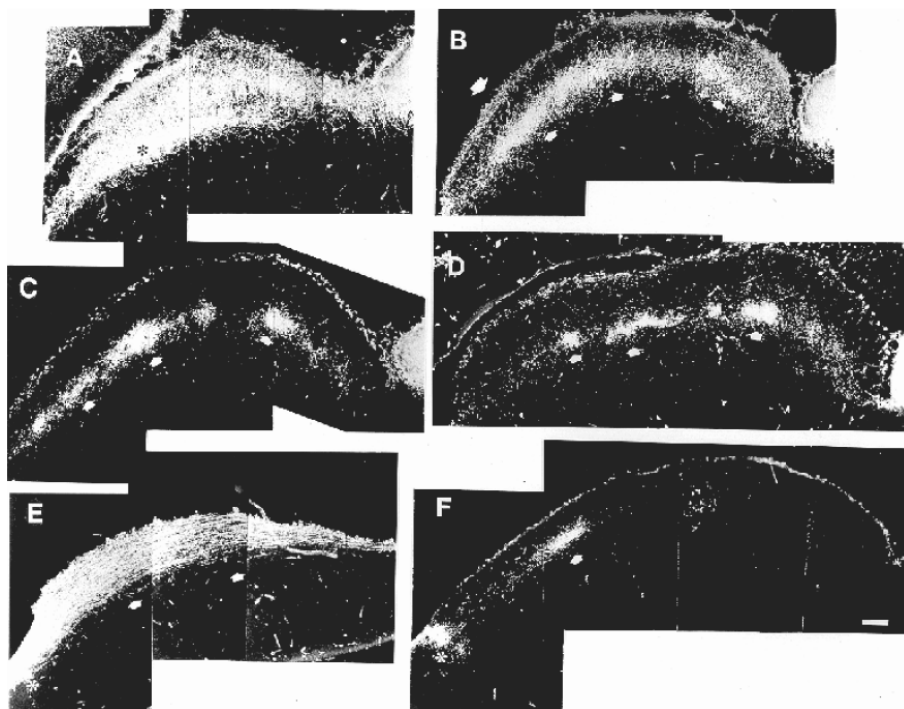


Figura 8: Fotomicrografia de campo escuro ilustrando a progressiva restrição topográfica das projeções retinotectais ipsolaterais no terço anterior do colículo superior. A-D (cortes coronais em DPN 0, 3, 5 e 10, respectivamente; E-F (cortes parassagitais em DPN 1 e 10, respectivamente); Os ratos receberam injeção intra-ocular de peroxidase no dia pós-natal 0 (DPN0). Notar que as projeções transitórias entre DPN0-3 (A, B e E) se restringem entre DPN5-10 (C, D e F) em aglomerados de marcação terminal nas regiões profundas do SGS (Serfaty e Linden, 1994).

A plasticidade induzida do sistema retino-colicular é atingida quando se interfere com processos do desenvolvimento que medeiam o refinamento, estabilização ou manutenção das projeções retinianas.

Dentro do período crítico, experimentos com deservação parcial (lesão temporal de retina) ou completa (enucleação) de um olho ao colículo superior mostraram uma rápida expansão das projeções ipsolaterais do olho intacto para a superfície do CS (Figura 9A-B). Por outro lado, fora desse período é possível ainda induzir reorganização de conexões, contudo o curso-temporal para esta plasticidade é mais longo (Figura 9C-D). Essa reorganização se dá,

provavelmente, porque a remoção dos aferentes contralaterais reduz a transmissão sináptica total nas células do SGS com resposta binocular. Conseqüentemente, o crescimento/reorganização axonal dos axônios provenientes do olho intacto é induzido (Serfaty e colaboradores, 2005; Trindade e colaboradores, em preparação).

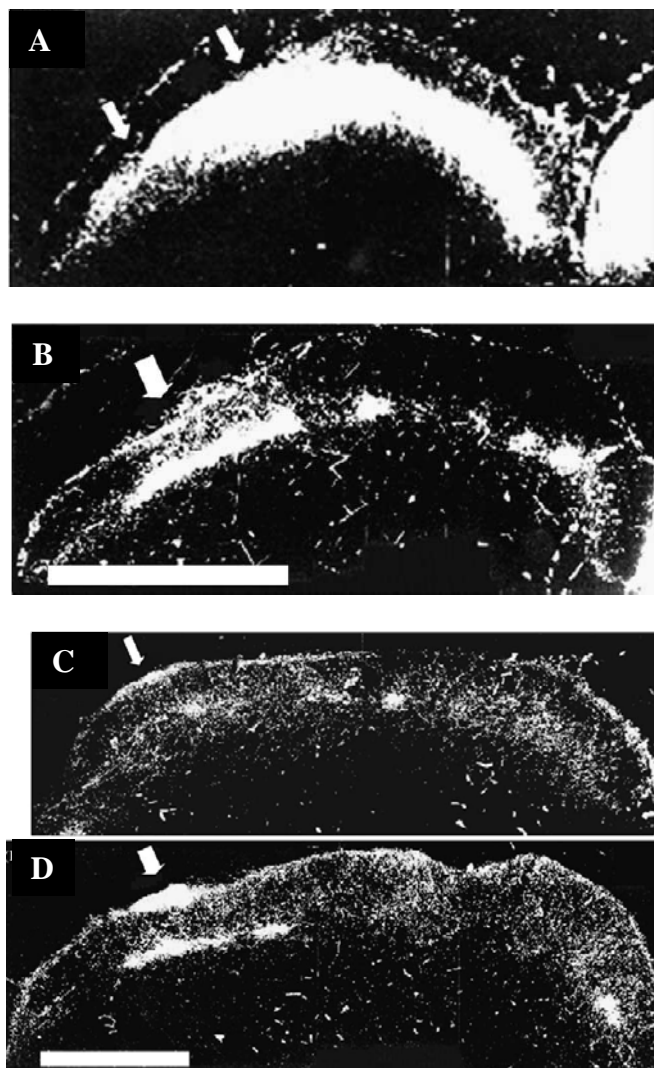


Figura 9: Fotomicrografia de campo escuro ilustrando a reorganização das projeções retinotectais do olho intacto após lesão de retina (LR) contralateral. LR no DPN0 com 2 dias de sobrevivência (A), LR no DPN10 com 2 dias de sobrevivência (B). LR no DPN21 com 3 semanas (C) e 6 meses de sobrevivência (D). Notar a reorganização dos axônios para região superficial lateral do colículo superior e a manutenção das projeções profundas na região medial do alvo (Serfaty e colaboradores., 2005).

A projeção retinotectal é predominantemente glutamatérgica, com uma pequena população (6%) GABAérgica (Caruso e colaboradores., 1989). Desta forma, vários estudos já buscaram identificar a participação do receptor NMDA de glutamato para o estabelecimento de especificidade sináptica na via retinotectal (Ernst e colaboradores., 1998; Simon e colaboradores., 1992; Cline e Constantine-Paton, 1990). A ativação dos receptores NMDA leva ao influxo de cálcio e com isso a ativação de vários sistemas enzimáticos tais como proteínas cinases (CAMKII e PKC), fosfatases, óxido nítrico sintase (NOS) e fosfolipase A₂ (PLA₂), dentre outras.

Nos últimos anos vários trabalhos do nosso laboratório têm interferido com estas diferentes vias de sinalização com o objetivo de caracterizar seu papel na formação do mapa topográfico retinotectal. Assim, já foi demonstrado que o equilíbrio entre a atividade de proteínas cinases e fosfatases também é um potente modulador da conectividade retinotectal. Animais tratados com inibidores de calcineurina apresentam uma expansão nas projeções retinotectais ipsolaterais enquanto que inibidores da CaMKII e PKC induziram a focalização dos aglomerados de marcação retinotectal ipsolateral (Trindade, dissertação de mestrado; Santos, dissertação de mestrado).

Outra forma de reduzir a força da sinapse retino-colicular se dá através da inibição da sinalização retrógrada mediada por óxido nítrico (NO) e ácido araquidônico (AA).

O NO é classicamente gerado pela NOS a partir da ativação de receptores NMDA e influxo de cálcio e a partir de então, difunde-se para o terminal pré-sináptico, onde promove uma maior liberação de neurotransmissor e por conseqüência leva a maior estabilização sináptica (Dawson e Snyder, 1994).

A inibição da NOS dentro do período crítico promove uma expansão das projeções ipsolaterais dentro da camada ventral do SGS (Figura 10 A-D) e amplifica o efeito plástico induzido pela lesão de retina temporal, conforme ilustrado na (Figura 10 E-F) (Campello-Costa e colaboradores, 2000).

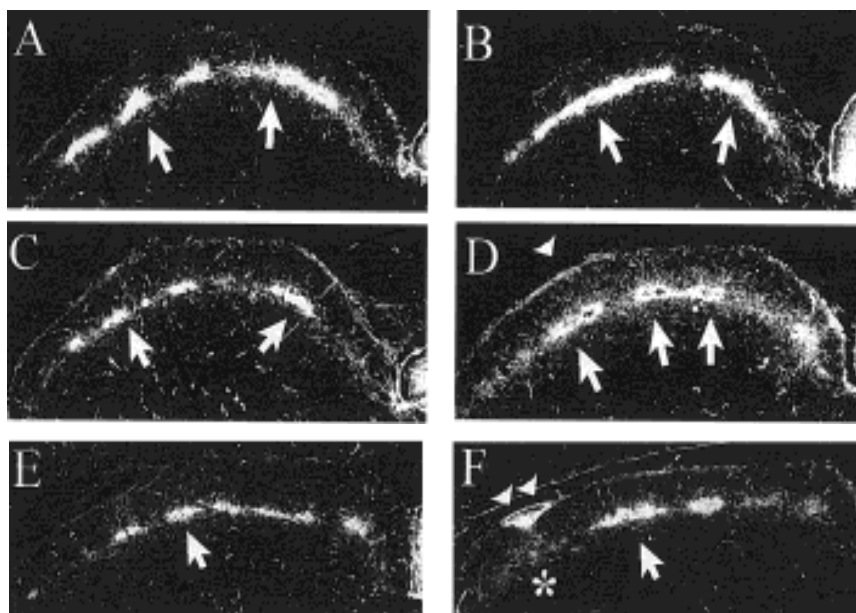


Figura 10: Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes coronais do colículo superior de animais submetidos ao tratamento intraperitoneal com salina (A,C,E) ou com Narg (B,D,F). (A –D) Animais normais tratados entre os dias DPN 5 – 8 (A,B) ou DPN 9 – 12 (C,D); (E,F) Animais submetidos a lesão de retina (LR) contralateral em DPN21. Notar o aglomerado de marcação superficial bastante evidente 1 semana após a LR no animal tratado com Narg (Campello-Costa e colaboradores., 2000).

O AA é formado a partir da ativação da PLA_2 e devido a seu caráter lipídico, parece desempenhar importantes papéis como sinalizador retrógrado na ativação de sistemas enzimáticos como PKC, GAP-43 que estão implicadas em extensão de neuritos e plasticidade sináptica (Akiyama e colaboradores., 2004;

Geddis e colaboradores., 2004; Schmidt e colaboradores., 2003; Coffey e colaboradores., 1994). Recentemente nosso grupo demonstrou que o bloqueio farmacológico da síntese de AA ou de leucotrienos abole a estabilização das sinapses retinotectais a partir da quarta semana do desenvolvimento, além de amplificar a resposta plástica induzida por lesão de retina contralateral (Campello-Costa *et al.*, 2006) (Figura 11). Estes estudos são corroborados com outros mais recentes que mostram que a deficiência nutricional de ácidos graxos essenciais desde o período embrionário promove, no animal maduro, um rompimento das conexões retinotectais (Velasco, 2009 – dissertação de mestrado).

Em conjunto estes dados sugerem que após o final do período crítico, ocorre uma troca nos mensageiros retrógrados que estabilizam as conexões retino-tectais.

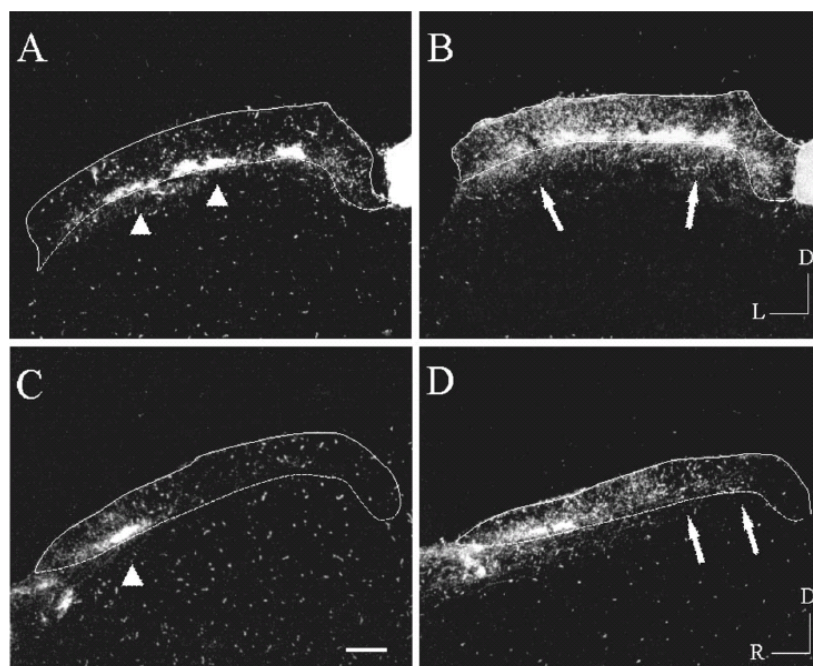


Figura 11: Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes do colículo superior de animais submetidos ao tratamento intraperitoneal entre os dias DPN 20 – 27 com salina (A,C) ou Mepacrina (B,D). Notar a presença de muitas fibras por todas as camadas do CS e o rompimento topográfico com fibras se estendendo para regiões caudais do colículo (Campello-Costa e colaboradores., 2006).

Sistemas de neurotransmissores/neuromoduladores também estão presentes no colículo superior e são capazes de interferir com a organização da via retino-colicular. A inervação serotoninérgica oriunda dos núcleos da rafe aparece no colículo de forma paralela com o desenvolvimento dos axônios retinotectais (Rhoades e colaboradores, 1990). Dados do Laboratório mostram que o aumento na disponibilidade sináptica de serotonina através de tratamento farmacológico com a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação deste neurotransmissor, promove um rompimento da topografia retinotectal (Bastos e colaboradores, 1999). Por outro lado, a redução nutricional de triptofano, o precursor da serotonina, reduz os níveis de serotonina nos núcleos da rafe e leva a um atraso no desenvolvimento da via retinotectal (González e colaboradores, 2008; Penedo e colaboradores, 2009) (Figura 12).

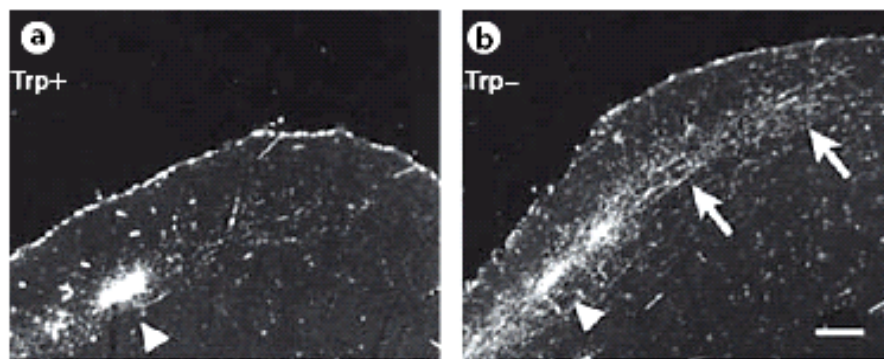


Figura 12: Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes em orientação parassagital do colículo superior de animais submetidos a dietas controle (A) ou restrita (B) em triptofano, aminoácido essencial, precursor da serotonina. Notar a expansão das projeções ipsolaterais para regiões mais caudais do colículo em relação ao tratado com a dieta controle (González e colaboradores, 2008).

Um neuromodulador importante no sistema nervoso é a adenosina (Fredholm e colaboradores, 2005). Nosso laboratório tem tido particular interesse

em estudar o papel da adenosina no desenvolvimento da topografia retinotectal. Dados recentes demonstram que a adenosina age, em fases precoces do desenvolvimento retinotectal, sobre receptores A_1 , que modulam negativamente a transmissão sináptica e favorecem a emissão de colaterais axonais. O amadurecimento da via retino-colicular ocorre simultaneamente com a troca dos receptores A_1 por receptores A_{2a} , facilitadores da transmissão, o que termina por estabilizar essas sinapses. O aumento na disponibilidade de adenosina na fenda sináptica, dentro do período crítico, onde a expressão de A_1 é mais forte, promove expansão das *projeções* retinianas (Figura 13), enquanto que o mesmo tratamento após o período crítico não altera o padrão de conectividade retiniana, provavelmente pelo aumento da força sináptica induzida pela maior ativação de receptores A_{2a} (Gomes e colaboradores, submetido; Gomes e colaboradores., em preparação).

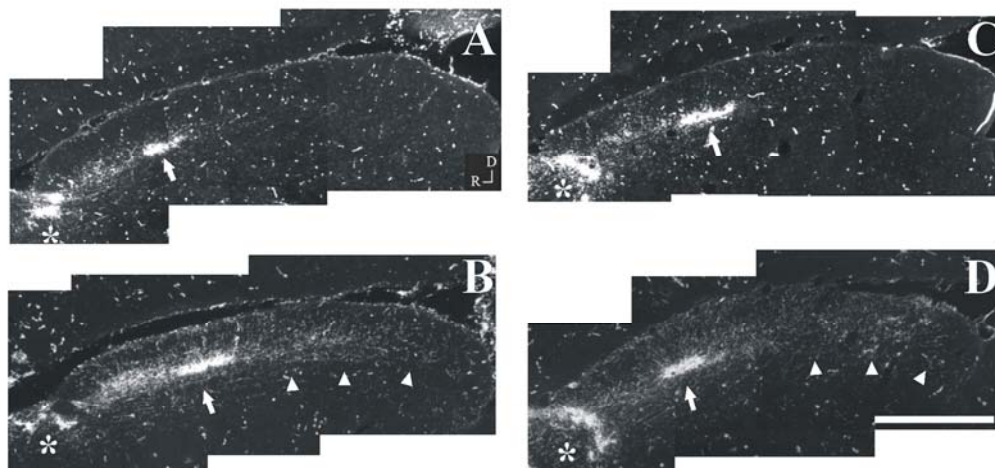


Figura 13: Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes em orientação parassagital do colículo superior de animais DPN14 tratados com EHNA. (A, C) Projeção ipsilateral de animais tratados com veículo apresentam aglomerados de marcação terminal (setas) na região anterior do colículo. (B, D) Após tratamento com EHNA, um inibidor da adenosina deaminase, os animais apresentaram aumento na densidade de marcação terminal por todas as regiões do colículo superior, incluindo regiões caudais (cabeça de setas). O asterisco mostra a região pré-tectal. Escala 500 μ m (Gomes e colaboradores., submetido).

Outras moléculas que sabidamente modulam fenômenos plásticos no sistema nervoso também vêm sendo investigadas no nosso modelo de estudo. Oliveira-Silva e colaboradores investigaram como o remodelamento da matriz extracelular influencia o desenvolvimento retinotectal. Em um trabalho recente, foi demonstrado que a aplicação local de um inibidor de metaloprotease-9, o DM-43 sobre o CS modifica o padrão dos aglomerados de marcação ipsilateral, que passa a se concentrar mais em regiões laterais que em mediais, exibindo um padrão imaturo de fibras (Oliveira-Silva e colaboradores, 2007) (Figura14) .

Mediadores inflamatórios também parecem modular a plasticidade natural do sistema retinotectal. Outro trabalho demonstrou que a utilização intraocular de uma citocina pró-inflamatória, interleucina-2, leva a uma expansão dos axônios retinianos no colículo superior (Araújo e colaboradores, FESBE 2009; Campello-Costa e colaboradores., SfN 2009) (Figura 14).

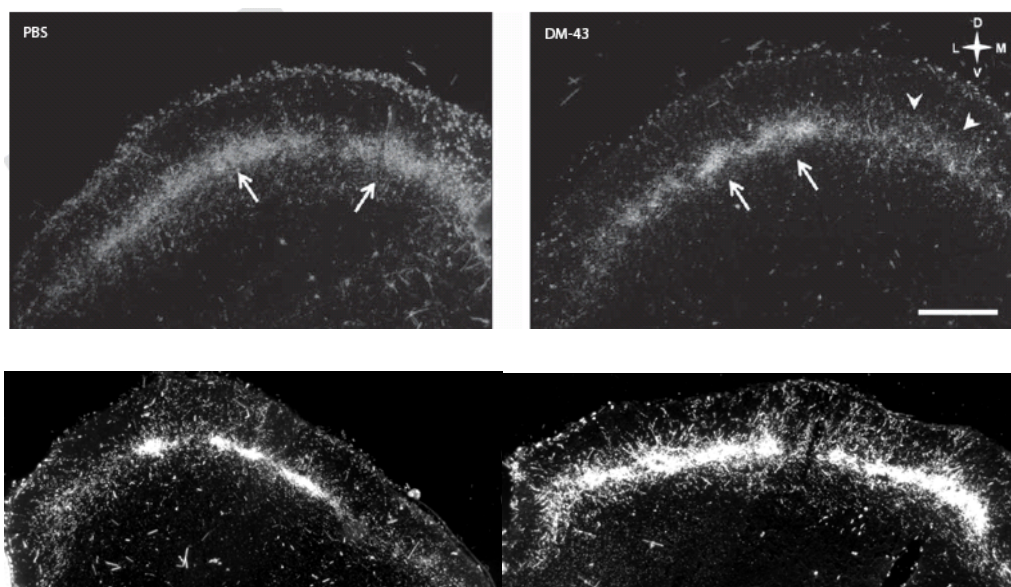


Figura 14: Fotomicrografia de campo escuro ilustrando cortes do colículo superior de animais submetidos ao ELVAX contendo PBS ou DM-43 (acima) e animais submetidos a injeção intraocular com PBS ou IL-2 (abaixo). Notar a maior expansão nas condições experimentais em relação aos respectivos controles

1.6 GAP-43

A proteína associada ao crescimento de 43 kd (GAP-43) foi abordada pela primeira vez em 1976, em um trabalho que mostrava fosfoproteínas da sinapse sendo moduladas por hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (Zwiers e colaboradores, 1976). Ao longo de três décadas de estudos, porém, muitas funções dessa proteína foram elucidadas, tais como crescimento e direcionamento axonal, formação de filopódios, participação em processos de LTP, modulação da liberação de neurotransmissores e endocitose, participeo assim, de processos como o desenvolvimento do sistema nervoso, plasticidade reativa, regeneração axonal e armazenamento de memórias (Oestreicher, 1997).

O gene da GAP-43 é composto por 3 exons. O primeiro éxon codifica os 10 primeiros aminoácidos N-terminais, entre eles a metionina 1 e a leucina 2 que permitem o reconhecimento das cisteínas 3 e 4 pela palmitoiltransferase, o que é importante para inserção da GAP-43 em membranas celulares; e as argininas das posições 6 e 7 e a lisina 9, responsáveis pela sua manutenção na membrana. O primeiro éxon ainda codifica a região responsável pela ligação às proteínas G₀ e G_i na membrana plasmática (Liang e colaboradores, 2002; Nakamura e colaboradores, 1998). O éxon 2 contém a maior parte codificada da proteína, correspondente aos aminoácidos entre a posição 11 e 197. Entre eles está a serina 41, principal alvo pré-sináptico da PKC, e o sítio de ligação à calmodulina, que corresponde dos aminoácidos 39-56 (He e colaboradores, 1997; Chapman e colaboradores, 1991). O éxon 3 codifica a sequência que codifica os 29 aminoácidos C-terminais da proteína, possuindo um domínio F, que deve interagir com componentes do citoesqueleto (Oestreicher e colaboradores, 1997).

A transcrição do gene da GAP-43 está sob controle de um promotor atípico presente nos 235 pares de base imediatamente anteriores ao seu gene. O sítio mais comum de transcrição localiza-se a 52-56 nucleotídeos do códon de iniciação (Denny, 2006). A expressão do gene é regulada por fatores de transcrição do tipo *basic helix-loop-helix*, sendo sua expressão estimulada ou reprimida dependendo do fator ligante (Chiaramello e colaboradores, 1996). Sua expressão é predominante de neurônios, devido à presença do elemento repressivo da GAP-43, sendo expressa também em células gliais em situações de injúria tecidual (Woolf e colaboradores, 1992).

O RNA mensageiro da GAP-43 possui uma meia-vida curta, de cerca de 5-6 horas, mas pode ser estabilizado pela ligação de proteínas específicas, como a HuD e ARPP 19, na sua região 3' não traduzida, estendendo sua meia-vida até 30 horas, o que permite seu acúmulo e tradução (Irwin e colaboradores, . 2002; Pascale e colaboradores, 2005).

A GAP-43 é sintetizada, predominantemente, no corpo celular de neurônios, e contém 226 aminoácidos. A proteína quase não possui estrutura secundária por conta de sua composição singular de aminoácidos: muitos eletricamente carregados e poucos hidrofóbicos. Assim que sintetizada, a GAP-43 é palmitoilada e incorporada às membranas celulares. Em um primeiro momento, a GAP-43 será incorporada à via secretora precoce do complexo de Golgi, incorporada a *rafts* lipídicos e, subseqüentemente, enviada para o cone de crescimento pelo sistema de transporte vesicular (Neve e colaboradores, 1998; Moya e colaboradores, 1988; Arni e colaboradores, 1998; Denny, 2006).

No cone de crescimento, a vesícula contendo GAP-43 será incorporada à membrana plasmática de forma que a GAP-43 fique na interface citoplasmática.

Então, a GAP-43 presente, principalmente, em *rafts* lipídicos interage eletrostaticamente com PIP2, de forma a concentrá-los nos mesmos *rafts* (Tong e colaboradores, 2007). No cone de crescimento, a GAP-43 também interage com a calmodulina, em baixos níveis de cálcio, concentro essa proteína próxima à membrana plasmática (Gamby e colaboradores, 1996). A GAP-43 interage também com importantes elementos do citoesqueleto, como F- e G-actina (He e colaboradores, 1997), neurofilamentos e microtúbulos (Riederer e colaboradores, 1999; Nguyen e colaboradores, 2009). Além dessas, ela interage também com proteínas importantes no controle do citoesqueleto, como a proteína associada ao microtúbulo do tipo 2 (MAP-2) e a espectrina (Chakravarthy e colaboradores, 2008; Riederer e colaboradores, 1999), e com a rabaptina-5, importante no processo de endocitose (Neve e colaboradores, 1998). A GAP-43 interage, ainda, com a proteínas G timérica, dos tipos G0 e Gi intracelularmente, facilitando suas ativações (Nakamura e colaboradores, 1998). Todas essas interações sugerem a participação da proteína em importantes funções neuronais, como crescimento e direcionamento axonal e modulação da liberação de neurotransmissores (Denny, 2006).

De fato, diversos trabalhos mostraram o papel da GAP-43 no crescimento neurítico e axonal. Estudos em culturas de células variadas, como células da hipófise anterior, PC12 e L929, que não apresentam GAP-43, foram levadas a emitir neuritos quando transfectadas com a proteína ou diversas variações dela (Gamby e colaboradores, 1996; Laux e colaboradores, 2000; Korshunova e colaboradores, 2007). Corroborando com esses dados, células de neuroblastoma, que expressam GAP-43 constitutivamente e emitem neuritos, ao receberem anticorpos anti-GAP-43, não apresentaram neuritogênese (Shea e colaboradores,

1991). Experimentos *in-vivo* mostraram a importância da GAP-43 no alongamento e regeneração axonal. Ratos com esmagamento de nervo periférico apresentaram regeneração axonal, com concomitante aumento na expressão de GAP-43, enquanto que ratos que tiveram essa regeneração atrasada por tratamento com fator neurotrófico do nervo (NGF), tiveram uma menor expressão dessa proteína (Hirata e colaboradores, 2002). De forma semelhante, camundongos transfectados com GAP-43 sem o domínio efetor da proteína mostraram atraso na regeneração do nervo periférico após esmagamento (Laux e colaboradores, 2000). Experimentos com implante de canal de células de Schwann após lesão de medula espinhal em ratos adultos mostrou regeneração axonal acompanhada por re-expressão de GAP-43 nos axônios em crescimento (Hsu e colaboradores, 2005). Outro trabalho interessante mostrou que a regeneração do axônio central de neurônios do gânglio da raiz dorsal pode ser induzida por secção simultânea do axônio periférico, sugerindo que a lesão periférica promova a expressão da maquinaria genética necessária à regeneração; e, além disso, animais que super-expressam GAP-43 e CAP-23 apresentam regeneração do axônio central mesmo na ausência da lesão do ramo periférico (Bomze e colaboradores, 2001). A regeneração de axônios das CGRs induzido por oncomodulina após esmagamento de nervo óptico também envolve a re-expressão de GAP-43 (Yin e colaboradores, 2006).

Diversos trabalhos têm mostrado crescimento neurítico em resposta a moléculas do ambiente como SDF-1, ATP, tenascina-c, netrina-1 e NCAM-180- envolvendo ativação de PLC com subsequente hidrólise de PIP₂ e ativação de PKC e CaMK (Xiang e colaboradores, 2002; Lakshmi e Joshi, 2006; Korshunova e Mosevitski, 2008; Michele e Faissner, 2009; Xie e colaboradores, 2006). A GAP-

43 no cone de crescimento localiza-se em *rafts* lipídicos ricos em proteína cinase C e PIP₂ (Botto e colaboradores, 2007; Laux e colaboradores, 2000). Durante o crescimento neurítico, a hidrólise do PIP₂ promove a liberação de seus ligantes cofilina, gelsolina e profilina, que por sua vez, estimulam a síntese de filamentos de actina (Denny, 2006). A GAP-43 também é liberada e fosforilada pela PKC - que foi ativada pelo DAG e IP₃ gerados pela hidrólise do PIP₂, liberando a calmodulina de seu sítio de interação, que pode, então, ativar a CaMK (He e colaboradores, 1997; Gamby e colaboradores, 1996). Foi mostrado que a fosforilação da GAP-43 promove uma re-alocação subcelular da proteína, que passa de *rafts* para o citoesqueleto (Tejero-Díez, 2000). A GAP-43 não fosforilada liga-se a F-actina inibindo a polimerização de filamentos e à G-actina, concentrando os monômeros no cone de crescimento para uma futura extensão neurítica, enquanto que a GAP-43p liga-se lateralmente a filamentos de actina, estabilizando-os, o que vem a favorecer a extensão de filopódios (He e colaboradores, 1997). Queo o cone de crescimento forma um filopódio, o citoesqueleto de microtúbulo subjacente é guiado ao longo deste a fim de formar uma protrusão estável, e esse crescimento neurítico parece envolver a ligação da GAP-43 não-fosforilada à microtúbulos (Dehmelt e Halpain, 2003; Nguyen e colaboradores, 2009).

Seu papel no direcionamento axonal foi elegantemente mostrado por estudos com camundongos nocautes para a proteína GAP-43. Nestes animais, houve uma falha nos axônios serotoninérgicos em inervar o córtex e o hipocampo e uma inervação maior que o normal no tálamo (Donovan e colaboradores, 2002). Além disso, esses animais não formam a comissura anterior, a comissura hipocampal e o corpo caloso. Animais heterozigotos para a expressão da GAP-43

também falham na formação da comissura hipocampal e do corpo caloso (Shen e colaboradores, 2002). Camundongos nocaute para GAP-43 não apresentaram a representação das vibrissas na camada IV do córtex somatossensorial (Maier e colaboradores, 1999; McIlvain e colaboradores, 2003; McIlvain e McCasle, 2006). Dubroff e colaboradores (2005) mostraram que camundongos nocaute para GAP-43 apresentaram ruptura da organização topográfica da camada IV do córtex somatossensorial, visto que estimulação de uma única vibrissa ativava neurônios de regiões diferentes no córtex, e uma mesma região cortical era ativada por diversas vibrissas. Além disso, animais heterozigotos apresentaram atraso na formação dos córtices de barril em comparação aos controles, além de arborizações anormais dos axônios tálamo-corticais (Maier e colaboradores, 1999; McIlvain e colaboradores, 2003; McIlvain e McCasle, 2006).

O sistema retino-colicular também depende da GAP-43 para o correto endereçamento de suas projeções. Os axônios das CGRs, ao sair do olho, tomam três vias diferentes. Cerca de 95% das projeções decussam e inervam o colículo superior contralateral, 5%, provenientes da retina temporal inferior inervam aglomerados na camada ventral do SGS do colículo superior ipsilateral, e umas poucas projeções podem crescer para a região imatura do hipotálamo. Os animais nocautes para GAP-43 apresentavam nervos ópticos menores, com menor número de neurônios mielinizados e menor quantidade de células ganglionares da retina. Além disso, apresentavam uma inervação desproporcionalmente aumentada das regiões hipotalâmicas. Os nervos ópticos dos camundongos nocautes para GAP-43 apresentam falha no seu direcionamento, com 56% deles formando projeções bilaterais para ambos os tratos ópticos, 6% formando uma projeção predominantemente ipsilateral e em

38% os nervos ópticos não conseguiram prosseguir do quiasma óptico. A injeção de peroxidase de raiz forte na câmara posterior do olho revelou inervação inespecífica em ambos os colículos superiores, sem a preferência contralateral dos animais normais; enquanto que a injeção no colículo superior revelou inespecificidade da inervação proveniente da retina, que vinham igualmente de qualquer região de ambas as retinas, ao contrário dos controles (Zhu e colaboradores, 1999).

Trabalhos com animais selvagens também mostraram a importância da GAP-43 no desenvolvimento da via retino-colicular de roedores. Moya e colaboradores (1988) mostraram que neurônios retino-tectais apresentam um alto nível de transporte axonal da GAP-43 durante as duas primeiras semanas pós-natal. De forma semelhante, um estudo imunohistoquímico mostrou marcação extensamente distribuída por toda a extensão desses axônios na primeira semana pós-natal, e localizada na neurópila do colículo superior na segunda semana, desaparecendo em sequência (Moya e colaboradores, 1989).

O mecanismo molecular pelo qual a GAP-43 modula o direcionamento axonal parece estar associado à sua interação e modulação das proteínas G triméricas G_0 e G_i . Trabalhos recentes mostraram que os comportamentos de direcionamento de cones de crescimento em resposta a pistas do microambiente são inibidos pelo tratamento com toxina pertussis, um inibidor das proteínas G_0 e G_i (Xiang e colaboradores, 2002). A GAP-43 interage com a proteína G e modula sua atividade (Vitale e colaboradores, 1994). Trabalhos mostraram que a GAP-43 potencia a via estimulada pela proteína G (Strittmatter e colaboradores, 1993, 1994), potenciando também, alterações morfológicas, como, colapso do cone de

crescimento, crescimento neurítico e emissão de filopódios (Strittmatter e colaboradores, 1994a; 1994b).

A importância da GAP-43 na modulação da liberação de neurotransmissores foi mostrada por diversos trabalhos na segunda metade da década de 90. Células AtT-20 transfectadas com o gene da GAP-43 apresentaram maior liberação de beta-endorfina quando despolarizadas (Gamby *et al*, 1996b), sendo essa liberação regulada por interações protéicas e alterações pós-traducionais, como fosforilação e palmitoilação (Gamby e colaboradores, 1996; Neve e colaboradores, 1998; Iannazzo, 2001). Corroborando com esses dados, anticorpos anti-GAP-43 diminuíram a secreção de neurotransmissores de sinaptossomos de córtex cerebral de ratos derivados de vesículas densas ou não (Hens e colaboradores, 1998).

No terminal axonal, a GAP-43 encontra-se ligada à calmodulina, principalmente em membranas, como a membrana plasmática, endossomas e vesículas sinápticas (Gamby e colaboradores, 1996; Neve e colaboradores, 1998). Quando uma despolarização atinge esse terminal ocorre um influxo de cálcio que favorece a ativação da PKC, que por sua vez, promove fosforilação da GAP-43. A fosforilação e o aumento da concentração de cálcio promovem a dissociação entre a GAP-43 e a calmodulina que, subsequentemente, ativa a CaMK. CaMK ativada pode fosforilar sinapsina-1, promovendo a liberação de vesículas sinápticas do citoesqueleto de actina para as zonas ativas, sítio de liberação de neurotransmissores (Gamby e colaboradores, 1996; Iannazzo e colaboradores, 2000). Foi mostrado também, que a GAP-43 quando desligada da calmodulina promove um aumento da endocitose de vesículas sinápticas e

diminui o tamanho dos endossomos, o que poderia também modular esta liberação de neurotransmissores (Neve e colaboradores, 1998).

A remoção da GAP-43 e de seus efeitos é realizada através de clivagem pelo sistema de ubiquitina/proteossomo. A fosforilação da proteína e suas interações com a membrana plasmática e a calmodulina inibem o processamento pelo proteossomo (Denny e colaboradores, 2006).

Os efeitos biológicos da GAP-43 sugerem importante participação no desenvolvimento do sistema nervoso. De fato, a expressão da GAP-43 é altamente regulada durante o desenvolvimento. A marcação para GAP-43 é intensa por todo o cérebro em axônios e neurópila durante um período que se estende desde a embriogênese até a primeira semana pós-natal, queo a mielinização e a estabilização sináptica promovem uma drástica diminuição na sua expressão (Oestreicher e colaboradores, 1997). No cérebro adulto, a GAP-43 permanece expressa em altos níveis em regiões de grande plasticidade sináptica como o córtex cerebral e regiões subcorticais envolvidas com a integração e controle de comportamentos e emoções, como o núcleo caudado-putâmen, tubérculo olfatório, núcleo acumbens, septo ventro-lateral, hipotálamo medial, área pré-óptica, estria terminal, amígdala e hipocampo, também conhecido por seu papel no estabelecimento de memórias (Benowitz e colaboradores, 1988; Neve e colaboradores, 1988). Este padrão temporal de expressão é condizente com seu papel no crescimento e direcionamento axonal, assim como sua re-expressão em casos de regeneração axonal e plasticidade reativa exemplificados anteriormente.

O fenômeno de armazenamento de memórias no hipocampo envolve o processo conhecido como LTP, do qual a GAP-43 participa. Foi mostrado que a

indução de LTP por estimulação tetânica da via perforante modula a transcrição do RNAm da GAP-43, promovendo sua síntese nas fibras musgosas e diminuindo em CA3 (Namgung e colaboradores, 1997). Foi mostrado também que o aprendizado espacial aumenta rapidamente a expressão da proteína HuD, que estabiliza o RNAm da GAP-43. Com isso, aumenta subsequentemente a expressão da proteína GAP-43 (Pascale e colaboradores, 2004). Um trabalho recente trouxe uma nova visão para a super-expressão da GAP-43 no aprendizado, mostrando que camundongos transgênicos com uma superexpressão moderada da GAP-43 apresentam melhora no armazenamento de memória espacial, enquanto que animais com uma super-expressão exacerbada apresentam déficits (Holahan e colaboradores, 2007). A fosforilação da GAP-43 pela PKC parece modular os processos de LTP, e conseqüentemente, o armazenamento de memórias. Camundongos transgênicos que super-expressam GAP-43 na sua forma pseudo-fosforilada apresentam aumento na LTP e maior facilitação de pulso pareado (Hulo e colaboradores, 2002). Recentemente, Holahan e colaboradores (2008) mostraram que camundongos transgênicos que super-expressam a GAP-43 selvagem, pseudo-fosforilada ou não-fosforilável modulam o armazenamento de formas diferentes de memórias. A super-expressão de GAP-43 selvagem promove uma capacidade de aprendizado superior e flexível; a super-expressão da forma pseudo-fosforilada apresenta um aprendizado inflexível, com dificuldade de alterar o comportamento frente a situações diferentes; e a GAP-43 não-fosforilável apresenta dificuldade de retenção de memórias. Tem sido demonstrado recentemente que a ativação do receptor dopaminérgico D1 promove o acoplamento entre o fenômeno de LTP e a expressão de GAP-43 no modelo de estimulação do colateral de Schaffer. Chirwa

e colaboradores (2005) mostraram que tanto a LTP induzida por estímulos tetânicos quanto a expressão aumentada de GAP-43 em CA1, CA3 e giro denteado dependem da estimulação desse receptor. Posteriormente, Williams e colaboradores (2006), mostraram que tratamento sistêmico com um agonista desse receptor concomitante com estimulação de baixa frequência é capaz de induzir aumento na expressão da GAP-43 e LTP no hipocampo.

Em conjunto, estes resultados demonstram a importância da proteína GAP-43 não apenas para orientação de crescimento axonal necessária durante o desenvolvimento e em fenômenos plásticos e de regeneração, mas também para estabilização de conexões neurais através de seu controle sobre a liberação de neurotransmissores. Dessa forma, fica clara a necessidade de mais estudos para esclarecer possíveis moduladores da expressão da GAP-43 bem como de seu papel funcional em outras áreas do sistema nervoso central.

2 OBJETIVOS

Este trabalho investiga a expressão e modulação da isoforma fosforilada da proteína GAP-43 (GAP-43p) no colículo superior.

Utilizamos o método de *western blot* para acessar a expressão de GAP-43p nas camadas superficiais do colículo superior de ratos *Lister Hooded* durante seu desenvolvimento normal ou sob procedimentos experimentais que induzem reorganização anatômica das projeções retinotectais.

Portanto, analisamos:

- ✓ A ontogênese da GAP-43p nas camadas visuais do colículo superior;
- ✓ A expressão da GAP-43p no colículo superior após enucleação monocular dentro (DPN10) e ao final do período crítico do desenvolvimento retinotectal (DPN21);
- ✓ O efeito do tratamento sistêmico com Dipiridamol, um inibidor do transportador equilibrativo de adenosina, dentro (DPN 9-13) e ao final do período crítico (DPN 20-27);
- ✓ O efeito do tratamento sistêmico com L-nitro-Arginina, um inibidor da síntese do óxido nítrico, dentro do período crítico (DPN 9-12);
- ✓ O efeito do tratamento sistêmico com Quinacrina, um inibidor da síntese do ácido araquidônico, ao final do período crítico (DPN 20-27);

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS:

Os animais utilizados ao longo desse estudo foram ratos pigmentados da linhagem *Lister Hooded* entre o dia do nascimento (DPN 0) e a décima semana pós-natal (DPN 70). Para investigar os objetivos propostos na seção anterior, realizamos diferentes manipulações experimentais indutoras de plasticidade retinotectal. A expressão da isoforma fosforilada da proteína GAP-43 foi acessada no colículo superior através da técnica bioquímica de *Western Blot*. Os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas de utilização de animais de laboratório do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e com normas internacionais de experimentação animal e foram aprovados pelo comitê de experimentação animal da UFF. Os animais foram mantidos no biotério experimental do Departamento de Neurobiologia, com controle de ciclo claro/escuro sob ambiente ventilado e climatizado. Para procedimentos experimentais os animais foram anestesiados por inalação de uma mistura éter e água destilada (1:1) em uma câmara anestésica onde o animal não entra em contato direto com a mistura. Os procedimentos anestésicos foram monitorados de forma a evitar o sofrimento respiratório dos animais. O nível anestésico foi monitorado pela ausência de reflexos corneanos.

3.2 TRATAMENTO SISTÊMICO:

Diferentes drogas indutoras de plasticidade retinotectal foram administradas aos animais através de injeções intraperitoneais diárias. Os tratamentos dentro do período crítico tiveram duração de quatro dias, enquanto os tratamentos após este período duraram oito dias.

Dentro do período crítico, entre DPN 9 e DPN 12, os animais foram tratados com L-nitro-arginina (um inibidor da síntese do mensageiro retrógrado Óxido Nítrico) ou Dipiridamol (um inibidor do transportador equilibrativo de Adenosina). Fora do período crítico, os animais foram tratados com Quinacrina (um inibidor da síntese do mensageiro retrógrado Ácido Araquidônico) ou Dipiridamol entre DPN 20 e DPN 27. Em todos os grupos os animais controle receberam injeções contendo o veículo da droga correspondente. No caso dos animais tratados com inibidores dos mensageiros retrógrados, o veículo foi a salina; e nos tratados com dipiridamol, o veículo foi óleo de oliva.

3.3 ENUCLEAÇÃO MONOCULAR:

Um grupo de animais foi submetido à enucleação monocular do olho esquerdo no DPN 10 ou no DPN 21, conforme previamente descrito (LUND e colaboradores., 1980). Resumidamente, os animais foram anestesiados com vapor de uma solução éter/água na proporção 1:1. Os animais que receberam a enucleação tiveram a musculatura intrínseca do olho seccionada com auxílio de uma tesoura e o globo ocular, retirado. Na cavidade ocular, um pedaço de *gel foam* foi inserido, e as pálpebras seladas com gel de cianoacrilato. Após a recuperação dos efeitos da anestesia, os animais foram devolvidos ao biotério. O

grupo de animais enucleado em DPN 10 recebeu uma sobrevida de 12, 24, 48 ou 72 horas, enquanto o grupo enucleado em DPN 21 recebeu 1, 2 e 3 semanas de sobrevida pós-enucleação.

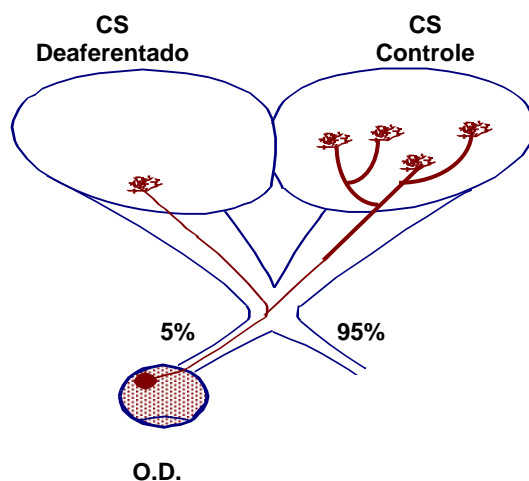


Figura 15: Esquema ilustrando o modelo de enucleação monocular.

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA WESTERN BLOT:

Os animais foram anestesiados por inalação continuada de uma solução éter/água na proporção 1:1, foram sacrificados por decapitação e tiveram as camadas superficiais do colículo superior dissecadas com uma lâmina de bisturi nº 15. O tecido foi, então, macerado em tampão Tris-HCL 50mM pH 7,4 em ambiente refrigerado (0°C) e submetido à centrifugação por 2 minutos a 15000 rotações por minuto a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (correspondente às frações de membrana), ressuscitado em 25 microlitros de tampão de amostra (Tris-HCL + Glicerol + SDS + β -mercaptoetanol + água) para cada colículo superior. No caso dos animais submetidos à enucleação monocular, os colículos superiores de um mesmo animal foram separados em dois grupos, baseado na distribuição desigual das projeções retinianas em cada colículo

superior: o colículo ipsilateral à enucleação (controle interno) e o contralateral (lado deaferentado).

3.5 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A fim de acessar a quantidade total de proteína presente em cada amostra, realizamos dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford que utiliza a albumina de soro bovina como proteína padrão (Bradford, 1976). Após a dosagem, as amostras receberam 10% do seu volume de azul de bromofenol e em seguida foram armazenadas refrigeradas à -70°C.

3.6 WESTERN BLOT

O protocolo de western blot foi realizado com o objetivo de acessar a expressão da proteína GAP-43p em extratos das camadas visuais do colículo superior. Para isso, aplicamos um volume de amostra correspondente à 45 microgramas de proteína em cada raia do gel SDS/PAGE 10%. Posteriormente, as amostras foram separadas por peso molecular através de eletroforese com corrida contínua e amperagem de 30 mA. As proteínas que foram separadas por peso molecular na etapa anterior, foram então, transferidas para uma membrana de PVDF através de eletroforese com voltagem fixa entre 45mV e 60mV durante uma hora. A eficácia da transferência era observada através da revelação das proteínas na membrana feita com o vermelho de *Ponceau*. Em seguida, realizava-se incubação da membrana com TBS-T + 5% leite por 2 horas a fim de bloquear os sítios inespecíficos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo anti-GAP-43p policlonal de cabra (1:800, Santa Cruz). No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBS-T por 3 vezes de 10 minutos e

foi incubada por 1 hora e 30 minutos com o anticorpo policlonal anti-cabra conjugado à HRP (1:3000 Amersham Bioscience). Após a incubação, a membrana foi lavada por 3 vezes de 10 minutos com TBS-T e incubada com o reagente fluorescente ECL para posterior revelação em filme radiográfico.

A fim de provar que todas as raias foram carregadas igualmente com 45 microgramas de proteína, foi realizado protocolo de *stripping* da membrana com uma solução de Glicina 0,2M pH 2,2 durante 30 minutos, para remover os anticorpos ligados a membrana. Após isso, a membrana foi submetida à etapa de bloqueio, incubação com anticorpo anti-ERK policlonal de camundongo (1:6000 Santa Cruz) *overnight*, lavagens em TBS-T, incubação com anticorpo anti-camundongo conjugado à HRP (1:5000 Amersham Bioscience)) e revelação com kit ECL e exposição a filme radiográfico, da mesma forma previamente descrita.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Após a revelação, os filmes foram digitalizados utilizando o programa Adobe Photoshop CS3 e foi realizada a análise de densidade óptica das bandas no software Scion Image. Os resultados da análise da densidade óptica foram plotados no programa Prism 4.0, onde fazíamos os gráficos e a análise estatística através de teste-t ou o ANOVA-one way com pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS:

Conforme vem sendo descrito nas últimas três décadas, a GAP-43 é uma proteína localizada no terminal axonal, em particular, no cone de crescimento (Moya e colaboradores, 1988) e está associada ao crescimento, direcionamento axonal e liberação de neurotransmissores (Perrone-Bizzozero e colaboradores, 1986; Shea e colaboradores, 1991). Sua expressão é regulada durante o desenvolvimento (Moya e colaboradores, 1988), diminuindo em áreas onde a plasticidade neural intrínseca é pequena, e permanecendo em altos níveis em locais onde há constantes processos plásticos, como o hipocampo e o córtex (Benowitz e colaboradores, 1988; Neve e colaboradores, 1988). A forma fosforilada da GAP-43 vem sendo particularmente envolvida com o crescimento neurítico (Gamby e colaboradores, 1996), direcionamento axonal (Meiri e colaboradores, 1998) e liberação de neurotransmissores (Hulo e colaboradores, 2002). Portanto, neste trabalho procuramos analisar a expressão da GAP-43p durante o desenvolvimento normal e sua possível modulação após procedimentos experimentais que sabidamente induzem reorganização anatômica das projeções retinotectais de ratos.

5.1 ONTOGÊNESE DA GAP-43p NAS CAMADAS SUPERFICIAIS DO COLÍCULO SUPERIOR

O desenvolvimento das projeções retinotectais de ratos inicia-se na vida embrionária e é concluído após o nascimento do animal. A formação dos

primeiros contatos sinápticos no *Stratum Griseum Superficiale* ocorre no dia embrionário 17(E17) (Horsburgh e Sefton, 1986; Lund e Lund, 1976). Dados da literatura demonstram que o pico de sinaptogênese ocorre imediatamente antes da abertura dos olhos, o que, em ratos, ocorre por volta de DPN 12 – DPN 13. Entretanto, até o dia pós-natal 30 (DPN30) ainda é possível observar sinapses em formação na via retinotectal (Warton e McCart, 1983). Assim, estudamos a expressão da isoforma fosforilada da GAP-43 (GAP-43p) durante a formação e maturação destas projeções, de forma a investigar sua participação em processos relacionados a eventos-chave para o desenvolvimento do sistema visual destes animais.

A primeira idade estudada foi o primeiro dia pós-natal (DPN 0). Ao nascimento, as projeções retino-coliculares cobrem todo o eixo ântero-posterior, médio-lateral e as lâminas das camadas visuais do colículo superior ipsolateral, com muitas projeções inespecíficas (Serfaty e Linden, 1994; Serfaty e colaboradores, 2005). Em seguida utilizamos animais DPN 7, que já apresentam outros *inputs* no colículo tais como as aferências cortico-tectais e também pode-se observar atividade elétrica espontânea pós-sináptica (Torborg e Feller, 2005). Nesta primeira semana, ocorre a eliminação dos ramos posteriores à zona terminal numa sequência rostro-lateral para caudo-medial, confinando as projeções ao terço rostral do CS (Serfaty e Linden, 1994) e poucas sinapses são encontradas (Lund e Lund, 1971). No DPN 10 encontramos um padrão de organização semelhante ao do animal adulto, com aglomerados na borda ventral do SGS, porém ainda é um período de intensa plasticidade (Serfaty e colaboradores., 2005). Já no DPN 14, os animais estão passando por uma importante etapa, pois este é o período em que ocorre a abertura dos olhos, e

assim, se inicia a atividade evocada, que leva a maior ativação da via visual (Itaya e colaboradores., 1995; Molotchnikoff e Itaya, 1993). Os animais com DPN 28 são ainda jovens, mas já apresentam um padrão de conexões similar ao que é encontrado em animais adultos, ou seja, com uma circuitaria com mais estabilidade sináptica. Fenômenos plásticos ainda são observados, porém de modo mais lento (Campello-Costa e colaboradores.,2006.; Serfaty e colaboradores., 2005). Por volta do DPN 42 ocorre a maturação sexual e com isso há uma considerável alteração sistêmica, podendo se estender a alterações ao nível de sistema nervoso (Boulware e colaboradores, 2005). O roedor com DPN 70 é considerado um animal adulto.

A estabilização sináptica aumenta de forma gradativa em um padrão temporal. Com isso, buscamos examinar como a expressão da GAP-43p se apresenta nas camadas visuais do CS ao longo do desenvolvimento. A figura 16 demonstra que a GAP-43p é expressa em altos níveis nas camadas visuais do CS em etapas iniciais do desenvolvimento, antes da abertura dos olhos. Após esse período ela diminui, mas ainda está presente no animal adulto (Figura 16A). A análise quantitativa demonstra que a maior expressão é detectada entre os dias 0 – 10 pós-natal (DPN 0 - DPN 10) e diminui bruscamente com a abertura dos olhos, no animal DPN 14. Após esse período, os animais que já deixaram o período crítico (DPN 28, DPN 42 e DPN 70) mantêm a GAP-43p, porém com níveis mais baixos (Figura 16B). O controle de carregamento de proteínas nas raias do gel de eletroforese foi realizado com a marcação da mesma membrana PVDF contra a proteína ERK, expressa constitutivamente no tecido (Figura 16A). A figura 16^a mostra que não houve alteração nos níveis de ERK total.

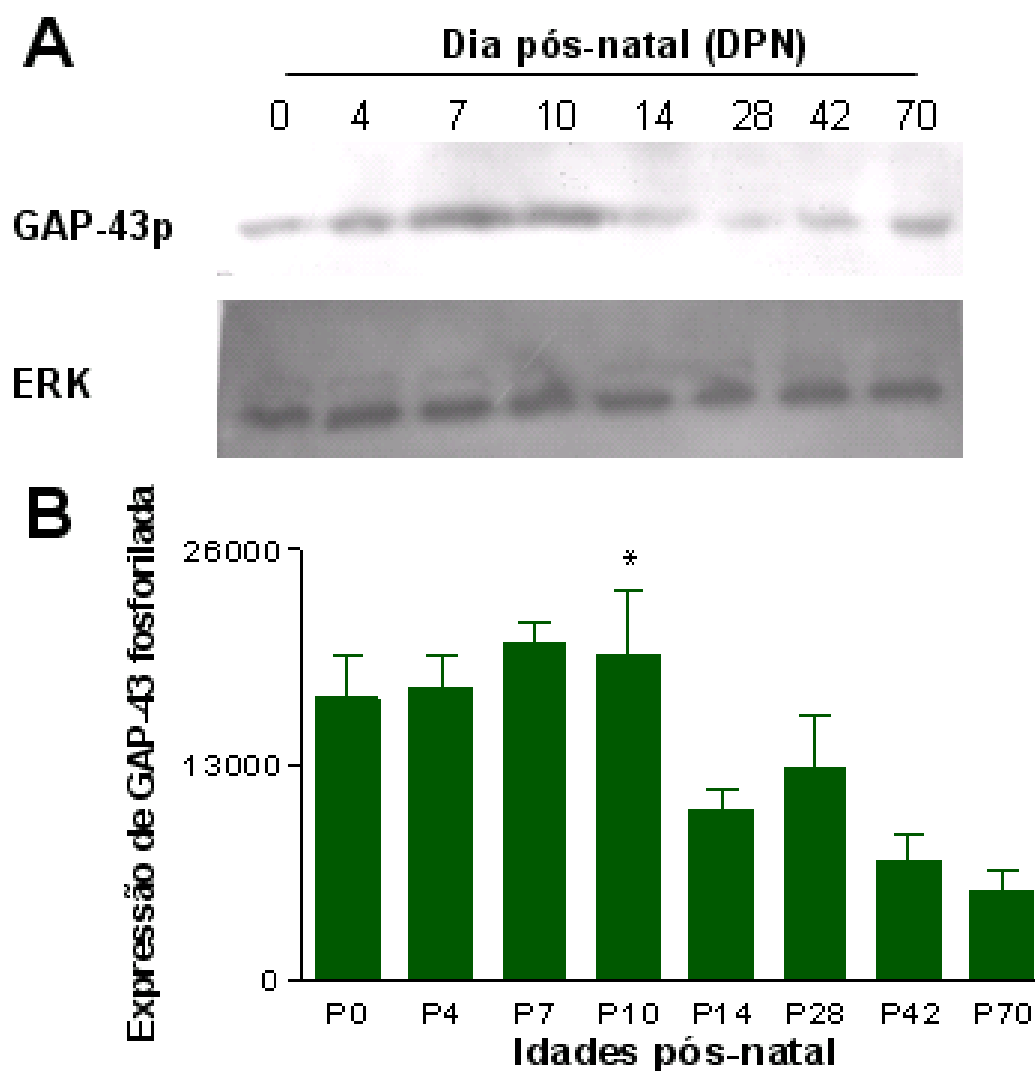


Figura 16: Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do cóliculo superior durante o desenvolvimento. (A) Western Blot ilustrando as bandas relativas à GAP-43p (acima) e à ERK (abaixo) nas diferentes idades estudadas. **(B)** Densidade óptica média de experimentos independentes realizados com 8 diferentes amostras. Os asteriscos representam diferença estatística para * $p < 0,05$ entre os períodos anteriores e posteriores a abertura dos olhos.

5.2 EFEITO DA ENUCLEAÇÃO MONOCULAR DENTRO DO PERÍODO CRÍTICO NA EXPRESSÃO DE GAP-43p NAS CAMADAS VISUAIS DO COLÍCULO SUPERIOR

Conforme dito anteriormente, animais com 10 dias de desenvolvimento pós-natal apresentam a projeção retinotectal no padrão do animal adulto, apresentando aglomerados de marcação ipsilateral localizados no limite ventral do *stratum griseum superficiale*. No entanto, estas projeções podem sofrer uma reorganização anatômica rápida, em 48hs, após lesões seletivas de retina (Serfaty e colaboradores, 2005).

Em oposição à lesão temporal de retina, a enucleação monocular promove uma desnervação quase que completa do CS contralateral, correspondendo a 95% dos *inputs*. Dessa forma, utilizamos o colículo contralateral como o colículo deaferentado e o colículo superior ipsilateral ao olho enucleado, que perdeu apenas 5% das projeções, como um controle interno.

A expressão da GAP-43p nas camadas visuais do CS foi avaliada após diversos intervalos de sobrevivência em animais submetidos à enucleação monocular no DPN 10. A figura 17 demonstra que enucleação monocular promove um aumento transitório na expressão da GAP-43p. Esse aumento foi detectado a partir de 24 horas após a enucleação monocular no colículo deaferentado em relação ao controle. Após 48 horas de sobrevivência, os níveis de GAP-43p voltam aos valores basais, permanecendo reduzidos após 72 horas de sobrevivência (Figuras 17A, B). O controle de carregamento de proteínas nas raias de eletroforese foi realizado com a marcação da mesma membrana PVDF contra a proteína ERK, expressa constitutivamente no tecido (Figura 17A).

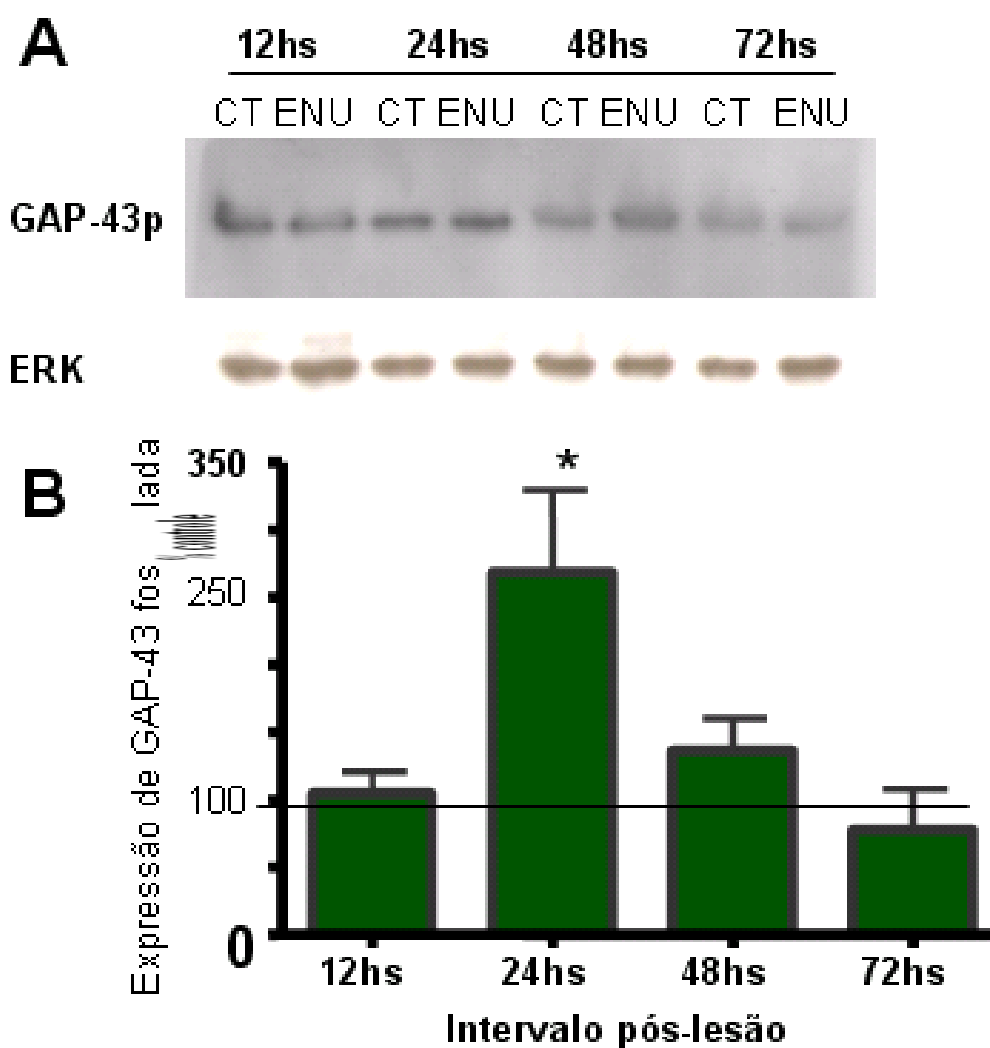


Figura 17: Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior após enucleação monocular dentro do período crítico. (A) Western Blot ilustrando as bandas relativas à GAP-43p (acima) e à ERK (abaixo) nos diferentes intervalos de sobrevivência estudados. **(B)** Densidade óptica média de experimentos independentes realizados com 5 diferentes amostras. Os asteriscos representam diferença estatística para * $p < 0,05$.

5.3 EFEITO DA ENUCLEAÇÃO MONOCULAR FORA DO PERÍODO CRÍTICO NA EXPRESSÃO DE GAP-43P NAS CAMADAS VISUAIS DO COLÍCULO SUPERIOR

O período crítico corresponde a uma série de modificações morfológicas e moleculares que levam a maior estabilização das conexões no sistema nervoso. A reversão destas alterações leva novamente a um ambiente favorável à plasticidade. Já foi demonstrado que o sistema retinotectal de roedores é capaz de se reorganizar após o final do período crítico. Porém, quando a plasticidade é induzida em fases mais tardias observa-se que a resposta plástica é mais lenta (Serfaty e colaboradores., 2005).

Desta forma, fomos estudar a expressão da GAP-43p nas camadas visuais do CS após diversos intervalos de sobrevivência em animais submetidos à enucleação monocular tardia, ao final do período crítico (DPN 21). Neste caso, os intervalos de sobrevivência estudados foram 1, 2 e 3 semanas após a enucleação monocular.

Nossos resultados demonstram que, nesta fase, a enucleação monocular também leva a um aumento transitório na expressão da GAP-43p. A figura 18 ilustra um aumento significativo na expressão da GAP-43p 1 semana após a enucleação no colículo deaferentado em relação ao colículo controle. Após a segunda semana, a expressão da GAP-43p volta ao nível de expressão do colículo ipsilateral, permanecendo inalterado com 3 semanas de sobrevivência (Figuras 18A, B). O controle de carregamento de proteínas nas raias de eletroforese foi realizado com a marcação da mesma membrana PVDF contra a proteína ERK, expressa constitutivamente no tecido (Figura 18A).

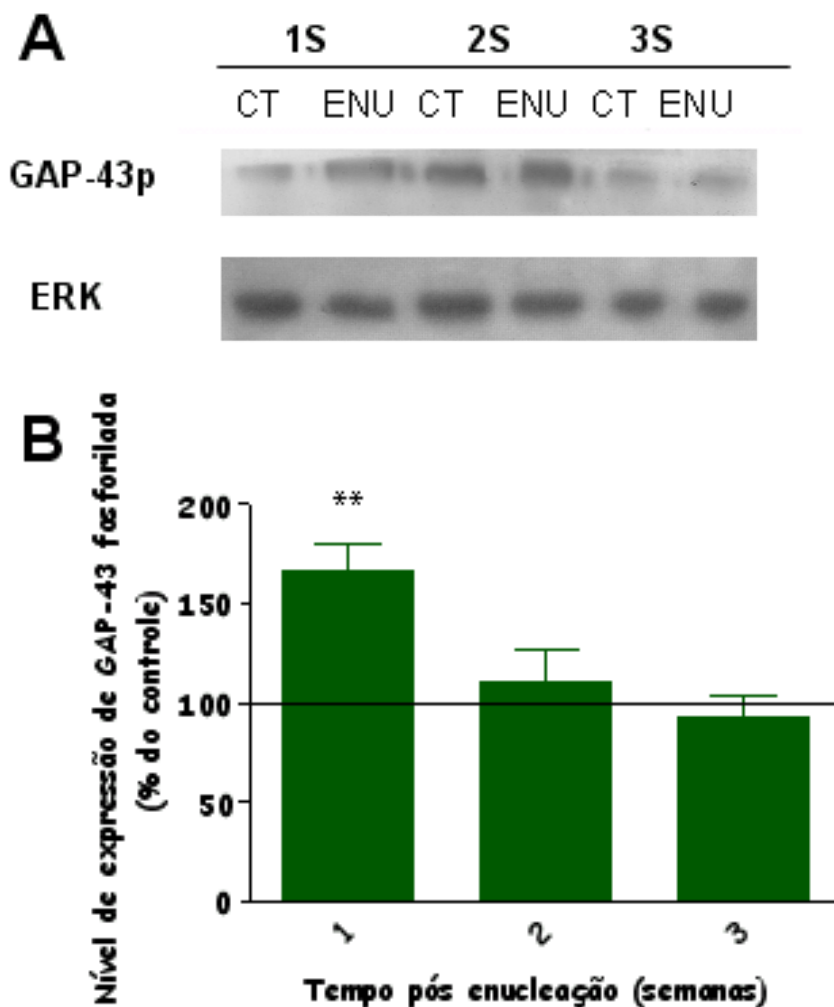


Figura 18: Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior após enucleação monocular fora do período crítico. **(A)** Western Blot ilustrando as bandas relativas à GAP-43p (acima) e à ERK (abaixo) nos diferentes intervalos de sobrevivência estudados. **(B)** Densidade óptica média de experimentos independentes realizados com 5 diferentes amostras. Os asteriscos representam diferença estatística para ** $p < 0,01$.

5.4 BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO RETRÓGRADA ALTERA A EXPRESSÃO DE GAP-43p NAS CAMADAS SUPERFICIAIS DO COLÍCULO SUPERIOR

O processo de refinamento das projeções retino-coliculares ocorre nas duas primeiras semanas pós-natal, antes da abertura dos olhos do animal. Campello-Costa e colaboradores (2000) mostraram que a inibição da síntese de óxido nítrico após tratamento intraperitoneal com Narg (50mg/kg) durante 4 dias, dentro do período crítico, induz uma expansão das projeções retinotectais ipsolaterais. Por outro lado, o bloqueio da sinalização retrógrada mediada por ácido araquidônico alterou a topografia retinotectal fora do período crítico (Campello-Costa e colaboradores., 2006).

Desta forma, fomos avaliar a expressão da GAP-43p nas camadas visuais do colículo superior em animais submetidos ao tratamento intraperitoneal com Narg (50mg/kg) entre DPN 9 – DPN12 ou quinacrina (mepacrina) (40mg/kg) entre DPN20-27. A figura 19 ilustra a expressão da GAP-43p após o bloqueio da síntese de NO e AA dentro e fora do período crítico, respectivamente. Nossos resultados mostraram que o bloqueio da síntese de NO induz uma diminuição significativa da expressão da GAP-43p, enquanto a inibição da via do AA desencadeia um aumento na expressão dessa proteína, quando comparados a seus respectivos controles (Figura 19). Estes resultados sugerem que a reorganização neural induzida após bloqueio da sinalização retrógrada no colículo superior envolve alterações na expressão da GAP-43p.

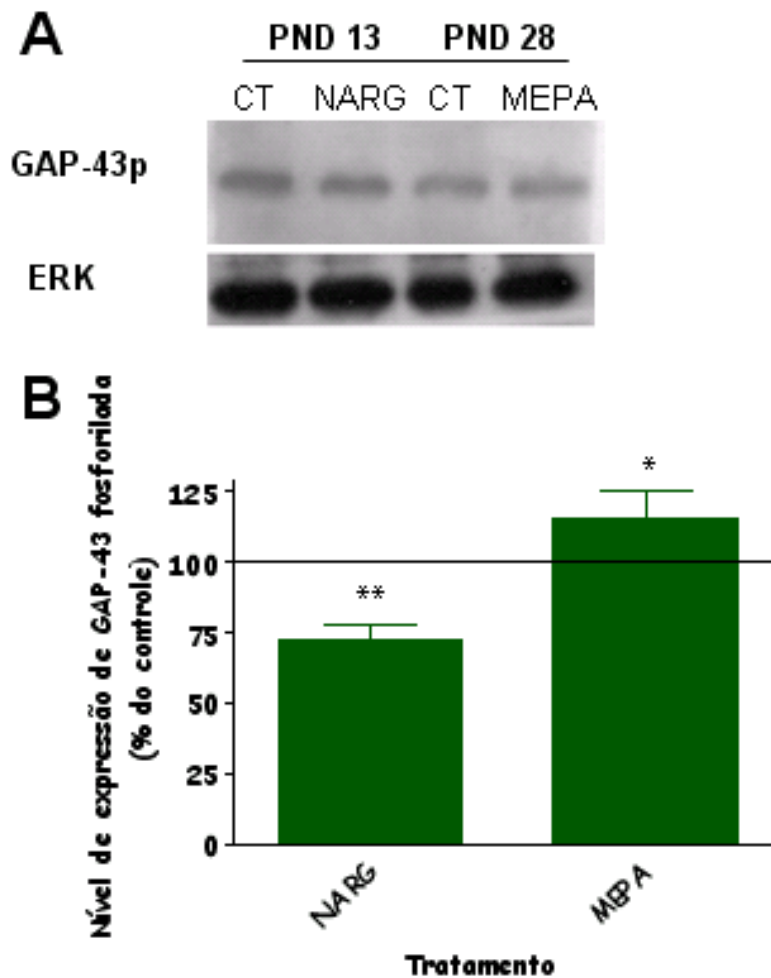


Figura 19: Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior após tratamento com inibidores da síntese de mensageiros retrógrados. **(A)** Western blot ilustrando as bandas relativas à GAP-43p (acima) e à ERK (abaixo) nos diferentes grupos de tratamento. **(B)** Densidade óptica média de experimentos independentes realizados com 5 diferentes amostras. Os asteriscos representam diferença estatística para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM DIPIRIDAMOL NA EXPRESSÃO DE GAP-43p NAS CAMADAS VISUAIS DO COLÍCULO SUPERIOR

A adenosina é um neuromodulador importante para o desenvolvimento retinotectal e sua concentração extracelular é controlada por transportadores de membrana que promovem sua liberação ou recaptção (Latini e Pedata, 2001). Dados do laboratório demonstram que o tratamento intraperitoneal com dipiridamol (50mg/kg), um inibidor da recaptção de adenosina altera, dentro mas não fora do período crítico, a topografia retinotectal (Gomes e colaboradores, em preparação). Este trabalho sugere que a maior ativação de receptores A1 seja responsável pelo aumento na arborização axonal. Assim, fomos avaliar a expressão da GAP-43p nas camadas visuais do colículo superior de animais tratados intraperitonealmente com dipiridamol (50mg/kg). O tratamento dentro do período crítico correspondeu a 4 dias sucessivos de DPN 9 – DPN 13; O tratamento fora do período crítico correspondeu a 8 dias de tratamento, de DPN 20 – DPN 27. A figura 20 ilustra um gel representativo de cada grupo e a quantificação dos níveis de expressão da GAP-43p em animais tratados com veículo ou dipiridamol. O tratamento com dipiridamol induziu um aumento da expressão da GAP-43p dentro do período crítico, onde este tratamento promove expansão dos terminais axonais retinianos no colículo superior. Este resultado sugere um papel para GAP-43p na reorganização neural neste alvo visual sub-cortical.

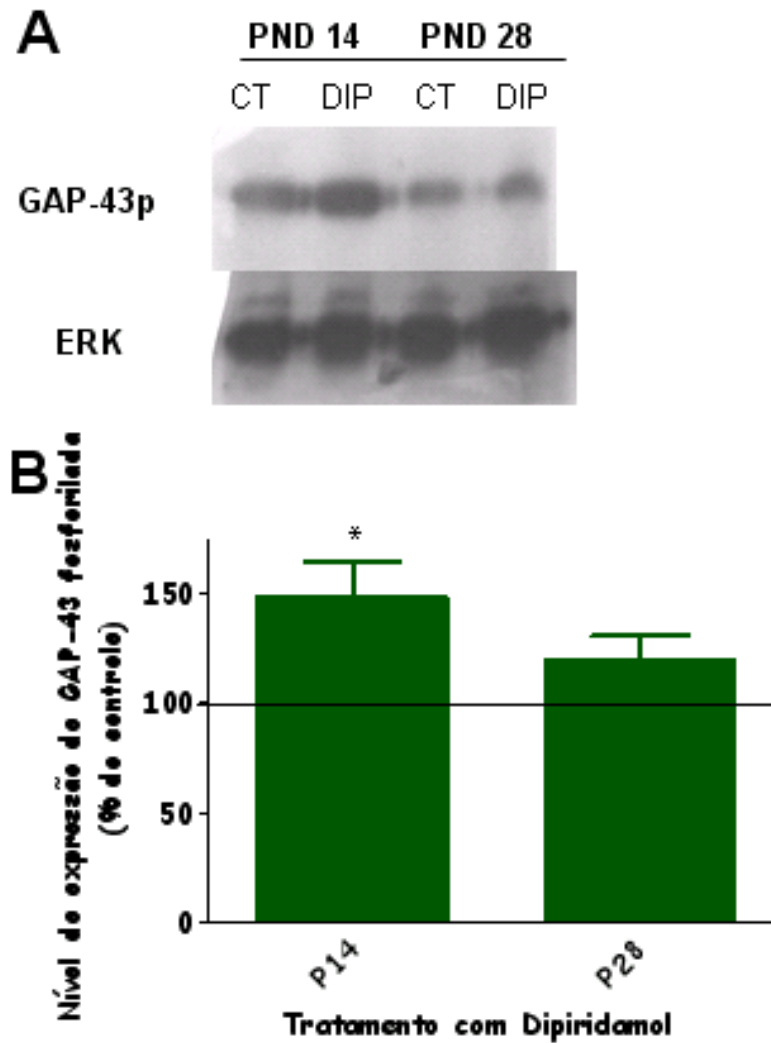


Figura 20: Expressão da GAP-43 fosforilada nas camadas visuais do colículo superior após tratamento com dipiridamol. **(A)** Western Blot ilustrando as bandas relativas à GAP-43p (acima) e à ERK (abaixo) nos diferentes estágios do tratamento. **(B)** Densidade óptica média de experimentos independentes realizados 3 com diferentes amostras. Os asteriscos representam diferença estatística para * $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos a modulação da expressão da isoforma fosforilada da proteína GAP-43 (GAP-43p) no CS durante o desenvolvimento das conexões retinotectais ou frente a manipulações experimentais indutoras de reorganização anatômica das mesmas. A fim de atingir esses objetivos realizamos a técnica bioquímica *western blot* para acessar quantitativamente a expressão da GAP-43p nas camadas retinoceptivas do CS. Como formas indutoras de plasticidade neural, utilizamos enucleação monocular dentro e fora do período crítico; bloqueio da síntese de mensageiros retrógrados, utilizando L-nitro-arginina para inibir a produção de NO dentro do período crítico, e quinacrina para inibir a síntese do AA fora do período crítico; e bloqueio do transportador de adenosina utilizando o dipiridamol.

Os resultados aqui apresentados revelam que a GAP-43p está presente no CS de ratos em fases precoces do desenvolvimento, sofrendo um decréscimo na sua expressão entre DPN 10 e DPN 14, intervalo onde ocorre a abertura dos olhos do animal, permanecendo expressa em níveis baixos até a vida adulta (DPN 70) (Figura 16). A plasticidade induzida por enucleação monocular promoveu um aumento transitório da expressão de GAP-43p, tanto dentro quanto fora do período crítico, porém com cursos temporais diferentes (Figuras 17 e 18). Enquanto a enucleação monocular dentro do período crítico promoveu esse aumento 24 horas após a desnervação, com volta aos níveis basais após 48 horas, essa experimentação fora do período crítico promoveu um aumento após uma semana de sobrevivência e o seu retorno aos níveis basais a partir da semana

seguinte. A reorganização das árvores axonais mediada por bloqueio da síntese de mensageiros retrógrados também promoveu modulação da expressão da GAP-43p (Figuras 20). Animais ao final do tratamento com quinacrina apresentaram níveis aumentados da GAP-43p no CS, enquanto que ratos tratados com Narg apresentaram decréscimo na sua expressão. Por último, a interferência com a sinalização mediada por adenosina também interviu na expressão da GAP-43p. O tratamento com dipiridamol promoveu aumento na expressão da GAP-43p apenas durante o período crítico (Figura 21).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o nível de expressão e fosforilação da GAP-43 é um importante modulador para a estabilização e manutenção da conectividade retinotectal bem como para a plasticidade estrutural das projeções retinotectais

6.1 GAP-43P E DESENVOLVIMENTO RETINOTECTAL

O desenvolvimento da via retinotectal é iniciado na vida embrionária e só se completa na terceira semana pós-natal. As CGRs (CGRs) são as primeiras células geradas do tecido, por volta do 14º dia embrionário (Reese e Colello, 1992), fenômeno que parece envolver a GAP-43. Trabalhos recentes têm caracterizado a função da GAP-43 no controle do posicionamento de centríolos, controlando o fuso mitótico, a razão de divisão celular vertical/horizontal e a polarização celular característica da diferenciação de neurônios no córtex e cerebelo (Stricker e colaboradores, 2006; Mishra e colaboradores, 2008). De fato, Britti e colaboradores (1995) mostraram o surgimento de GAP-43 na sua forma

fosforilada no 12º dia embrionário na retina, com imunorreatividade em corpos celulares ao longo de toda a superfície ventricular em E13, que decai após E15. A GAP-43p também pode ser encontrada em outras camadas do tecido, caracterizando sua expressão durante o fenômeno de migração nuclear intercinética. Ekström e Johansson (2003) observaram imunorreatividade em CGRs no 20º dia embrionário e na primeira semana pós-natal.

Os cones de crescimento das CGRs chegam ao quiasma óptico em E15, quando têm de direcionar a escolha pelo tracto óptico a ser seguido. Em ratos, 95% dos axônios retinianos seguem pelo lado contralateral enquanto 5% permanecem do lado ipsilateral. Camundongos nocaute para GAP-43 apresentam falhas nesse ponto de direcionamento, com 56% deles formando projeções bilaterais para ambos os tratos ópticos, 6% formando projeção predominantemente ipsilateral e em 38% os nervos ópticos não conseguem seguir além do quiasma óptico (Zhu e Julien, 1999).

As projeções adentram o CS em E16 e realizam sinaptogênese com alvos no SGS de E17 até DPN 30, com um pico no final da segunda semana pós-natal (Horsburgh e Sefton, 1986; Lund e Lund, 1976; Warton e McCart, 1983). A participação da GAP-43 no processo de sinaptogênese envolve sua modulação positiva na liberação de neurotransmissores. Gamby e colaboradores (1996) mostraram, em células AtT-20, que despolimerização, com conseqüente aumento de cálcio, ou fosforilação de GAP-43 promove sua dissociação da calmodulina e aumento na secreção de β -endorfina. Similarmente, Neve e colaboradores (1998) mostraram que neurônios corticais transfectados com a forma pseudofosforilada da proteína apresentava maior secreção do que as células transfectadas com GAP-43 selvagem ou com seu mutante não-fosforilável, quando submetidas a

despolarização por altos níveis de potássio. Mais recentemente, Hulo e colaboradores (2002) mostraram que camundongos transgênicos que superexpressam a GAP-43 pseudofosforilada apresentam maior facilitação de pulso pareado, indicando aumento na liberação de neurotransmissores na sinapse entre as células de CA3 e CA1 no hipocampo.

Ao entrar no CS os axônios das CGRs cobrem todo o eixo ântero-posterior, médio-lateral e todas as suas camadas visuais, padrão que é encontrado no animal em DPN 0 (Simon e O'Leary, 1992; Serfaty e Linden, 1994; Serfaty e colaboradores, 2005). Nas duas semanas posteriores, ocorre o refinamento com a eliminação dos ramos ectópicos das projeções posteriores numa sequência rostro-lateral para caudo-medial, sendo que as projeções ipsolaterais ficam confinadas ao terço rostral do CS (Serfaty e Linden, 1994). Essa eliminação também promove o refinamento interlaminar e intralaminar, de modo que as projeções ipsolaterais confinam-se em aglomerados na borda ventral do SGS (Serfaty e colaboradores, 2005). A GAP-43 tem participação importante nessa fase do desenvolvimento retinotectal. Como discutido anteriormente, CGRs de ratos durante a embriogênese expressam GAP-43 no corpo celular e axônios, que tem como principal alvo o CS.

No nosso estudo, realizamos *Western Blot* para a GAP-43p nas camadas superficiais do CS de ratos pigmentados durante o desenvolvimento pós-natal. Nossos resultados demonstraram altos níveis de expressão no início do desenvolvimento (de DPN 0 até DPN 10), com diminuição nas idades subseqüentes (DPN 14 até DPN 70) (Figura 16). Dessa forma, encontramos elevados níveis de GAP-43p durante a fase em que os terminais axonais retinianos estão amplamente distribuídos pelo CS, em processo de intenso

remodelamento e eliminação de árvores ectópicas (Serfaty e Linden, 1994; Serfaty e colaboradores, 2005), sugerindo que a GAP-43p seja importante para a plasticidade estrutural das conexões retinotectais durante o desenvolvimento normal. A queda de expressão entre DPN 10 e DPN 14 sugere que a abertura dos olhos e atividade elétrica evocada pela experiência visual possa estar modulando a queda na expressão da proteína. De fato, o fenômeno de abertura dos olhos é responsável por diversas modulações sinápticas da via retinotectal. Lu e Constantine-Paton (2004) mostraram que a abertura dos olhos de ratos promove aumento da PSD-95 nos dendritos; surgimento de novas sinapses silentes; aparecimento de corrente mediada por AMPA; aumento da razão corrente AMPA/NMDA e expressão de LTP em neurônios no SGS. A estabilização das conexões, atingidas após a segunda semana do desenvolvimento, deve ser o principal motivo da queda na expressão da GAP-43 em fases mais tardias do desenvolvimento, porém, nossos resultados mostram que ela permanece expressa em níveis basais até a idade adulta (DPN 70). Uma vez que a manutenção da conectividade retinotectal depende da ativação de receptores NMDA (Cline e Constantine-Paton, 1989, 1990) e que essa mesma ativação leva a expressão de GAP-43 no hipocampo (Cantalops e Routtemberg, 1999), nós imaginamos que a GAP-43p no CS de animais adultos atue na manutenção da estabilidade destas conexões. Corroborando com essa hipótese, estudos sobre potenciação de longa duração (LTP) mostraram aumento na transcrição do RNA mensageiro da GAP-43 (Namgung e colaboradores, 1997) assim como uma maior LTP em camundongos transfectados com GAP-43 pseudofosforilada quando comparado com animais selvagens (Hulo e colaboradores, 2002).

De forma semelhante ao nosso estudo, outros trabalhos também estudaram a expressão de GAP-43 durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. Jacobson e colaboradores (1986) mostraram, através de eletroforese bidimensional, a síntese de GAP-43 no córtex, cerebelo e CS de ratos neonatos. Mostraram que a síntese no córtex é alta em DPN 0, aumenta cerca de 30-40% em DPN 7, idade a partir da qual sua síntese decai. A síntese no cerebelo parece obedecer a mesma cinética. A expressão do RNAm da GAP-43 no córtex também reduz com o desenvolvimento, sendo 10 vezes maior no DPN 10 que no animal adulto. Interessantemente, o estado de fosforilação da GAP-43 nos cones de crescimento apresentava-se aumentado cerca de 4 a 7 vezes quando comparados às membranas sinápticas isoladas de ratos adultos. Esse trabalho em muito se assemelha ao nosso, visto que demonstra a regulação da GAP-43 durante o desenvolvimento em outros sítios cerebrais assim como a prevalência da forma fosforilada nos cones de crescimento, fato que se correlaciona com os nossos dados que mostram aumento de GAP-43p nas fases de intenso modelamento neurítico no sistema retinocolicular.

Outros trabalhos também mostram que a GAP-43 é pouco expressa no cérebro adulto, mantendo níveis elevados apenas em regiões de intensa plasticidade. Benowitz e colaboradores (1988) e Neve e colaboradores (1988) descreveram, em ratos e humanos, respectivamente, que GAP-43 permanece expressa em altos níveis em regiões de grande plasticidade sináptica como o córtex cerebral e regiões subcorticais do lobo límbico, envolvidas com a integração e controle de comportamentos e emoções. Um trabalho de Moya e colaboradores (1988) mostrou resultados muito parecidos com os nossos. Através de injeção intraocular de metionina marcada eles acessaram síntese de GAP-43

transportada por via axonal rápida ao CS de hamsters. Eles observaram altos níveis de GAP-43 transportada no início do desenvolvimento pós-natal dos animais, com acentuada queda em DPN 12 e níveis basais em idades subseqüentes, até o animal adulto. Similarmente ao nosso estudo, esse trabalho observou queda na GAP-43 rapidamente transportada nos animais no dia da abertura dos olhos, corroborando com a nossa hipótese de que a atividade elétrica evocada proporciona mudanças na composição sináptica do sistema retinotectal.

Mais recentemente, Viberg e colaboradores (2008) mostraram por slot-blot, que a expressão da GAP-43 no cérebro de camundongos é regulada durante o desenvolvimento do animal. No hipocampo, ela apresenta um alto nível de expressão ao nascimento, apresenta um pico de expressão em DPN 7 e cai nas idades futuras para os valores de DPN 0. No córtex, ela apresenta uma cinética semelhante ao hipocampo, apresentando altos níveis ao nascimento, com pico em DPN 10 e retornando aos valores de DPN 0 em seguida. Na fração de cérebro total, entretanto, ela tem alta expressão em DPN 0, apresenta uma tendência de aumento até DPN 10 e cai para valores abaixo do nível do nascimento em idades subseqüentes. A cinética de expressão do nosso estudo se assemelha à da fração de cérebro total, visto que ela apresenta outras regiões de menor plasticidade intrínseca, que diluem o efeito de alta GAP-43 no animal mais maduro.

Portanto, nós sugerimos que o alto padrão de expressão da GAP-43p no início do desenvolvimento retinotectal se deve à intensa plasticidade morfológica das árvores axonais, que procuram seus alvos apropriados e retraem de zonas ectópicas, e com a estabilização das conexões, atingidas durante a segunda

semana pós-natal com a abertura dos olhos, a GAP-43 é expressa em menores níveis, correspondentes à sua função na manutenção da conectividade.

6.2 GAP-43P E PLASTICIDADE INDUZIDA POR ENUCLEAÇÃO MONOCULAR

A reorganização morfológica das projeções retinotectais pode ser induzida por diversas manipulações experimentais, tais como interferências com sistemas de neurotransmissores importantes no desenvolvimento retinotectal (Bastos e colaboradores, 1999; González e colaboradores, 2008; Penedo e colaboradores, 2009; Cline e Constantine-Paton, 1989, 1990), inibição da síntese de mensageiros retrógrados que atuam na estabilização dessas conexões (Campello-Costa e colaboradores, 2000, 2006), lesões seletivas de retina (Serfaty e colaboradores, 2005) e enucleação monocular (Reese, 1986; Toldi e colaboradores, 1996; Ahmed e Yamadori, 1995).

Os efeitos da enucleação monocular foram extensamente estudados durante o desenvolvimento da via retinotectal. Chan e Guillery (1993) realizaram enucleação monocular no 16º dia embrionário e observaram diminuição na distribuição das projeções ipsolaterais no CS de ratos neonatos. Por outro lado, enucleação monocular após o nascimento do animal provocou o efeito oposto. Em concordância com esses resultados, foi mostrado que a enucleação neonatal induz a ocupação de territórios maiores pelas projeções ipsolaterais no SGS de *hamsters* e camundongos (Finlay e colaboradores, 1979; Godement e colaboradores, 1980). As projeções retinocoliculares de ratos enucleados em DPN 0 apresentam uma expansão laminar para a superfície do CS e topográfica para regiões caudais desse núcleo, ocupando quase que a totalidade da sua

extensão (Reese, 1986). Em estudo com traçadores retrógrados no sistema retinotectal, Ahmed e Yamadori (1995) mostraram que a enucleação monocular neonatal promove um aumento no número de CGRs que emitem axônios para ambos os colículos superiores. O estudo de Chan e Guillery (1993) mostrou também que, embora a enucleação embrionária promova redução da distribuição ipsolateral no CS em DPN 0, quando esses animais desenvolvem-se até a idade adulta, suas projeções também se apresentam expandidas, porém de forma menos acentuada que os animais enucleados no nascimento. Esses resultados sugerem que os efeitos da enucleação monocular apresentem duas fases: 1ª) uma diminuição das projeções ipsolaterais no desenvolvimento pré-natal; 2ª) uma expansão das projeções remanescentes em decorrência da ausência de axônios contralaterais no desenvolvimento pós-natal. Provavelmente, essa dualidade se dá devido ao fato da remoção dos axônios contralaterais prejudicar o direcionamento apropriado das aferências do olho intacto, já que elas normalmente seguem o mesmo tracto óptico. Dessa forma, as projeções do olho remanescente apresentam dificuldade de chegar ao seu alvo apropriado. Corroborando com essa hipótese, Pittman e colaboradores, (2008) mostrou que o direcionamento apropriado de CGRs ao tecto óptico do peixe zebra depende de interações interaxonais, onde axônios pioneiros e interações comunitárias de axônios facilitam o crescimento de outros em conjunto. Em contrapartida, a enucleação neonatal promoveria a expansão pela maior disponibilidade de fatores tróficos e território sináptico para as projeções intactas, que por sua vez, deixariam de eliminar ramificações transitórias (Reese, 1986).

Como a enucleação neonatal ocorre durante o segundo período de morte celular programada da retina, especula-se que mais CGRs intacta sobrevivam e

dessa forma, emitam mais projeções ipsolaterais ao CS deaferentado. De fato, a redução do número de CGR que se projetam ipsolateralmente durante o desenvolvimento não ocorre se o animal for submetido à enucleação monocular neonatal. Em oposição, o número desses neurônios aumenta (Toldi e colaboradores, 1996 para revisão).

Embora já existam diversos trabalhos descrevendo os efeitos da enucleação monocular neonatal, trabalhos que abordem enucleação em fases mais tardias do desenvolvimento são escassos.

Ahmed e Yamadori (1995) mostraram que a enucleação monocular em DPN 5, quando o refinamento topográfico mediado por atividade elétrica espontânea já está ocorrendo, aumentou o número de CGRs que emitem axônios para ambos os colículos superiores. Serfaty e colaboradores (2005) mostraram, em ratos, que lesão temporal de retina em DPN 10 promove rápida expansão (48 horas) das projeções do olho intacto para lâminas superficiais do SGS do CS ipsolateral.

Um trabalho em preparação pelo nosso grupo mostra que a enucleação monocular em DPN 10, após o período de morte celular natural, promove extensa reorganização das projeções do olho intacto para as camadas superficiais do SGS, com intervalos de sobrevivência rápidos como 24 horas, e que essa reorganização anatômica se mantém na sequência do desenvolvimento, sugerindo que células retinoceptivas do SGS passem a responder a CGRs do olho intacto diferentes das que seriam responsivas originalmente.

No nosso estudo, realizamos *Western blot* para a GAP-43p nas camadas superficiais do CS de ratos pigmentados após diferentes intervalos de sobrevivência em ratos que receberam enucleação monocular em DPN 10. Nossos resultados

demonstraram que a expressão da GAP-43p apresenta um grande (aproximadamente 3 vezes) e transiente aumento após 24 horas, retornando aos níveis do controle quando sua expressão é estudada com 48 horas de sobrevivência ou tempos subsequentes (Figura 17). Dessa forma, observamos que a expressão da GAP-43p é re-induzida no sistema retinotectal após enucleação monocular, e que esse aumento em sua expressão correlaciona-se com um período de extensa plasticidade morfológica.

Corroborando com nossos dados, Schauwecker e colaboradores (1995) promoveram plasticidade dos axônios musgosos no hipocampo de ratos com lesão do córtex entorrinal e fórnix da fimbria, e acessaram a expressão da GAP-43. Seus resultados foram aumento da expressão do RNAm da GAP-43 nos neurônios do hilo e CA3, que emitem os processos da via C/A. Este trabalho se assemelha ao nosso a partir do momento em que mostra que a plasticidade axonal reativa para uma região deafferentada no SNC envolve expressão de GAP-43. Soto e colaboradores (2003), em um trabalho de regeneração de nervo óptico de sapo, mostrou aumento do RNAm e da proteína GAP-43 após axotomia com seus níveis permanecendo aumentados durante todo o período de regeneração, de 12 semanas de duração. Similarmente, a transecção de nervo óptico de ratos adultos induz aumento de 30% na expressão de GAP-43 nas CGRs, embora não promova regeneração do nervo, apenas emissão de neuritos intra-retinianos (Fournier e colaboradores, 1997). A regeneração do nervo óptico em roedores foi mostrada em um trabalho de Ng e colaboradores (1995), onde a presença de canal de nervo periférico no nervo óptico combinado com enxerto de nervo periférico intravítreo promoveu maior regeneração axonal dentro do canal de nervo periférico, com maior expressão de GAP-43 em seus processos (Ng e

colaboradores, 1995). Esses resultados reforçam nossa hipótese de que a GAP-43p permaneça com níveis altos de expressão durante o período de reorganização axonal após enucleação monocular no DPN 10.

No que concerne à relação entre a GAP-43p e a plasticidade estrutural da via visual, Larrive e Grafstein (1987) demonstraram que durante a regeneração do nervo óptico de peixe dourado a GAP-43 sofre aumento na sua fosforilação. O aumento transitório na expressão da GAP-43 no nosso trabalho, provavelmente reflete um menor intervalo de rearranjo axonal no modelo utilizado ou ainda que diversos dos trabalhos citados expressem tanto as formas fosforiladas quanto as não-fosforiladas, enquanto que nossos resultados apresentam somente a isoforma fosforilada. Reforçando essa hipótese, Kaneda e colaboradores (2008) mostraram que, durante a regeneração do nervo óptico de peixe zebra, a GAP-43 apresenta altos níveis de expressão de 3 a 60 dias após a transecção, com declínio suave, enquanto a GAP-43p apresenta um pico transiente de expressão entre 7 e 14 dias após a lesão, declinando seus níveis abruptamente após o 20º dia pós-lesão.

Após o final do período crítico, o sistema retinotectal se encontra estável, com um padrão maduro de conectividade. Serfaty e colaboradores (2005) mostraram que lesão temporal de retina de ratos no DPN 21 promove reorganização na projeção ipsolateral do olho intacto para a superfície do SGS. Nesse caso, porém, o fenômeno leva mais tempo para acontecer, com a plasticidade surgindo a partir de 3 semanas pós-lesão, apresentando-se mais exuberante após 6 meses de sobrevivência. De forma semelhante, um trabalho em preparação do nosso grupo tem evidenciado que a enucleação monocular em DPN 21 também promove reorganização das projeções para a superfície do SGS

ao longo do eixo médio-lateral após longos intervalos de sobrevida, com essa plasticidade se tornando evidente 3 semanas após a lesão.

No nosso estudo, realizamos *Western blot* para a GAP-43p nas camadas superficiais do CS de ratos pigmentados após diferentes intervalos de sobrevida em ratos que sofreram enucleação monocular no DPN 21. Nossos resultados demonstraram que a enucleação monocular induz aumento na expressão de GAP-43p no CS contralateral após uma semana de sobrevida. Esse aumento é transiente, uma vez que seus níveis não apresentam diferenças em relação aos controles nas idades subseqüentemente estudadas (Figura 18). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a plasticidade induzida por enucleação monocular fora do período crítico apresente semelhanças com a induzida dentro do período crítico, com aumento transiente de GAP-43p, que permanece expressa em fases precoces de crescimento e reorganização axonal. Porém essa plasticidade e aumento na expressão obedecem a um curso-temporal mais lento.

Similarmente, Vaudano e colaboradores (1995) relataram que lesão mecânica no tálamo caudolateral esquerdo de ratos adultos induziu aumento na expressão de GAP-43 no tálamo. Baekeland e colaboradores (1996) mostraram que lesão de retina central em ambos os olhos promove aumento de plasticidade sináptica no núcleo geniculado lateral dorsal, o que é acompanhado por um aumento na expressão de GAP-43. Portanto, esses resultados parecem reforçar os nossos, mostrando que a expressão de níveis elevados de GAP-43 pode ser re-induzida em ratos adultos sob plasticidade induzida por lesão mecânica.

Em vista do que foi discutido nós sugerimos que a re-indução da expressão transiente de altos índices de GAP-43p na plasticidade induzida por enucleação seja importante para a reorganização anatômica das árvores axonais retinianas, e

seu retorno aos níveis basais deva corresponder à fase de sinaptogênese dessas novas conexões.

6.3 GAP-43P E PLASTICIDADE INDUZIDA PELO BLOQUEIO DE MENSAGEIROS RETRÓGRADOS

Simon e colaboradores (1992) mostraram que o refinamento das projeções retinotectais de ratos depende da ativação de receptores NMDA durante as duas primeiras semanas pós-natal. Devido ao fato desses receptores serem pós-sinápticos, algum sinal retrógrado se faz necessário para acoplar sua ativação e o remodelamento axonal das projeções. Schmidt (2003) propôs alguns critérios para a identificação de possíveis mensageiros retrógrados. Entre eles destacam-se: 1) a enzima de síntese ou liberação deve estar expressa no período de refinamento. 2) Seu bloqueio ou aumento da disponibilidade deve interferir com a formação do mapa. 3) Liberação deve ser induzida por atividade correlacionada e ativação de receptores NMDA. 4) Deve induzir sinalização pré-sináptica.

O NO, um radical livre que por ser um gás, difunde-se através de membranas biológicas em alta velocidade, dispensando processos de liberação através de exocitose de vesículas ou transportadores protéicos (Lancaster, 1997), é um forte candidato a mensageiro retrógrado durante o refinamento das projeções retinotectais de mamíferos. De fato, Ernst e colaboradores (1999) mostraram que o refinamento das projeções retinotectais de galinhas depende de ativação de receptores NMDA, e que essa ativação é necessária para a atividade da NOS. Além disso, eles mostraram que o bloqueio da NOS apresenta componente ipsilateral aumentado de forma semelhante ao animal que sofreu bloqueio do NMDAr, e que os animais com os dois bloqueios não apresentavam

resposta aditiva na formação de topografia. Esses resultados sugerem que o refinamento retinotectal mediado por NMDA depende da produção de NO. De forma semelhante, Campello-Costa e colaboradores (2000) demonstraram que expressão da NOS é regulada durante o desenvolvimento do sistema retinotectal de ratos, apresentando-se alta durante a fase de refinamento do mapa topográfico. Ela se apresenta em altos níveis nas camadas superficiais do CS em DPN 5, apresenta um nível um pouco menor em DPN 10 e DPN 21, e é diminuída em DPN 42. Estudos com camundongos nocaute para as isoformas endotelial e neuronal da NOS mostraram atraso no refinamento retinotectal, com projeções ipsolaterais expandidas em DPN 9, DPN 15, DPN 21, DPN 28 e DPN 42. O animal adulto, entretanto, apresentava distribuição das projeções ipsolaterais igual aos controles. Cogen e Cohen-Cory (2000) mostraram que interferências nos níveis disponíveis de NO modulam o remodelamento da árvore axonal de CGRs em girinos. Doadores de NO induzem, transientemente, adição de ramos e aumento na extensão da árvore axonal, enquanto que bloqueio da NOS induz aumento na adição e remoção de ramos, aumento na extensão dos ramos e aumento na árvore axonal que persiste 24 horas depois da exposição.

A sinalização pré-sináptica induzida por NO envolve a ativação de guanil ciclase, com conseqüente produção de GMP cíclico e ativação de PKG (Schmidt, 2004 para revisão). Portanto, o NO cobre todos os critérios para ser classificado como um mensageiro retrógrado no desenvolvimento retinotectal.

Um trabalho anterior do nosso laboratório demonstrou que a inibição da NOS promove expansão das projeções retinotectais ipsolaterais entre DPN 8 e DPN 13, mas não apresentou diferenças em relação aos tratados com salina a partir da quarta semana pós-natal. Essa inibição ainda promoveu aumento na

plasticidade induzida por lesão de retina em DPN 5, DPN 10 e DPN 21, sem apresentar aumento na plasticidade no DPN 35. Esses resultados sugerem que o NO participe na estabilização das projeções retinotectais e seu bloqueio induz arborização dessas projeções, prolongando o período crítico para a expressão de plasticidade induzida por lesão temporal de retina.

No nosso estudo, realizamos *Western blot* para a GAP-43p nas camadas superficiais do CS de ratos pigmentados após tratamento intraperitoneal com um inibidor da síntese do NO (NARG 50 mg/kg) entre DPN 9-DPN 12. Nossos resultados demonstraram que a expressão da GAP-43p apresenta-se diminuída após o fim do tratamento, apesar da expansão na árvore axonal ipsolateral (Figura 19).

De forma semelhante, Klocker e colaboradores (2001) mostraram, após transecção de nervo óptico de ratos, que o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) aumenta a expressão de GAP-43 nas CGRs. Este aumento no entanto, é inibido pelo tratamento intraperitoneal com L-NAME.

Por outro lado, Oh e colaboradores (2002) mostraram que o tratamento intraperitoneal com L-NAME, um inibidor da síntese do NO, durante DPN 0 até DPN 21 induz atraso na maturação da camada plexiforme interna da retina de ratos, e esse atraso envolve aumento na expressão da GAP-43 nessas camadas. Um experimento com plasticidade induzida por lesão unilateral de cóclea em ratos adultos mostrou aumento na expressão de NOS neuronal e GAP-43 no lado lesado. Conforme mostrado por dupla-marcação imunofluorescente, o aumento da imunorreatividade para GAP-43 ocorreu em botões pré-sinápticos, vizinhos de células super-expressando nNOS (Chen e colaboradores, 2004). Luo e Vallano (1995) mostraram que aplicação de nitroprussiato de sódio, a fim de gerar NO, em

fatias de hipocampo de ratos adultos em concentrações que geram LTP não foi capaz de induzir fosforilação da GAP-43.

Tendo em vista os trabalhos anteriores da literatura e o fato do nosso tratamento induzir expansão das projeções ipsolaterais no CS nós ficamos surpresos com a diminuição da GAP-43p nas lâminas retinoceptivas. A explicação sugerida para esse resultado é de que a plasticidade estrutural dentro do período crítico parece induzir um aumento transiente da GAP-43p com um curso-temporal rápido (24 horas para a enucleação monocular), e como nos nossos experimentos só acessamos sua expressão 5 dias depois, parece provável que estejamos trabalhando com uma fase onde a GAP-43p já tenha retornado aos níveis basais. Acreditamos que alterações transitórias também possam ser observadas logo após o início do tratamento.

Após o final do período crítico, o bloqueio da síntese de NO não promove expansão das projeções retinotectais ipsolaterais de ratos, o que indica que esse mensageiro não participa da manutenção da topografia do sistema (Campello-Costa e colaboradores, 2000).

O AA, devido à sua constituição lipídica, difunde-se através de membranas biológicas em alta velocidade, dispensando processos de liberação através de exocitose de vesículas ou transportadores protéicos, o que o torna um forte candidato ao papel de mensageiro retrógrado. Inclusive, seu papel na formação do mapa retinotectal de peixe dourado foi mostrado durante a regeneração do nervo óptico (Schmidt, 2004). Leu e Schmidt (2007) mostraram que o AA participa da estabilização, mediada por ativação de NMDAr, das projeções retinotectais do peixe zebra. Aplicação local de um inibidor da atividade da fosfolipase A2 sobre o tecto óptico produziu arborizações maiores que o controle, enquanto que o

bloqueio intraocular não produziu efeito nenhum, sugerindo que o sítio de produção do AA seja a célula tectal. Corroborando com a hipótese do papel do AA como mensageiro retrógrado, aplicação de AA exógeno reverteu os efeitos sobre a plasticidade morfológica. Essa ação do AA sobre a maturação das árvores axonais parece ser mediada pela ativação de PKC pré-sináptica, visto que o bloqueio de PKC e o bloqueio da síntese do AA levaram ao mesmo aumento no número de ramos adicionados e eliminados. Além disso, essa via de sinalização parece ser responsável pela plasticidade morfológica dos axônios da retina após ativação de NMDAr, já que seu bloqueio com MK801 produz efeitos semelhantes (Schmidt e colaboradores, 2003). Nishizaki e colaboradores (1999) mostraram, por HPLC, que há um aumento na liberação de AA após estimulação tetânica ou aplicação de glutamato em fatias de hipocampo de porco da Índia, e que esse aumento é inibido pela aplicação de antagonistas de AMPAr e NMDAr, reforçando a hipótese de participação do AA na LTP.

Recentemente, Campello-Costa e colaboradores (2006) mostraram que a inibição da fosfolipase A₂ por tratamento intraperitoneal com quinacrina induz expansão das projeções retinotectais ipsolaterais após o fim do período crítico do sistema retinoculicolar de ratos. As projeções ipsolaterais de ratos tratados apresentaram-se expandidas, com fibras atingindo a superfície do CS e regiões posteriores às ocupadas pelos animais normais no DPN 28 e DPN 42. Em contrapartida, o tratamento no DPN 9, DPN 13 não induziu expansão das árvores axonais retinotectais. O tratamento com quinacrina ainda estimulou o efeito plástico induzido por lesão de retina temporal fora do período crítico, mas não no início do desenvolvimento pós-natal.

No nosso estudo, realizamos *Western blot* para a GAP-43p nas camadas superficiais do CS de ratos pigmentados após tratamento intraperitoneal com um inibidor da síntese do AA (Quinacrina 40mg/kg) entre DPN 20-DPN 27. Nossos resultados demonstraram que a GAP-43p apresenta-se aumentada após o fim do tratamento (Figura 20).

Nossos resultados são reforçados por evidências que mostram que a GAP-43p induz crescimento neurítico e axonal, via polimerização de F-actina (Gamby e colaboradores, 1996; He e colaboradores, 1997)

Em contrapartida, Schaechter e Benowitz (1993) demonstraram, em sinaptossomos de córtex cerebral de ratos, que o AA induz a fosforilação de GAP-43, na presença de cálcio e depende da ativação da PKC. Luo e Vallano (1995) mostraram que aplicação de AA em fatias de hipocampo de ratos adultos em concentrações que geram LTP induz a fosforilação da GAP-43.

Porém, esses últimos trabalhos discutidos abordam um fenômeno diferente do estudado no presente trabalho. Enquanto eles estudam o papel do AA na modulação da GAP-43p no estabelecimento da LTP, nós estudamos a modulação da expressão da GAP-43p nas conexões retinotectais desestabilizadas pelo bloqueio da síntese de AA. Portanto, nossos resultados mostram que a expressão da GAP-43p é importante para a emissão e crescimento de novos ramos axonais mediada pelo bloqueio da manutenção da sua conectividade.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que a modulação da expressão da GAP-43p é importante para os processos plásticos das projeções retinotectais mediada por bloqueio de mensageiros retrógrados, dentro e fora do período crítico do desenvolvimento.

6.4 GAP-43P E PLASTICIDADE INDUZIDA POR ADENOSINA

A adenosina é um importante neuromodulador do sistema nervoso central, envolvido em neuroproteção e neuroplasticidade (Fredholm e colaboradores, 2005). Especula-se que no sistema nervoso central a adenosina, gerada a partir da liberação ATP por astrócitos, medeia uma inibição tônica via ativação de receptor A_1 , enquanto que a liberação sináptica de altos níveis de ATP por estimulação de alta frequência ativa preferencialmente receptores A_{2a} , o que leva à diminuição na expressão dos receptores A_1 sinápticos, e estimulação via A_{2a} . Portanto, a adenosina tem o efeito de aumentar o contraste no processamento das informações neurais (Cunha, 2007 para revisão). Trabalho de Ventura e Paes de Carvalho (1987) forneceu evidências funcionais da presença de receptores para adenosina no tecto óptico de aves. De fato, Zhang e colaboradores mostraram, no sistema retinotectal, que a adenosina medeia uma inibição tônica, via receptor A_1 , na atividade sináptica em peixe dourado (Zhang e colaboradores, 1998; 1999). Os receptores para adenosina são acoplados à atividade da enzima adenilil ciclase, com A_1 sendo inibitório e A_{2a} excitatório de sua atividade (Fredholm, 2005). Como sugestivo da atuação da adenosina no desenvolvimento e plasticidade neural, alterações nos níveis de AMP cíclico regulam o crescimento e direcionamento axonal de CGRs de peixe dourado na regeneração do nervo óptico (Rodger e colaboradores, 2005).

Um trabalho em desenvolvimento do nosso grupo tem mostrado, no sistema retinotectal de ratos, que os receptores A_1 têm expressão mais alta nas primeiras 3 semanas do desenvolvimento enquanto que os receptores A_{2a} apresentam-se pouco expressos. A partir da terceira semana, os receptores A_{2a}

sofrem aumento e os A₁, diminuição de sua expressão. Esse padrão temporal de expressão correlaciona-se com os níveis de AMP cíclico, que se encontram diminuídos no início do desenvolvimento e aumentam a partir da terceira semana (Gomes e colaboradores, submetido). Aplicação de agonista não seletivo de receptores de adenosina promoveu diminuição do nível de AMPc no DPN 14 e um aumento no DPN 42. Além disso, o aumento dos níveis de adenosina induzido por bloqueio da adenosina deaminase promoveu ruptura da topografia retinotectal, com as projeções ipsolaterais estendendo-se para regiões posteriores do CS e ocupando lâminas dorsais do SGS normalmente não ocupadas pelas projeções retinianas ipsolaterais.

Outro trabalho em desenvolvimento no nosso laboratório (Gomes e colaboradores, em preparação) tem mostrado que o aumento da disponibilidade de adenosina no meio intersticial através do bloqueio do transportador de adenosina por dipiridamol promove expansão das projeções retinianas ipsolaterais no DPN 14, mas não promove efeitos no DPN 28, sugerindo que a inibição da transmissão sináptica mediada por receptor A₁ desestabiliza as conexões retinotectais, induzindo reorganização axonal reativa.

No nosso estudo, realizamos *Western blot* para a GAP-43p nas camadas superficiais do CS de ratos pigmentados após tratamento intraperitoneal com um inibidor do transportador de adenosina (Dipiridanol 50mg/kg) entre DPN 9 – 12 e DPN 20 – 27. Nossos resultados demonstraram que a GAP-43p apresenta-se aumentada após o fim do tratamento dentro do período crítico, mas não é modulada com o tratamento após o fim do período crítico (Figura 21), sugerindo que a GAP-43p é importante para a plasticidade morfológica das árvores

retinotectais induzida por aumento da disponibilidade de adenosina dentro do período crítico.

Em concordância com nossos resultados, Benowitz e colaboradores (1998) mostraram que a aplicação de adenosina local estimulou a expressão de GAP-43 e a regeneração de nervo óptico de peixe dourado.

Por outro lado, O'Driscoll e colaboradores (2005) mostraram que o crescimento neurítico induzido por hipóxia em células PC12 dependente de sinalização por adenosina em receptores A2a induz diminuição na expressão de GAP-43.

Tendo em vista esses resultados, sugerimos que a plasticidade morfológica induzida por dipiridamol dentro do período crítico envolva aumento na expressão de GAP-43p.

Em conjunto, sugerimos que a GAP-43p sofra aumento na sua expressão sempre que há remodelamento axonal das projeções retinotectais, independentemente do processo ocorrer dentro ou fora do período crítico do sistema retinotectal de ratos (Figura 21). Além disso, a GAP-43p, também é expressa em fases tardias do desenvolvimento, o que implica em sua atuação na manutenção da conectividade retinotectal.

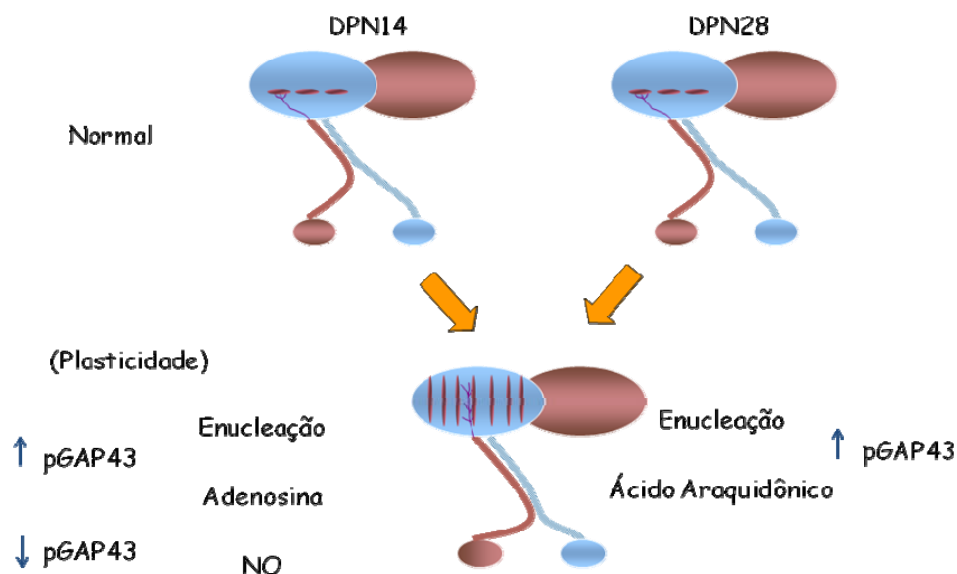


Figura 21: Correlação entre o estado de reorganização morfológica das projeções retinotectais e os níveis de expressão de GAP-43p. Manipulações que induzem reorganização axonal dentro e fora do período crítico modulam a expressão da GAP-43p. Enucleação monocular promove aumento em sua expressão dentro e após o final do período crítico. Aumento da disponibilidade intersticial de adenosina promove aumento da expressão de GAP-43p dentro do período crítico. Inibição da síntese de NO diminui sua expressão dentro do período crítico. Inibição da produção de AA aumenta a expressão de GAP-43p após o final do período crítico.

7 CONCLUSÕES

No presente trabalho estudamos a modulação da expressão da forma fosforilada da GAP-43 no colículo superior de roedores durante seu desenvolvimento normal e frente à manipulações indutoras de plasticidade neural desta via. Nossos resultados mostraram que:

- ✓ A expressão da GAP-43p é regulada durante o desenvolvimento, tendo alta expressão antes da abertura dos olhos e baixa depois deste período, permanecendo expressa até a fase adulta;
- ✓ A enucleação monocular induz um aumento transitório na GAP-43p durante e após o período crítico da via retinotectal;
- ✓ O bloqueio da sinalização retrógrada induzida por óxido nítrico dentro do período crítico diminui os níveis de GAP-43p enquanto que do ácido araquidônico fora do período crítico, leva a um aumento na sua expressão;
- ✓ O acúmulo de adenosina endógena na segunda semana pós-natal leva a um aumento de GAP-43p;
- ✓ Em conjunto, nossos resultados sugerem fortemente que a modulação da expressão da GAP-43 fosforilada é um evento importante para a plasticidade morfológica natural observada no início do desenvolvimento das conexões retinotectais e para a plasticidade induzida, dentro e fora do período crítico do desenvolvimento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMODT, S. M. et al. Chronic NMDA exposure accelerates development of gabaergic inhibition in the superior colliculus, **J. Neurophysiol**, v. 83, p. 1580–1591, 2000.

AHMED, A.K.M.F.; DONG, K.; YAMADORI, T. A retrograde double-labeling of uni- and bilaterally projecting retinalganglion cells that project to the superior colliculi after unilateral eye removal at birth in the albino rat. **Brain Research**, v. 704, p. 307-312, 1995.

AKIYAMA, N. *et al.* Nerve growth factor-induced up-regulation of cytosolic phospholipase A2alpha level in rat PC12 cells. **Neurosci Lett.** v. 365, p. 218-22, 2004.

ARAÚJO, S.E.S. *et al.* Efeito da IL-2 no desenvolvimento das projeções retinotectais de ratos. **Fesbe**, 2009.

ARNI, S. *et al.* Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 43, p.28478-28485, 1998.

BAEKELANDT, V. *et al.* Long-term effects of retinal lesions on growth-associated protein 43 (GAP-43) expression in the visual system of adult cats. **Neuroscience letters**, v. 208, p. 113-16, 1996.

BAGASTEIRO, L.B.; SARLEGNA, F.R.; SAINBURG, R.L. Differential influence of vision and proprioception on control of movement distance. **Exp. Brain research**, v. 171, p. 358-370, 2006.

BAHR, M. Live or let die - retinal ganglion cell death and survival during development and in the lesioned adult CNS. **Trends in neuroscience**. v. 23, n. 10, p. 483-490, 2000.

BASTOS, E. F. *et al.* Fluoxetine-induced plasticity in the rodent visual system. **Brain Research**, v. 824, p. 28–35, 1999.

BENOWITZ, L. I. *et al.* Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain. **The journal of neuroscience**, v. 8, p. 339-352, 1988.

BENOWITZ, L. I. *et al.* Axon outgrowth is regulated by an intracellular purine-sensitive mechanism in retinal ganglion cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 29626-29634, 1998.

BINNS, K. E.; SALT, T. E. Post eye-opening maturation of visual receptive field diameters in the superior colliculus of normal- and dark-reared rats.

Developmental brain research, v. 99, p. 263-266, 1997.

BOKA, K. *et al.* Comparison of the ultrastructure of cortical and retinal terminals in the rat superior colliculus. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 288, p. 850–858, 2006.

BOMZE, H. M. *et al.* Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 1, 2001.

BOTO, L.; MASSERINI, M.; PALESTINI, P. changes in the composition of detergent-resistant membrane domains of cultured neurons following protein kinase C activation, **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, p.443–450, 2007.

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

BRITIS, P. *et al.* The earliest patterns of neuronal differentiation and migration in the mammalian central nervous system. **Experimental neurology**, v. 134, p. 1-12, 1995.

BUTTS, D. A. *et al.* Temporal precision in the neural code and the timescales of natural vision. **Nature**, v. 449, 2007.

CALLAWAY, E. M. Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system. **J Physiol**, v. 566, p. 13–19, 2005.

CAMPELLO-COSTA, P. *et al.* Acute blockade of nitric oxide synthesis induces disorganization and amplifies lesion-induced plasticity in the retinotectal projection. **The journal of neurobiology**, v. 44, p. 371-381, 2000.

CAMPELLO-COSTA, P. *et al.* Blockade of arachidonic acid pathway induces sprouting in the adult but not in the neonatal uncrossed retinotectal projection. **Neuroscience**, v. 139, p. 979–989, 2006.

CAMPELLO-COSTA, P. *et al.* Modulation of retinotectal topography by intravitreal IL-2 treatment. **ISFN**. 2009.

CANTALLOPS, I; ROUTTENBERG, A. Activity-dependent Regulation of Axonal Growth:

Posttranscriptional Control of the GAP-43 Gene by the NMDA Receptor in Developing Hippocampus. **J Neurobiol** v. 41, p. 208–220, 1999.

CARRASCO, M. M; RAZAK, A. K.; PALLAS, S. L. Visual experience is necessary for maintenance but not development of receptive fields in superior colliculus. **Journal neurophysiology**, v. 94, p. 1962-1970, 2005.

CARUSO, D. M. *et al.* GABA-immunoreactivity in ganglion cells of the rat retina. **Brain Res**. v. 476, p. 129-34, 1989.

CHAKRAVARTHY, B. *et al.* Association of Gap-43 (neuromodulin) with microtubule-associated protein MAP-2 in neuronal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, p. 679-683, 2008.

CHAN, S. O.; GUILLERY, R. W. Developmental changes produced in the retinofugal pathways of rats and ferrets by early monocular enucleations: the effects of age and the differences between normal and albino animals. **The journal of neuroscience**, v. 13, p. 5277-5293, 1993.

CHAPMAN, E. R. *et al.* Characterization of the calmodulin binding domain of neuromodulin. **The journal of biological chemistry**, v. 266, p. 207-213, 1991.

CHEN, T.J. *et al.* Co-induction of growth-associated protein GAP-43 and neuronal nitric oxide synthase in the cochlear nucleus following cochleotomy. **Experimental brain research**, v. 158, p. 151-162, 2004.

CHEVALIER, G.; MANA, S. Hneycomb-like structure of the intermediate layers of the rat superior colliculus, with additional observations in several other mammals: Ache patterning. **J. Comp. Neurol**, v. 419, p. 137-153, 2000.

CHIARAMELLO, A. *et al.* The GAP-43 gene is a direct downstream target of the basic helix-loop-helix transcription factors. **J Biol Chem**. v. 271, p. 22035-43, 1996.

CHILTON, J. K. Molecular mechanisms of axon guidance. **Developmental biology**, v. 292, p. 13-24, 2006.

CLINE, H. T.; CONSTANTINE-PATON, M. NMDA Receptor Antagonists Retinotectal Topographic Map. **Neuron**, v. 3, p. 413-426, 1989.

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

COFFEY, E. *et al.* Glutamate exocytosis and MARCKS phosphorylation are enhanced by a metabotropic glutamate receptor coupled to a protein kinase C synergistically activated by diacylglycerol and arachidonic acid. **J Neurochem**. v. 63, p.1303-10, 1994.

COGEN, J; COHEN-CORY, S. Nitric oxide modulates retinal ganglion cell axon arbor remodeling *in vivo*. **Journal neurobiology**, v. 45, p. 120-133, 2000.

COHEN-CORY, S. BDNF modulates, but does not mediate, activity-dependent branching and remodeling of optic axon arbors *in vivo*. **Journal of neuroscience**. v. 19, n. 22, p. 9996-10003, 1999.

CONLEY, M.; FRIEDERIH-ECSY, B. Functional organization of the ventral lateral geniculate complex of the tree shrew (*Tupaia Belangery*): II. Connection with the

cortex, thalamus and brainstem. **J. Comp. Neurol.** v. 328, p. 21-42, 1993.

CRISTO, G. D. et al. Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity. **Nature neuroscience**, 10, p. 2007.

CUNHA, R. A. Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. **Neurochemistry international**, 2007.

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci.** v.14, p. 5147-59, 1994.

ERNEST, A. F. et al. NMDA receptor-mediated refinement of a transient retinotectal projection during development requires nitric oxide. **J Neurosci.** v.19, p. 229-35, 1999.

DEBSKI, E. A; CLINE, H. T. Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. **Curr Opin Neurobiol**, v. 12, p. 93-9, 2002.

DEHMELT, L.; HALPAIN, S. Action and microtubules in neurite initiation: are MAPS the missing link? **Journal of Neurobiology**, v. 58, p. 18-33, 2004.

DENNY, J. B. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. **Current Neuropharmacology**, v. 4 ,p. 293-304, 2006.

DONOVAN, S.L. et al. GAP-43 is critical for normal development on the serotonergic innervation in forebrain. *The Journal of neuroscience.* v. 22, n. 9, p 3543-3552, 2002.

DUBROFF, J.G. ET AL. Anomalous functional organization of barrel cortex in GAP-43 deficient mice. **Neuroimage.** v. 24, n. 4, p. 1040-1048, 2005.

EKSTROM, P.; JOHANSSON, K. Differentiation of ganglion cells and amacrine cells and amacrine cells in the rat retina: correlation with expression of HuC/D and GAP-43 proteins. **Developmental brain research**, v. 145, p. 1-8, 2003.

ERNST, A.F. et al, Mechanisms involved in development of retinotectal connections: roles of Eph receptor tyrosine kinases, NMDA receptors and nitric oxide. **Progress in brain research**, v.118, p. 115-131, 1998.

ERNST, A. F. et al, Mechanisms involved in development of retinotectal connections: roles of Eph receptor tyrosine kinases, NMDA receptors and nitric oxide. **Progress in brain research**, v.118, p. 115-131, 1998.

FAGIOLINI, M. et al. Functional postnatal development of the rat primary visual cortex and the role of visual experience: dark rearing and monocular deprivation. **Vision Res.** v. 34, p. 709-20, 1994.

FINLAY, B. L.; WILSON, K. G.; SCHNEIDER, G. E. Anomalous ipsilateral retinotectal projections in Syrian hamsters with early lesions: topography and functional capacity. **J Comp Neurol.** v. 183, p. 721-40, 1979.

FOURNIER, A. E. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor modulates GAP-43 but not Talpa1 expression in injured retinal ganglion cells of adult rats. **Journal of neuroscience research**, v. 47, p. 561-572, 1997.

FRANKLIN, T. B. *et al.* Enriched environment during adolescence changes brain-derived neurotrophic factor and TrkB levels in the rat visual system but does not offer neuroprotection to retinal ganglion cells following axotomy, **Brain research**, v. 1095, p. 1-11, 2006.

FREDHOLM, B. B. *et al.* Adenosine and brain function. **Int Rev Neurobiol.** v. 63, p.191-270, 2005.

FROST, D, O. ET AL. Developmental changes in BDNF protein levels in the hamster retina and superior colliculus. **Journal of neurobiology.** v. 49, n. 3, p. 173-187, 2001.

GAMBY, C. *et al.* Análisis of the role of calmodulin binding and sequestration in neuromodulin (GAP-43) function. **The journal of biological chemistry**, v. 271, p. 26698-26705, 1996.

GEDDIS, M. S. *et al.* PLA2 and secondary metabolites of arachidonic acid control filopodial behavior in neuronal growth cones. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 57, p. 53-67, 2004.

GIRMAN, S.V.; LUND, R.D. Most superficial sublamina of rat superior colliculus: neuronal response properties and correlates with perceptual figure-ground segregation. **Journal of neurophysiology**, v. 98, p. 161-177, 2007.

GODEMENT, P.; SAILLOUR, P.; IMBERT, M. The ipsilateral optic pathway to the dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus in mice with prenatal or postnatal loss of one eye. **J Comp Neurol.** v.190, p. 611-26, 1980.

GOMES, A.L.T. *et al.* Purinergic modulation in the development of the rat uncrossed retinotectal pathway. Submetido. 2009.

GOMES, A.L.T. *et al.* **The effect of adenosine transporter blockade in the development of the rat uncrossed retinotectal pathway.** Em preparação. 2009.

GONZÁLEZ, E. M. C. *et al.* Neonatal tryptophan dietary restriction alters development of retinotectal projections in rats. **Experimental Neurology**, v. 211, p. 441-448, 2008.

GOODHILL, G. J. Contributions of theoretical modeling to the understanding of neural map development. **Neuron**, v. 56, 2007.

HARVEY, A.R.; WORTHINGTON, D.R. The projection from different visual cortical areas to the rat superior colliculus. **J. Comp. Neurol**, v. 298, p. 281-292, 1990.

HE, Qin; DENT, E. W.; MEIRI, K. F. Modulation of action filament behavior by GAP-43 (Neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 3515-3524, May, 1997.

HEMELT, M. E.; KELLER, A. Superior sensation: superior colliculus participation in rat vibrissa system, **Neuroscience**, v. 8, p. 1-12, 2007.

HENS, J. J. *et al.* Anti-B-50 (GAP-43) antibodies decrease exocytosis of glutamate in permeated synaptosomes. **Eur J Pharmacol.** v. 363, p. 229-40, 1998.

HIRATA, A. *et al.* Intrathecal administration of nerve growth factor delays GAP 43 expression and early phase regeneration of adult rat peripheral nerve. **Brain Research**, v.944, p. 146-156, 2002.

HOLAHAN, M. R. *et al.* GAP-43 gene expression regulates information storage. **Learning & Memory**, v. 14, p. 407-415, 2007.

HOLAHAN, M.; ROUTTENBERG, A. The protein kinase C phosphorylation site on GAP-43 differentially regulates information storage. **Hippocampus**, v. 18, p. 1099-1102, 2008.

HORSBURGH, G. M. & SEFTON, A. J. The early development of the optic nerve and chiasm in embryonic rat. **J Comp Neurol**, v.243, p. 547-60, 1986.

HOOKS, B. M.; CHEN, C. Critical periods in the visual system: changing views for a model of experience-dependent plasticity. **Neuron**, v. 56, p. 312-323, 2007.

HSU, J. Y.; XU, X. M. Early profiles of axonal growth and astroglial response after spinal cord hemisection and implantation of Schwann cell-seeded guidance channels in adult rats. **Journal of neuroscience research**. v. 82, n. 4, p. 472-483, 2005.

HUDSPETH, A. J., LOGOTHESIS, N. K.; Sensory systems. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, p.631-641, 2000.

HULO, S. *et al.* A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity. **European journal of neuroscience**, v. 15, p. 1976-1982, 2002.

IANNAZZO, L. Involvement of B-50 (GAP-43) phosphorylation in the modulation of transmitter release by protein kinase C. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, p. 901-904, 2001.

ILLING, R.B. The mosaic architecture of the superior colliculus. **Progress in brain**

research, v.112, p. 17-34, 1996.

IRWIN, N. *et al.* Nerve growth factor controls GAP-43 mRNA stability via the phosphoprotein ARPP-19. **PNAS**, v. 99, n. 19, p. 12427-12431, 2002.

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

ISENMANN, S.; KRETZ, A.; CELLERINO, A. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. **Progress in retinal and eye research**, V. 22, n. 4, p. 483-543, 2003.

IWAI, L.; KAWASAKI, H. Molecular development of the lateral geniculate nucleus in the absence of retinal waves during the time of retinal axon eye-specific segregation. **Neuroscience**, V. 159, n. 10, p. 1326-1337, 2009.

JACOBSON, R. D.; VIRÁG, I.; SKENE, J. H. P. A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS. **The journal of neuroscience**, v. 6, p. 1843-1855, 1986.

KANEDA, M. *et al.* Changes of phospho-growth-associated protein-43 (phospho-GAP-43) in the zebrafish retina after optic nerve injury: a long-term observation. **Neuroscience research**, 2008.

KLOCKER, N. *et al.* BDNF increases the number of axotomized rat retinal ganglion cells expressing GAP-43, L1, and TAG-1 mRNA-A supportive role for nitric oxide? **Neurobiology of disease**, v. 8, p. 103-113, 2001.

KORSHUNOVA, I. *et al.* GAP-43 regulates NCAM-180-mediated neurite outgrowth. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, p. 1599-1612, 2007.

KORSHUNOVA, I.; MOSEVITSKY, M. Role of the growth-associated protein gap-43 in NCAM-mediated neurite outgrowth. **Neurochem Res**, 2008.

KUROSAWA, N. ET AL. Polysialic acid synthase (ST8Sia II/STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system. **Journal of neurochemistry**. v. 69, n.2, p. 494-503, 1997.

LAKSHMI, S.; JOSHI, P. G. Activation of Src/kinase/phospholipase C/mitogen-activated protein kinase and induction of neurite expression by ATP, independent of nerve growth factor. **Neuroscience**. v.141, p. 179-89, 2006.

LANCASTER, J. R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide**. v. 1, p.18-30, 1997.

LARRIVEE, D. C.; GRAFSTEIN, B. Phosphorylation of proteins in normal and regenerating goldfish optic nerve. **Journal neurochemistry**, v. 49, p.1747-57, 1987.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of neurochemistry**. v. 79, n. 3, p. 463-484, 2001.

LAUX, T. *et al.* GAP43, MARKS, and CAP23 modulate PI (4,5)P2 at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex action dynamics through a common mechanism. **The Journal of Cell Biology**, v. 149, n. 7, p. 1455-1471, 2000.

LEMKE, G.; REBER, M. Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics. **Annual reviews of cell and developmental biology**. v. 21, p. 551-580, 2005.

LEU, B.H.; SCHMIDT, J. T. Arachdonic acid as a retrograde signal controlling growth and dynamics of retinotectal arbors. **Developmental neurobiology**, v. 68, p. 18-30, 2008.

LIANG, X.*et al.* Mass spectrometric analysis of GAP-43/neuromodulin reveals the presence of a variety of fatty acylated species. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, p. 33032–33040, 2002.

LU,W.; Constantine-Paton, M. Eye Opening Rapidly Induces Synaptic Potentiation and Refinement. **Neuron**, v. 43, p. 237–249, 2004.

LUO, L.; FLANAGAN, J. G. development of continuous and discrete neural maps. **Neuron**, V. 56, October 25, 2007.

LUO, Y.; VALLANO, M. L. Arachidonic acid, but not sodium nitroprusside, stimulates presynaptic protein kinase C and phosphorylation of GAP-43 in rat hippocampal slices and synaptosomes. **Journal of neurochemistry**, v. 64, 1995.

LUND, R. D.; LUND, J. S.. Plasticity in the developing visual system: the effects of retinal lesions made in young rats. **J Comp Neurol**, v.169, p.133-54, 1976.

MALAYEV, A. A.; DEBSKI, E. A. Serotonin modulates induced synaptic activity in the optic tectum of the frog. **Brain research**. v. 781, p. 167-181, 1998.

MAY, P., J. The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. **Progress in Brain Research**. V. 151, p. 321-378, 2006.

McHAFFIE, J.G. *et al.* Nociceptive neurons in the rat superior colliculus: response properties, topography, and funtional implications. **Journal of neurophysiology**, v. 62, p. 510-525, 1989.

McILVAIN, A.V. *et al.* Abnormal thalamocortical pathfinding and terminal arbors lead to enlarged barrels in neonatal GAP-43 heterozigous mice. **The Journal of comparative neurology**. v. 462, p. 252-264, 2003.

MCILVAIN, V.; MCCASLAND, J. S. GAP-43 heterozygous mice show delayed

barrel patterning, differentiation of radial glia, and downregulation of GAP-43. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.** v. 288, p. 143-57, 2006

McLAUGHLIN, T. *et al*, Bifunctional action of ephrin-B1 as a repellent and attractant to control bidirectional branch extension in dorsal-ventral retinotopic mapping. **Development**, v.130, p. 2407-2418, 2003.

MCLAUGHLIN, T.; O'LEARY D. D. M. Molecular gradients and development of retinotopic maps. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 28, p. 327-355, 2005.

MAIER, D. *et al*. Disrupted cortical map and absence of cortical barrels in growth-associated protein (GAP)-43 knockout mice. **Neurobiology**, v. 96, p. 9397-9402, 2002.

MEIENBROCK, A. *et al*. Retinotopic effects during spatial audio-visual integration. **Neuropsychologia**, v. 45, p.531–539, 2007.

MEIRI, K. F. *et al*. Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (gap-43) function and is associated with gap-43 phosphorylation in growth cones. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p.10429–10437, 1998.

MEISTER, M.; ET AL. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. **Science**. v. 252, n. 5008, p. 939-943, 1991.

MICHELE, M.; FAISSNER, A. Tenascin-C stimulates contactin-dependent neurite outgrowth via activation of phospholipase C, **Molecular and Cellular Neuroscience**, 2009.

MISHRA, R. *et al*. GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons. **Cell cycle**, v. 7, p. 348-357, 2008.

MIZE, R. R. Immunocytochemical localization of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the cat superior colliculus. **J Comp Neurol.** v. 276, p. 169-87, 1988.

MOONEY, R. D.; KLEIN, B. G.; RHOADES, R. W. Correlations between the structural and functional characteristics of neurons in the superficial laminae and the hamster's superior colliculus. **The Journal of Neuroence**, v. 5, p. 2989-3009, 1985.

MOYA, K. L. *et al*. Changes in rapidly transported proteins in developing hamster retinofugal axons. **The journal of neuroscience**, v. 8, p. 4445-4454, 1988.

MOYA, K. L. *et al*. Immunohistochemical localization of GAP-43 in the developing hamster retinofugal pathway. **J Comp Neurol.** v. 288, p. 51-8, 1989.

MUNOZ, D.P.; FECTEAU, J.H. Vying for dominance: dynamic interactions control visual fixation and saccade initiation in the superior colliculus. **Progress in brain research**, v. 140, p. 3-19, 2002.

MUNOZ, D.P.; ISTVAN, P.J. Lateral inhibitory interactions in the intermediate layers of the monkey superior colliculus. **Journal of Neurophysiology**, v. 79, p. 1193-1209, 1998.

NAKAMURA, F.; STRITTMATTER, P.; STRITTMATTER, S. M. Gap-43 augmentation of G protein-mediated signal transduction is regulated by both phosphorylation and palmitoylation. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 3, 1998.

NAMGUNG, U.; MATSUYAMA, S.; ROUTTEMBERG, A. Long-term potentiation activates the GAP-43 promoter: selective participation of hippocampal mossy cells. **PNAS**, v. 94, p. 11675-11680, 1997

NEVE, R. L. *et al.* Growth-associated protein GAP-43 is expressed selectively in associative regions of the adult human brain. **PNAS**, v. 85, p. 3638-3642, 1988.

NEVE, R. L. *et al.* The neuronal growth-associated protein GAP-43 interacts with rabaptin-5 and participates in endocytosis. **The journal of neuroscience**, v. 18, p. 7757-7767, 1998.

NG, T. F.; SO, K. F.; CHUNG, S. K. Influence of peripheral nerve grafts on the expression of GAP-43 in regenerating retinal ganglion cells in adult hamsters. **Journal of Neurocytology**, v. 24, p. 487-496, 1995.

NGUYEN, L.; HE, Q.; MEIRI, K. F. Regulation of GAP-43 at serine 41 acts as a switch to modulate both intrinsic and extrinsic behaviors of growing neurons, via altered membrane distribution. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v.41, p. 62-73, 2009.

NISHIZAKI, T. *et al.* Arachdonic acid as a messenger for the expression of long-term potentiation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 254, p. 446-449, 1999.

O'DRISCOLL, C. M.; GORMAN, A. M. Hypoxia induces neurite outgrowth in PC12 cells that is mediated through adenosine A2A receptors. **Neuroscience**, v. 131, p. 321-329, 2005.

OESTREICHER, A. B. *et al.* B-50, the growth associated protein-43: modulator of cell morphology and communication in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 53, p.627-686, 1997.

OGASAWARA, K. *et al.* Two visual corticotectal systems in cat. **Journal of Neurophysiology**, v. 52, p. 1226-1245, 1984.

OH, S. J. *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase induces increased production of growth-associated protein 43 in the developing retina of the postnatal rat. **Developmental brain research**, v. 136, p. 179-183, 2002.

OLIVEIRA-SILVA, P. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 is involved in the development and plasticity of retinotectal projections in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, p.144–149, 2007.

OLIVIER, E. *et al.* Evidence for glutamatergic tectotectal neurons in the cat superior colliculus: a comparison with GABAergic tectotectal neurons. **European Journal of Neuroscience**. v. 12, p. 2354-2366, 2000.

OVERHOLT, E. M.; RUBEL, E. W.; HYSON, R. L. A circuit for coding interaural time differences in the chick brainstem. **J Neurosci.**, v. 12, p.1698-708, 1992.

PABLO TRINDADE. **Calcineurina modula a resposta plástica das projeções retinotectais de ratos**. Dissertação de Mestrado, UFF, 2006.

PARSONS, M. J. *et al.* Age-associated changes in the serotonergic system in rat superior colliculus and pretectum. **Brain Res Bull**, v. 55, p. 435-44, 2001.

PASCALE, A. *et al.* Increase of the RNA-binding protein HuD and posttranscriptional up-regulation of the GAP-43 gene during spatial memory. **PNAS**, v. 101, p. 1217-1222, 2004.

PENEDO, L. A. *et al.* Nutritional tryptophan restriction impairs plasticity of retinotectal axons during the critical period. **Experimental Neurology**, 2009.

PERRONE-BIZZOZERO, N. I.; FINKLESTEIN, S. P.; BENOWITZ, L. I. Synthesis of a growth-associated protein by embryonic rat cerebrocortical neurons in vitro. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, p. 3721-3730, 1986.

PITTMAN, A. J.; LAW, M. Y.; CHIEN, C. B. Pathfinding in a large vertebrate axon tract: isotypic interactions guide retinotectal axons a multiple choice points. **Development**, v. 135, p. 2865-2871, 2008.

POLLOCK, G. S.; FROST, D. O. Complexity in the modulation of neurotrophic factor mRNA expression by early visual experience, **Developmental Brain Research**, v. 143,p. 225–232, 2003.

PRICHARD, J. R. *et al.* Light-dependent retinal innervation of the rat superior colliculus. **The Anatomical Record**, v. 290, p. 341–348, 2007.

RAZAK, K. A.; PALLAS, S. L. Dark rearing reveals the mechanism underlying stimulus size tuning of superior colliculus neurons, **Visual Neuroscience**, v. 23, p. 741–748, 2006.

REESE, B. E. The topography of expanded uncrossed retinal projections following neonatal enucleation of one eye: differing effects in dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus. **The journal of comparative neurology**, v. 250, p. 8-32, 1986.

REESE, B. E.; COLELLO, R. J. Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of

the rat. **Neuroscience**, v. 46, p. 419-29, 1992

RHOADES, R. W. ET AL. Development and plasticity of the serotonergic projection to the hamster's superior colliculus. **Journal of comparative neurology**. v. 299, n. 2, p. 1515-166, 1990.

RIEDERER, B. M.; ROUTTENBERG, A. Can GAP-43 interact with brain spectrin? **Molecular Brain Research**, v. 71, p.345-348, 1999.

RODGER, J. *et al.* cAMP regulates axon outgrowth and guidance during optic nerve regeneration in goldfish. **Mol Cell Neurosci**. v. 30, p. 452-64, 2005.

ROSS, W. D. ET AL. Visual cortical mechanisms of perceptual grouping: interacting layers, networks, columns, and maps. **Neural networks**. v. 13, n. 6, p. 571-588, 2000.

SAITO, Y.; ISA, T. Electrophysiological and morphological properties of neurons in the rat superior colliculus. i. neurons in the intermediate layer. **J. Neurophysiol**. v. 82, p. 754–767, 1999.

SANTOS, R. A. **Papel funcional de cinases cálcio dependentes e calcineurina na modulação da especificidade das conexões retinotectais em ratos.** Dissertação de Mestrado, UFF, 2008.

SCHAUWECKER, P.E. et al. Lesion-induced sprouting of commissuravassociational axons and induction of gap-43 mRNA in hilar and ca3 pyramidal neurons in the hippocampus are diminished in aged rats. **The Journal of Neuroscience**, v.15, p. 2462-2470, 1995.

SCHMIDT, J. T. Activity-driven sharpening of the retinotectal projection: the search for retrograde synaptic signaling pathways. **J Neurobiol**, v. 59, p.114–133, 2004.

SERFATY, C. A.*et al.* Nutritional tryptophan restriction and the role of serotonin in development and plasticity of central visual connections. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, p.170–175, 2008.

SERFATY, C. A., CAMPELLO-COSTA, P. & LINDEN, R. Rapid and long-term plasticity in the neonatal and adult retinotectal pathways following a retinal lesion. **Brain Res Bull**,v. 66, p. 128-34. 2005.

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

SHAECHTER, J. D.; BENOWITZ, L. I. Activation of protein kinase C by arachdonic acid selectively enhances the phosphorylation of GAP-43 in nerve terminal membranes. **The journal of neuroscience**, v. 13, p. 4361-4371, 1993.

SHEA, T. B., *et al.* Phospholipid-mediated delivery of anti-GAP-43 antibodies into

neuroblastoma cells prevents neuritogenesis. **The Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 1685-1690, 1991.

SHEN, Y. *et al.* Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 239-247, 2002.

SHI, J.; AAMODT, S. M.; CONSTANTINE-PATON, M. Temporal correlations between functional and molecular changes in NMDA receptors and GABA neurotransmission in the superior colliculus, **The Journal of Neuroscience**, 1997, v. 17, p. 6264–6276, 1997.

SIMON, D. K., PRUSKY, G. T., O'LEARY, D. D. & CONSTANTINE-PATON, M.. Nmethyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the formation of a mammalian neural map. **PNAS**, v. 89, p.10593-7. 1992.

SOOKSAWATE, T.; ISA, K.; ISA, T. Cholinergic responses in crossed tecto-reticular neurons of rat superior colliculus. **J Neurophysiol**, v. 100, p. 2702–2711, 2008.

SOTO, I. *et al.* FGF-2 modulates expresión and distribution of GAP-43 in frog retinal ganglion cells after optic nerve injury. **Journal of neuroscience research**, v. 73, p. 507-517, 2003.

STRICKER, S. H.; MEIRI, K.; GOTZ, M. P-GAP-43 is enriched in horizontal cell divisions throughout rat cortical development. **Cerebral cortex**, v. 16, p.121-131, 2006.

STRITTMATTER, S. M., MICHIIHIRO, I., FISHMAN M. C. GAP-43 amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth, **The Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 5503-5513, 1994.

STRITTMATTER, S. M., VALENZUELA, D., FISHMAN, M. C. An amino-terminal domain of the growth-associated protein GAP-43 mediates its effects on filopodial formation and cell spreading. **Journal of Cell Science** , v. 107, p. 195-204, 1994.

STRITTMATTER, S. M. *et al.* GAP-43 augments G protein-coupled receptor transduction in *Xenopus laevis* oocytes. **Neurobiology**, v. 90, p. 5327-5331, 1993.

SUGITA, S. *et al.* Laminar origin of the tecto-thalamic projections in the albino rat. **Neuroscience Letters**, v. 43, p. 143-147, 1983.

TAYLOR, A.M. *et al.* Subcortical afferent and efferent connections of the superior colliculus in the rat and comparisons between albino and pigmented rats. **Exp. Brain research**. v. 62, p. 131-142, 1986.

TEJERO-DÍEZ, P. *et al.* bFGF stimulates GAP-43 phosphorylation at Ser41 and modifies its intracellular localization in cultured hippocampal neurons, **Molecular**

and Cellular Neuroscience, v. 16, p. 766–780, 2000.

TOLDI, J; FEHER, O; WOLFF, J. R. Neuronal plasticity induced by neonatal monocular (and binocular) enucleation. **Progress in Neurobiology**, v. 48, p. 191-218, 1996.

TONG, J. *et al.* Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) to raft bilayers. **Biophys J BioFAST**, september, 2007.

TORBORG, C.L.; FELLER, M.B. Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections. **Progress in neurobiology**. v. 76, n. 4, p. 213-235, 2005.

TROPEA, D.; CALEO, M.; MAFFEI, L. Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and chondroitinase ABC on retinal fiber sprouting after denervation of the superior colliculus in adult rats. **Journal of neuroscience**. v. 23, n. 18, p. 7034-7044, 2003.

USUNOFF, K. G. *et al.* Efferent connections of the parabigeminal nucleus to the amygdala and the superior colliculus in the rat: A double-labeling fluorescent retrograde tracing study. **Brain research**, v. 1133 , p. 87 – 91, 2007.

VACHON-PRESSEAU, E. *et al.* Development of the representation of auditory space in the superior colliculus of the rat. **Eur J Neurosci**. v. 29, p. 652-60, 2009.

VAUDANO, E. *et al.* The effects of a lesion or a peripheral nerve graft on gap-43 upregulation in the adult rat brain: an in situ hybridization and immunocytochemical study. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 3594-3611, 1995.

VASSON-PRESEAU, E.; ET AL. Development of the representation of auditory space in the superior colliculus of the rat. **European Journal of neuroscience**. v. 29, n. 3, p. 652-660, 2009.

VELASCO, P.C. **Impacto da restrição nutricional de ácidos graxos essenciais na manutenção das conexões retinotectais de roedores**. Dissertação de Mestrado, UFF, 2009.

VENTURA, A. L., PAES DE CARVALHO, R. Development of adenosine-dependent cyclic AMP accumulation in the avian optic tectum. **Brain research**, v. 432, p.141-7, 1987.

VIBERG, H; MUNDY, W.; ERIKSSON, P. Neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) results in changes in BDNF, CaMKII and GAP-43, biochemical substrates of neuronal survival, growth, and synaptogenesis. **NeuroToxicology**, v. 29, 152–159, 2008.

VITALET, N. *et al.* GAP-43 controls the availability of secretory chromaffin granules for regulated exocytosis by stimulating a granule-associated G. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 48, p. 30293-30298, 1994.

WALLACE, M. T. *et al.* Visual experience is necessary for the development of multisensory integration. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 9580 –9584, 2004.

WARTON, S.S.; McCART, R. Synaptogenesis in the stratum griseum superficiale of the rat superior colliculus. **Synapse**, v. 3, p. 136-48, 1989.

WILLIAMS, S. *et al.* Dopaminergic D1 receptor agonist SKF 38393 induces GAP-43 expression and long-term potentiation in hippocampus in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 402, p. 46-50, 2006.

WITHINGTON-WRAY, D. J.; BINNS, K. E.; KEATING, M. J. A four-day period of bimodality auditory and visual experience is sufficient to permit normal emergence of the map of auditory space in the guinea pig superior colliculus. **Neurosci Lett**. v. 116, p. 280-6, 1990.

WOOLF, C. J. *et al.* Denervation of the motor endplate results in the rapid expression by terminal schwann cells of the growth-associated protein GAP-43. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 3999-4010, oct. 1992.

XIANG, Y. *et al.* Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 9, 2002.

XIE, Y. *et al.* Dcc-dependent phospholipase c signaling in netrin-1- induced neurite elongation. **The journal of biological chemistry**, v. 281, p. 2605–2611, 2006.

YANG, X.; L. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. **Progress in neurobiology**. v. 73, p. 127-150, 2004.

YATES, P.A. *et al.* Topographic specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal maps development. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 8548-8563, 2001.

YIN, Y. *et al.* Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells, **Nature Neuroscience** , v. 9, 2006.

ZHANG, C.; SCHMIDT, J. T. Adenosine A1 and class II metabotropic glutamate receptors mediate shared presynaptic inhibition of retinotectal transmission. **J Neurophysiol**, v. 82, p. 2947-2955, 1999.

ZHANG, C.; SCHMIDT, J. T. Adenosine A1 receptors mediate retinotectal presynaptic inhibition: uncoupling by C-kinase and role in LTP during regeneration. **Journal of Neurophysiology**, v. 79, p. 501-510, 1998.

ZHENG, J. J.; LEE, S.; ZHOU, Z. J. A developmental switch in the excitability and

function of the starburst network in the mammalian retina. *Neuron*. v. 44, n. 5, p. 851-864, 2004.

ZHOU, Z. J.; ZHAO, D. Coordinated transitions in neurotransmitter systems for the initiation and propagation of spontaneous retinal waves. **Journal of neuroscience**. v. 20, n. 17, p. 6570-6577, 2000.

ZHU, Q.; JULIEN, J.P. A key role for GAP-43 in the retinotectal topographic organization. **Experimental Neurology**, v. 155, p. 228-242, 1999.

ZWIERS, M. P.; OPSTAL, A. J. V.; CRUYSBERG, J. R. M. A. Spatial hearing deficit in early-blind humans, **The Journal of Neuroscience**, 2001, v. 21, p. 1- 5, 2001.

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](#)