Nathalia de Brito Fuga

**Participação do óxido nítrico no
desenvolvimento colinérgico e glutamatérgico
em regiões visuais de pintos**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Doutor
em Ciências (Fisiologia Humana).

São Paulo

2007

Nathalia de Brito Fuga

**Participação do óxido nítrico no
desenvolvimento colinérgico e glutamatérgico
em regiões visuais de pintos**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana
Orientador: Luiz Roberto Giorgetti de Britto

São Paulo
2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fuga, Nathalia de Brito.

Participação do óxido nítrico no desenvolvimento colinérgico e glutamatérgico em regiões visuais de pintos / Nathalia de Brito Fuga. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Luiz Roberto Giorgetti de Britto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Comunicação celular no sistema nervoso.

Versão do título para o inglês: Nitric oxide and the development of the cholinergic and glutamatergic systems in the chick visual system.

Descritores: 1. Óxido nítrico 2. Desenvolvimento neural 3. Sistema visual 4. Tecto óptico 5. Sistema colinérgico 6. Sistema glutamatérgico I. Britto, Luiz Roberto Giorgetti de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana. III. Título.

ICB/SBIB163/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nathalia de Brito Fuga.

Título da Tese: Participação do óxido nítrico no desenvolvimento colinérgico e glutamatérgico em regiões visuais de pintos.

Orientador(a): Luiz Roberto Giorgetti de Britto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ..... 26 / 02 / 08 ....., considerou

☒ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Elenice Aparecida de Moraes Ferraz
Instituição: IB UNICAMP

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Francisco Spigone
Instituição: IB UNICAMP

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Alexandre Hiwaki Lihara
Instituição: ICB - USP

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Sara Joyce Shamnah Ragnado
Instituição: ICB - USP

Presidente: Assinatura:
Nome: Luiz Roberto Giorgetti de Britto
Instituição: ICB - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: com-icbm@usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.022.2005

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 72/05/CEEA, aprovo a inclusão da aluna: NATHALIA DE BRITO FUGA ao protocolo intitulado: "*Regulação da expressão de receptores glutamatérgicos metabotrópicos no sistema visual*", para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação do Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 19 de outubro de 2005.

Profa. Dra. Marília Cerqueira L. Seelaender
Coordenadora da CEEA- ICB/USP

Agradecimentos

Ao Professor Luiz Roberto Giorgetti Britto pela orientação.

Ao Adilson Alves que sempre me ajudou prontamente na realização dos experimentos de imuno-histoquímica.

Aos animais que cederam a vida para a realização dos experimentos.

A todos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal através de discussões, intermináveis em sua grande maioria, mas deliciosas...

Aos que contribuíram das formas mais diversas para a conclusão deste trabalho.

À FAPESP pela ajuda financeira.

Cérebro eletrônico

(Gilberto Gil)

O cérebro eletrônico faz tudo
Faz quase tudo
Quase tudo
Mas ele é mudo
O cérebro eletrônico comanda
Manda e desmanda
Ele é quem manda
Mas ele não anda
Só eu posso pensar se Deus existe, só eu
Só eu posso chorar quando estou triste, só eu
Eu cá com meus botões de carne e osso
Eu falo e ouço
Eu penso e posso
Eu posso decidir se vivo ou morro
Porque
Porque sou vivo, vivo pra cachorro
E sei
Que cérebro eletrônico nenhum me dá socorro
Em meu caminho inevitável para a morte
Porque sou vivo, ah, sou muito vivo
E sei
Que a morte é nosso impulso primitivo
E sei
Que cérebro eletrônico nenhum me dá socorro
Com seus botões de ferro e seus olhos de vidro

**"Nós seríamos melhores se não
quiséssemos ser tão bons."
Sigmund Freud**

RESUMO

O óxido nítrico tem sido apontado como um importante fator de desenvolvimento neural, participando ativamente como sinalizador espacial durante o processo de refinamento sináptico. Avaliamos nesse estudo a participação do óxido nítrico durante esse processo em tectos ópticos de embriões de pintos (*Gallus gallus*). Para tal avaliamos a imunorreatividade dos neurônios para as proteínas que formam os receptores colinérgicos e glutamatérgicos em diferentes fases do desenvolvimento embrionário, com e sem o bloqueio farmacológico da enzima de síntese do óxido nítrico (NOS). Durante o desenvolvimento embrionário, as subunidades GluR2/3 dos receptores glutamatérgicos são as que aparecem mais precocemente, no 6º dia de desenvolvimento embrionário (E6), juntamente com os neurônios imunorreativos para NOS e somente a partir de E8 é possível identificar a arquitetura laminar típica do tecto óptico. O bloqueio farmacológico da NOS mostrou diferentes padrões de marcação dependendo do tempo de sobrevivência do animal. Em animais eutanasiados 24 h após o bloqueio farmacológico observou-se uma alteração na organização das camadas e no padrão radial de organização dos neurônios imunorreativos. Esse dado sugere que haja um atraso no refinamento sináptico, que se reflete em desorganização das camadas do tecto e alteração morfológicas nos neurônios.

Palavras-chave: Óxido nítrico. Desenvolvimento neural. Sistema visual. Tecto óptico.

Abstract

Nitric oxide has been suggested as an important factor of neural development, participating during the process of synaptic refinement. In this study, we investigated the participation of nitric oxide during development of optic tectum of the chicken embryos (*Gallus gallus*). We evaluated the immunoreactivity of neurons for nitric oxide synthase (NOS) and for cholinergic and glutamatergic receptors in several phases of development. We also analyzed the involvement of a NOS inhibitor in this process. Glutamatergic GluR2/3 subunits and NOS were first detected in the 6th day of embryonic development (E6). In E8, it is possible to identify the typical laminar architecture of the optic tectum. The inhibition of NOS induced a differentiated expression depending on the survival time. In this regard, we observed an alteration of the organization of the tectal layers and in the radial pattern of organization of immunoreactive neurons in the animals that were euthanasiated 24hrs after the inhibition of NOS. These data suggest that the absence of NOS induces a delay in the synaptic refinement, which reflects in disorganization of layers of the optic tectum, as well as morphologic alterations of tectal neurons.

SUMÁRIO

1 – Aspectos gerais	11
2 – Histórico	14
3 – Biossíntese e inibição	17
4 – Isoformas da NOS	18
5 – O papel do NO na excitabilidade neuronal	19
6 – O desenvolvimento do tecto óptico	21
6.1 – Inervação por fibras retinianas	22
7 – O papel do NO na maturação de estruturas encefálicas	24
7.1 – Proliferação neural	24
7.2 – Migração neuronal	24
7.3 – Sinaptogênese	25
7.4 – Morte celular	26
7.5 – Formação do mapa neural	26
7.6 – Envolvimento do NO na eliminação de projeções retinotectais durante o desenvolvimento	27
8 – O papel dos sistemas glutamatérgico e colinérgico no desenvolvimento neural	29
8.1 – Receptores glutamatérgicos	30
8.2 – Receptores colinérgicos	33
9 – Objetivo geral	35
10 – Procedimentos gerais	36
11 – Materiais e métodos	37
11.1 – Imuno-histoquímica	37
11.2 – Uso do indicador de NO (DAF-2)	39
12 – Experimento I – Avaliação da expressão da NOS, receptores glutamatérgicos e colinérgicos no tecto óptico de pintos durante o desenvolvimento	41
13 – Experimento II – Avaliação do bloqueio farmacológico da NOS em pintos durante o desenvolvimento	43
14 – Experimento III – Estudo da morfologia dos neurônios após o bloqueio com 7-NI	45
15 – Resultados	46
15.1 – Experimento I	46
15.2 – Experimento II	50
15.3 – Experimento III	52
16 – Discussão	54
Referências	59

1 - Aspectos gerais

Teorias recentes sobre o funcionamento do sistema nervoso partem do conceito de que as mudanças neurais relacionadas com a regulação positiva ou negativa das conexões sinápticas são mediadas por atividades covariantes de elementos pós-sinápticos e pré-sinápticos. Estes contatos sinápticos quando ativados fortemente são mantidos, enquanto os fracamente ativados são eliminados. Uma consequência deste mecanismo é que, em um dado volume de tecido cerebral, terminais axônicos com padrão de atividade sincrônico tendem a se agregar no mesmo domínio espacial, enquanto terminais assíncrônicos se separam em um espaço distinto. Este mecanismo é capaz de explicar como padrões temporais e espaciais de atividade neural podem resultar na construção topograficamente ordenada dos mapas neurais durante o desenvolvimento. Para que haja a segregação de terminais sinápticos sincronizados em um determinado domínio espacial, é necessário um tipo de sinalização espacial (Contestabile, 2000). Diversos estudos têm demonstrado que o óxido nítrico (NO) é importante durante o desenvolvimento neural, agindo como sinalizador espacial no processo de refinamento das projeções axônicas e no estabelecimento das conexões sinápticas.

O NO parece agir tanto como segundo mensageiro quanto como neuromediador, e se diferencia dos neurotransmissores clássicos, já que estes são estocados em vesículas sinápticas e liberados por exocitose durante a despolarização para agirem em receptores de membrana, que

medeiam suas ações biológicas. Subseqüentemente segue-se a inativação através de mecanismos de recaptação ou degradação enzimática (Dawson e Dawson, 1995). Já o NO não usa nenhum destes mecanismos para o controle de suas ações biológicas. O NO é um gás de molécula muito pequena, produzido conforme a demanda por uma enzima específica, a NO sintase (NOS), existente em alguns tipos de neurônios. A síntese deste gás aumenta quando há ativação sináptica excitatória, especialmente mediada por glutamato, por meio dos receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). No encéfalo uma estimulação pelo glutamato, acionando receptores do tipo NMDA, causa influxo de cálcio, que se liga à calmodulina e ativa a NOS. Este modelo de ativação explica a capacidade da neurotransmissão glutamatérgica estimular a formação de NO em segundos.

Ao ser sintetizado, o NO se difunde imediatamente através das membranas em todas as direções. Por esta razão não há possibilidade de contê-lo em vesículas ou grânulos de secreção. Também por esta razão sua ação é pouco específica e não propriamente sináptica. Este neurotransmissor atua não somente nos elementos pós-sinápticos, mas também nos elementos pré-sinápticos ou mesmo em sinapses vizinhas, ativando a guanilato ciclase (GC) e aumentando os níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) nas células ativas. Quando atua retrogradamente provoca, em geral, uma facilitação na transmissão sináptica. Em função disto, tem-se admitido a hipótese de que o NO esteja ligado a processos moleculares de memória. Entretanto, assim como o glutamato, o NO pode ser considerado uma molécula com duas faces, mediando tanto ações fisiológicas e de neuroproteção como efeitos neurotóxicos, o que

depende tanto de sua quantidade quanto de seu estado reativo (Dawson e Dawson, 1995).

2 – Histórico

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, já que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, tendo um elétron desemparelhado.

O interesse biológico do NO foi consequência do desfecho de três linhas paralelas independentes de pesquisa, e que culminou com o envolvimento do NO em vários processos. A primeira linha investigava o papel do endotélio vascular no relaxamento dos vasos sanguíneos. Esta questão teve início no fato de que a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, depende da presença do endotélio intacto e envolve a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, chamado *endothelial-derived relaxing factor* (EDRF). Rapoport e Murad (1983) propuseram que o mecanismo pelo qual o EDRF causava o relaxamento vascular era mediado pelo GMPc. Cerca de sete anos após a descoberta do EDRF, estudos detalhados nos vasos e plaquetas demonstraram que este composto era o NO. Empiricamente utilizavam-se nitratos orgânicos e nitroglicerina como tratamento de *angina pectoris* em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva. Dois grupos de pesquisadores concluíram que nitratos orgânicos induzem um aumento dos níveis de GMPc dependente da dose e que estes componentes eram em princípio inativos, mas sua metabolização resultava na produção do NO (Katsuki et al., 1977; Schultz et al., 1977). Posteriormente estes pesquisadores concluíram que o NO era a molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores, o que resultava na dilatação das artérias

coronárias. Este mecanismo envolvia a ativação de GC mediada por NO, e o conseqüente acúmulo de GMPc. Rapoport e Murad (1983) estabeleceram definitivamente a importância do NO endógeno ou exógeno no processo de relaxamento vascular.

A segunda linha de investigação tratava da produção de óxidos de nitrogênio pelos mamíferos. Esta questão foi levantada quando Schmidt e Walter (1994) sugeriram a produção destes compostos por mamíferos, já que observaram que a quantidade eliminada destes compostos excedia a quantidade ingerida. Um maior impacto ocorreu quando foi demonstrado que tanto camundongos quanto humanos com dieta pobre em NO₃ excretavam quantidades substanciais desse composto, comprovando a produção endógena de NO₃ nos mamíferos (Green et al., 1981a e Green et al., 1981b). A observação de que altas quantidades de NO₃ eram um achado constante em crianças com diarreia aguda de diversas etiologias sugeriu uma associação entre o sistema imunológico e a produção de NO₃ (Hegesh e Shiload, 1982). Animais com deficiência de macrófagos também apresentavam baixa excreção de NO₃, o que reforçou ainda mais a relação entre sistema imune e NO₃ (Snyder e Bredt, 1992).

A relação entre NO₃, macrófagos e o sistema imune foi estabelecida quando Stuehr e Marletta (1985) demonstraram a produção de NO₃ e NO₂ por macrófagos de rato in vitro, em resposta a *Escherichia coli*. Hibbs et al. (1987) esclareceram a origem do NO₃, estabelecendo a L-arginina como aminoácido essencial para sua produção. Palmer et al. (1988) demonstraram que a L-arginina era o precursor fisiológico do NO nas células endoteliais. A partir desse dado vários pesquisadores suspeitaram que o NO era o

precursor do NO_3 e do NO_2 em macrófagos. Esse fato subseqüentemente ficou comprovado, demonstrando que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune.

A última linha de pesquisa referida está associada à investigação do mecanismo de ação de neurotransmissores. Ferrendelli et al. (1974) demonstraram que o glutamato provoca um aumento do GMPc no sistema nervoso central (SNC). Também se demonstrou a ativação da GC cerebral pelo NO (Miki et al., 1977). Nessa época não havia qualquer conhecimento do NO como molécula mensageira e tampouco da sua formação a partir da L-arginina. O estabelecimento da via L-arginina-NO e do paralelismo entre síntese de NO e acúmulo de GMPc nas células endoteliais levou vários grupos a pesquisar a existência desta via no SNC. Em 1989 foi confirmada a existência do NO no SNC (Bredt e Snyder, 1989) e demonstrado que o glutamato era o mediador da liberação do NO através da estimulação dos receptores tipo NMDA. No ano seguinte foi isolada e purificada do cerebelo de ratos uma isoforma da enzima responsável pela formação do NO, a óxido nítrico sintase (NOS).

O desfecho comum dessas três linhas de trabalho fez com que o NO passasse para a condição de um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, surpreendendo a comunidade científica, dada à quantidade de processos biológicos em que está envolvido.

3 - Biossíntese e inibição

O NO é formado pela conversão de L-arginina em L-citrulina através de uma redução oxidativa que consome 5 elétrons. Bredt e Snyder (1990) descobriram que a atividade catalítica da NOS era dependente da calmodulina. A ligação do complexo cálcio/calmodulina na presença de oxigênio e NADPH ativa a enzima, convertendo L-arginina em NO e formando L-citrulina.

Devido ao NO ser difusível, altamente reativo e sintetizado conforme a demanda, sua síntese é a única forma de regulá-lo. Estudos bioquímicos indicam que a NOS neuronal (NOS_n) pode ser fosforilada pelas proteínas quinase cálcio/calmodulina dependente, AMPc dependente, GMPc dependente e tipo C. A fosforilação por estas proteínas diminui a atividade catalítica da NOS. A formação da NOS é também regulada pela quantidade de cofatores necessários ao processo de síntese no interior da célula (Bredt et al., 1992).

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos (Dusse et al., 2003.). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS. Vários destes inibidores têm sido utilizados para estudo da função do NO, tanto em células isoladas quanto *in vivo*.

4 - Isoformas da NOS

Desde que o NO foi identificado como neurotransmissor que medeia o aumento dos níveis de GMPc através dos receptores de NMDA, maiores esforços têm sido feitos a fim de entender suas ações.

O NO é sintetizado no cérebro por três isoformas da enzima NOS, sendo duas expressas e ativadas pelo cálcio, que são a forma neural (NOSn), e a forma endotelial (NOSe); a terceira isoforma é indutível (NOSi), não é dependente de cálcio e é responsável por uma maciça produção de NO em consequência da estimulação de células macrofágicas (Contestabile, 2000). A NOSn está presente no encéfalo e foi primeiramente purificada a partir de cerebelo suíno e de rato. O NO atua também de forma importante no sistema vascular e imunológico. No sistema vascular atua nos vasos sangüíneos em resposta a substâncias como acetilcolina e bradicinina, induzindo o relaxamento vascular. No sistema imunológico, o NO é formado em macrófagos e neutrófilos em resposta a endotoxinas e parece mediar a atividade tumoricida e bactericida destas células (Hibbs et al., 1987).

5 - O papel do NO na excitabilidade neuronal

Desde a sua descoberta como mensageiro neuronal, a maneira como o NO modula as funções sinápticas tem sido intensamente estudada. O NO modula os potenciais provocados e os potenciais excitatórios em várias regiões do SNC (Prast e Philippu, 2001; Tabela 1). Tais efeitos podem ocorrer por diversas maneiras. A maioria das vezes, esses efeitos de excitabilidade dependem da síntese de GMPc. A ativação da GC aumenta a formação de GMPc e a ação de GMPc dependente de proteína quinase parece ser o principal sinal de transdução da via do NO. Dependendo do tipo de neurônio e da sua localização no SNC, diferentes vias são utilizadas para mediar os efeitos do NO (Prast e Philippu, 2001). Por exemplo, o NO através da síntese de GMPc reduz a função de receptores tipo A do ácido gama aminobutírico (GABA-A) no cerebelo e de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no cerebelo e na retina de ratos (Dev e Morris, 1994; Robello et al., 1996; Prast e Philippu, 2001). Além da via dependente de GMPc, o NO também pode modular a função neuronal de maneira independente do GMPc (Prast e Philippu, 2001; Tabela 1).

Tabela 1: Características dos efeitos do NO no Sistema Nervoso Central. Modificada de Prast e Philippu, 2001.

ÁREA	EFEITOS NA FUNÇÃO CELULAR	EFEITOS NA TRANSMISSÃO SINÁPTICA	DEPENDÊNCIA DE GMPc
Hipocampo (fatias)	> efluxo de K por canais voltagem- dependentes	facilitação	—
Hipocampo (cultura de cel. Piramidais)	> amplitude de potenciais excitatórios pós sinápticos(PEPS)	facilitação	sim
Hipocampo (fatias)	< amplitude dos PEPS	redução	sim
Neurônios talamocorticais (fatias)	> frequência de disparo	facilitação	sim
Tálamo (in vivo e in vitro)	> despolarização da membrana e < resistência	facilitação	sim
Cultura de estriado, Córtex e cerebelo	< corrente dependente de NMDA	redução	não
Cerebelo (fatias)	< afinidade do AMPA nos sítios ligantes	redução	sim
Encéfalo (fatias)	< afinidade do AMPA nos sítios ligantes	redução	não
Núcleo supra Óptico (fatias)	> despolarização da membrana e < condutância da membrana	facilitação	sim
Órgão subfornicial (in vivo)	> abertura de canais ligantes de cation	redução	sim

Símbolos: > aumento, < diminuição

6 – O desenvolvimento do tecto óptico

Sendo este um estudo do desenvolvimento embrionário de pintos que visa verificar alterações em sistemas quimicamente definidos em áreas visuais, optamos por avaliar tais mudanças no tecto óptico de pintos (Figura 1). Os estudos de proliferação e migração celular utilizam muito o tecto devido ao fato de ser uma estrutura laminar em que se pode identificar 15 camadas e mais de 20 tipos de neurônios (Cajal, 1911) (Figura 2).

O crescimento morfológico do tecto é observado a partir do 3º dia de desenvolvimento embrionário (E3), e sua diferenciação histológica ocorre principalmente de E6 a E14. Os primeiros potenciais provocados são observados após E17 (Mey e Thanos, 2000).

O desenvolvimento tectal pode ser dividido em quatro fases sobrepostas que incluem proliferação celular, migração de neuroblastos em diferenciação, crescimento de fibras e sinaptogênese e, por último, uma fase de regressão que inclui a morte celular e a perda neuronal.

O período de máxima proliferação ocorre de E3 até E6. Um neuroepitélio pseudoestratificado com núcleos celulares arranjados em diversas camadas prolifera rapidamente atingindo o pico em E5 e declina, enquanto células na zona ventricular continuam se dividindo até E12. Na segunda semana de incubação ocorre a migração de um grande número de células diferenciadas. Tanto no tecto quanto na retina, o desenvolvimento se inicia a partir de uma área mais avançada e progride para o restante da superfície. No tecto o desenvolvimento se dá da porção rostral e ventrolateral para as áreas caudal e dorsomedial. Essa polaridade rostrocaudal

encontrada em pintos é similar em outras espécies de aves (Mey e Thanos, 2000).

A terminologia usada para descrever o tecto em camadas é usada somente a partir de E16, em que as camadas já estão completas e podem ser identificadas. Nos estágios anteriores há uma migração celular em forma de ondas sucessivas através das camadas mais profundas (LaVail e Cowan, 1971). Há também dificuldade de se verificar qual a fase de desenvolvimento de cada célula, já que a velocidade de desenvolvimento das diferentes porções do tecto não é a mesma. Além disto, a forma e a duração do progresso da migração dependem da camada onde os respectivos neurônios completarão seu deslocamento. A partir de E12 não há o aparecimento de novos elementos celulares, e o crescimento, a maturação, a extensão de neuritos e a sinaptogênese se iniciam. As primeiras junções entre axônio e dendrito são observadas em E14 e aparecem subsequenteemente em todas as camadas do tecto. (Mey e Thanos, 2000).

6.1 – Inervação por fibras retinianas

Exceto por uma pequena população de axônios ipsolaterais, a imensa maioria das células ganglionares retinotectais se projeta para o lado contralateral do encéfalo e representa a maior aferência do tecto. Após crescerem formando o nervo óptico, quiasma e trato óptico, as fibras retinianas chegam às porções anteroventrais do tecto em E6 (Mey e Thanos, 2000). Estudos anatômicos com traçadores mostraram uma conexão precisa entre a posição das células ganglionares na retina, e a posição de suas terminações no tecto. Quando esses axônios crescem no tecto, suas

ramificações podem eventualmente atingir alvos errados através dos eixos rostrocaudal e mediolateral do tecto. Os terminais axônicos formados em posições inapropriadas são, em geral, posteriormente eliminados (Nakamura et al., 1990; Nakamura e O'Leary, 1989).

As fibras retinianas não invadem as camadas mais externas antes de E9, e nesse período os axônios proliferam perpendicularmente à superfície do tecto. Entre E10 e E11 o número de ramificações aumenta no tecto anterior e permanece constante até aproximadamente E18 (Thanos e Bonhoeffer, 1987).

A sinaptogênese no tecto óptico começa na segunda semana de incubação. McGraw e McLaughlin (1980) encontraram a primeira sinapse em E8 na região mais rostral do tecto. As primeiras sinapses são excitatórias e axodentríticas. As sinapses simétricas e inibitórias aparecem mais tardiamente, na terceira semana da embriogênese (Mc Graw e McLaughlin, 1980). O primeiro potencial pós-sináptico registrado após a estimulação do nervo óptico foi encontrado em E11 (Mey e Thanos, 2000).

7 - O papel do NO na maturação de estruturas encefálicas

7.1 – Proliferação neural

O padrão temporal e espacial da expressão da NOS tem sido estudado em diversas espécies (Schilling et al., 1994; Mize et al., 1996; Cramer et al., 1998). Na maioria dos casos os altos níveis são encontrados nos períodos iniciais ou avançados de sinaptogênese. Em alguns casos, entretanto, uma expressão substancial se sobrepõe a períodos mais precoces da neurogênese, indicando um provável envolvimento na proliferação celular (Contestabile, 2000).

7.2 – Migração neuronal

O NO parece ser o responsável pela migração de células da camada externa para a camada interna durante os estágios de desenvolvimento no cerebelo (Contestabile, 2000). Culturas pós-natais de células cerebelares mostraram que a inclusão de um inibidor de NOS diminui significativamente a migração celular (Tanaka et al., 1994), e esse fato deve ser confrontado com estudos que demonstram que a inibição crônica da ação da NOS in vivo durante o desenvolvimento não demonstrou alterações estruturais significativas no cerebelo ou outras regiões (Virgillin et al., 1999; Contestabile, 2000). Estudos recentes têm sugerido que, juntamente com o NO, os receptores de NMDA também são responsáveis pela migração neuronal.

7.3 – Sinaptogênese

A sinaptogênese é considerada uma forma de plasticidade sináptica e fornece ao tecido neural a capacidade de alterar continuamente o número, a localização e a eficácia das conexões de acordo com os princípios de atividade-dependência e da intensidade dos contatos sinápticos (Contestabile, 2000). Diversos estudos têm sido realizados a fim de verificar a importância do NO em mecanismos de memória e aprendizado, que são também uma forma de plasticidade sináptica. Tais estudos têm sugerido fortemente que a ativação de receptores NMDA pós-sinápticos favorecem o influxo de cálcio elevando a taxa de produção do NO, que se difunde entre as células aumentando a liberação de glutamato, o que possivelmente regula de maneira negativa a ativação dos receptores NMDA (Chen e Tonegawa, 1997; Holscher, 1997; Haul et al., 1999). O NO estaria envolvido também na depressão de longo prazo, agindo sobre a diminuição da ativação dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos do glutamato (Chen e Tonegawa, 1997; Holscher, 1997).

O NO parece estar bem envolvido nas fases precoces da sinaptogênese. Entretanto, sua expressão pode se dar de formas variadas. Enquanto alguns neurônios produzem NO desde estágios precoces de desenvolvimento e por toda vida, outros neurônios apresentam um padrão transiente de expressão. Nesses casos, a produção de NO tem sido maior durante períodos relacionados com crescimento axônico, arborização e formação de sinapses (Contestabile, 2000).

7.4 – Morte celular

O NO tem sido descrito como responsável pela eliminação de conexões inapropriadas que são formadas durante o desenvolvimento. Um estudo utilizando injeções de antagonistas de NOS ou doadores de NO in ovo demonstrou uma diminuição da taxa de morte celular programada no núcleo ístmo-óptico, núcleo que se projeta para as células amácrinas da retina contralateral (Posada e Clarke, 1999; Mey e Thanos, 2000).

7.5 – Formação do mapa neural

O papel do NO no desenvolvimento do sistema nervoso tem sido descrito em diferentes espécies. Em ratos, o colículo superior é o maior alvo para axônios da retina e o refinamento das conexões retino-coliculares ocorre durante as primeiras semanas após o nascimento. A NOSn é expressa nas camadas retino-recipientes do colículo superior dos ratos durante este período, o que sugere que o NO tem papel no refinamento sináptico (Kalb e Agostini, 1993). De maneira similar, no pinto as camadas superficiais do tecto óptico são os principais locais que recebem axônios da retina. Antes da inervação pelos axônios da retina, células marcadas para NADPH-diaforase, que é uma enzima considerada um marcador de células produtoras de NO (Paes de Carvalho et al., 1996), são encontradas apenas nas camadas mais profundas do tecto óptico. Quando axônios inervam esta área, células NADPH-diaforase-positivas aparecem nas camadas superficiais, aumentando progressivamente em número até atingir um pico durante a remodelação de conexões retinianas que coincide com a perda de várias projeções. Esta perda é reduzida se a síntese de NO é inibida (Gardino et al., 2004).

Apesar de várias evidências sobre a importância do NO no desenvolvimento das conexões visuais, um estudo recente baseado na inibição farmacológica da NOS in vivo sugere que o NO não é essencial para o padrão de desenvolvimento de conexões tálamo-corticais em ratos (Virgilli et al.,1999). Alguns autores consideram o fato de que, apesar da possibilidade de aspectos relevantes da organização cerebral não serem afetados pela inibição da NOS durante o período de maturação, o papel do NO no desenvolvimento pode estar relacionado com o refinamento de outros circuitos neurais e com a estabilização e as modificações das conexões sinápticas (Virgilli et al.,1999).

Resultados similares foram encontrados no núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) de furões e gatos, em que o NO é expresso de forma transiente durante um período em que projeções da retina são refinadas. Resultados indiretos do suposto papel do NO no desenvolvimento e na plasticidade também têm sido obtidos em gatos adultos. Estes animais, quando submetidos precocemente à sutura palpebral monocular, mostraram presença anormal de atividade NADPH-diaforásica no NGLd, o que não foi observado nos controles, indicando que a atividade da NOS pode ser induzida (ou mantida) pela privação visual (Contestabile, 2000; Dawson e Dawson, 1995).

7.6 - Envolvimento do NO na eliminação de projeções retinotectais durante o desenvolvimento

As funções visuais normais dependem de um padrão particular das conexões axonais. Em algumas espécies, o padrão adulto é alcançado

durante o desenvolvimento por meio de refinamentos sinápticos precoces. Essas projeções precoces são caracterizadas por conexões para áreas inapropriadas. O processo pelo qual essas conexões são eliminadas ainda não está totalmente definido. O desenvolvimento do refinamento ocorre através de um processo atividade-dependente que envolve a ativação de receptores NMDA em neurônios pós-sinápticos no encéfalo (Wu et al., 1994). Diversas características do NO o tornam forte candidato a mensageiro retrógrado responsável pelo refinamento sináptico: (1) o NO é sintetizado e liberado após a ativação de receptores NMDA pelo glutamato, (2) tem a capacidade de atravessar a membrana celular por difusão e aumentar a produção de GMPc em células sensíveis ao NO (3) o aumento do GMPc favorece a abertura de canais de cálcio, (4) a mudança da concentração intracelular de cálcio influencia o crescimento e a retração axonal. Além disso, o NO está relacionado com a formação de LTP no hipocampo adulto e o refinamento de conexões no LTP parece ser um processo similar (Wu et al., 1994).

8 – O papel dos sistemas glutamatérgico e colinérgico no desenvolvimento neural

Alguns estudos indicam que a atividade sináptica influencia o desenvolvimento neural e que este é um mecanismo básico por meio do qual redes neurais são formadas. Além da concentração dos neuromediadores, a expressão dos seus diferentes receptores participa do controle do desenvolvimento.

Mudanças da expressão dos receptores ao longo do desenvolvimento em diferentes regiões do SNC foram muito estudadas. Embora a distribuição dos receptores glutamatérgicos tipo AMPA varie muito espaço-temporalmente, a subunidade GluR1 parece ser altamente expressa em estágios iniciais de desenvolvimento, enquanto a subunidade GluR2 é fracamente expressa quando comparada às outras subunidades (Martin et al., 1998, Arai et al., 1997). Isso indicaria maior permeabilidade ao íon cálcio no cérebro imaturo, uma vez que receptores que possuem a subunidade GluR2 apresentam pequena permeabilidade a esse íon (Bochet et al., 1994; Jonas et al., 1994).

Também os receptores nicotínicos foram estudados no que tange a sua distribuição espaço-temporal (Zoli et al., 1995; Role e Berg, 1996). A expressão precoce dos receptores nicotínicos e da enzima responsável pela síntese de acetilcolina sugere sua participação em eventos do desenvolvimento neural. O padrão de crescimento dos neuritos, por exemplo, parece ser influenciado pela ativação dos receptores presentes nas

extremidades de neuritos em crescimento (Role e Berg, 1996). Os receptores que ligam α -BGT ($\alpha 7$ e/ou $\alpha 8$, ver adiante) são abundantes em todos os estágios do desenvolvimento e apresentam aumento de expressão entre os estágios embrionários E8 e E17/18 em estudos de “binding” associados com métodos de imunoprecipitação em extratos de cérebro de pintos (Conroy e Berg, 1998). Outro estudo, realizado com células do gânglio ciliar em cultura, apóia a idéia de retração de neuritos induzida pela ativação de receptores que ligam α -BGT (Pugh e Berg, 1994). Esses dados sugerem a participação desses receptores no desenvolvimento de neuritos, parecendo este ser um evento dependente dos níveis celulares de cálcio.

8.1 – Receptores glutamatérgicos

Os receptores glutamatérgicos medeiam a grande maioria das sinapses excitatórias do sistema nervoso central, sendo importantes para processos como aprendizado, memória, plasticidade sináptica, desenvolvimento e outros (Mayer e Westbrook, 1987; Monaghan et al., 1989).

Os receptores glutamatérgicos podem ser divididos em dois grupos, chamados de receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Monaghan et al., 1989). Os receptores ionotrópicos geram respostas rápidas, enquanto os metabotrópicos apresentam respostas em longo prazo e suas ações se dão através da inibição ou ativação de mecanismos intracelulares. Os receptores ionotrópicos formam canais específicos e são, portanto divididos em três grupos de acordo com a sua seletividade a agonistas de glutamato: receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropiónico (AMPA) e receptores tipo cainato (KA).

Os receptores metabotrópicos de glutamato são acoplados a proteínas G e agem na modulação da produção de mediadores intracelulares, favorecendo diversos processos (Monaghan et al., 1989). Foram identificados 8 subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1-8) (Nakanishi et al., 1992, Masu et al., 1991). A função dos receptores metabotrópicos no sistema nervoso ainda não está muito esclarecida, mas sabe-se que apresentam uma importante função regulatória (Ozawa et al., 1998).

Os receptores ionotrópicos de glutamato exibem uma estrutura tetramérica, onde o arranjo de quatro subunidades (GluR) forma um complexo receptor homo ou heteromérico. Foram identificadas 7 subunidades (GluR1-7). O estudo dessas subunidades demonstrou que receptores formados por subunidades do tipo GluR1-4 formam receptores que podem ser ativados tanto por AMPA quanto por KA. Nos receptores do tipo AMPA, a subunidade GluR2 é a mais importante na determinação do fluxo de cálcio (Paperna et al., 1996). Receptores que contêm a subunidade GluR2 mostram baixa permeabilidade ao cálcio, enquanto receptores AMPA formados por outras subunidades permitem mais facilmente o influxo de cálcio (Sommer et al., 1990).

Diversos estudos utilizando várias técnicas têm sido feitos a fim de verificar a distribuição desses receptores em diferentes regiões no sistema nervoso. A distribuição dos GluRs foi inicialmente visualizada com ligantes radioativos (Monaghan et al., 1984; Insel et al., 1990). Estudos imuno-histoquímicos também foram utilizados demonstrando a distribuição de receptores do tipo AMPA no cérebro de pombos. Utilizando anticorpos contra

a porção carboxi-terminal das subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 demonstrou-se uma ampla distribuição da subunidade GluR1 na neurópila e corpos celulares das camadas 2-7 no tecto óptico. As subunidades GluR2/3 foram observadas em poucas células da camada 10 do tecto óptico. Foi observada uma tênue marcação tipo GluR4 em neurópila das camadas 2-13 do tecto óptico (Theiss et al., 1998). Também em estudos de imuno-histoquímica foi encontrada uma ampla distribuição de receptores tipo AMPA nas áreas retinorreipientes de pintos, sugerindo que diferentes arranjos dessas subunidades podem ser encontrados em diferentes subpopulações de neurônios visuais (Pires et al., 1998).

Outro grupo de receptores de glutamato, os de NMDA, participam da neurotransmissão excitatória no SNC de forma diferente da realizada pelos GluRs do tipo AMPA. Os GluRs do tipo NMDA apresentam um bloqueio de Mg^{2+} voltagem – dependente e alta permeabilidade aos íons Ca^{2+} (Mayer et al., 1984). O complexo canal do receptor NMDA tem vários aspectos característicos. Somente os canais homoméricos formados pela subunidade NMDAR1 são funcionais quando ativados por glutamato, ibotenato, quisqualato e homocisteato; as outras subunidades necessitam da presença da subunidade NMDR1 para formar um receptor funcional (Mori, 1995; Nakanishi, 1992). O canal deste receptor é permeável ao Ca^{2+} , bem como ao Na^{+} e K^{+} e o aumento resultante de Ca^{2+} intracelular parece ser o responsável tanto pela plasticidade quanto pela toxicidade nas quais esse receptor parece estar envolvido. Esse receptor pode ser diferenciado dos outros receptores de glutamato por sofrer ação de vários agonistas e pelas

suas propriedades que incluem modulação de glicina, bloqueio do canal por Mg^{2+} , ativação pela poliamina e inativação pelo Zn^{2+} (Monaghan et al., 1989).

Estudos com ligantes radioativos mostraram a presença difusa de receptores tipo NMDA no encéfalo, predominantemente no prosencéfalo (Monaghan et al., 1989).

8.2 – Receptores colinérgicos

A acetilcolina é um neurotransmissor presente em todas as junções neuro-musculares e também no sistema nervoso autônomo, além de estar largamente distribuída no sistema nervoso central, participando nos mecanismos de memória, cognição e processos visuais.

Da mesma forma que o glutamato, a acetilcolina é um neurotransmissor que pode agir ligando-se a duas classes de receptores: os do tipo metabotrópico e os do tipo ionotrópico. Entretanto, nesse caso os receptores metabotrópicos para acetilcolina recebem o nome de muscarínicos, por terem afinidade pela muscarina, e os ionotrópicos recebem o nome de nicotínicos, por apresentarem afinidade à nicotina.

Os receptores muscarínicos são constituídos por proteínas únicas, mas apesar disso apresentam grande diversidade e seus subtipos aparecem difundidos no organismo, inclusive no sistema nervoso central (Schroder et al., 1989).

O uso de substâncias marcadas radioativamente e que se ligam aos receptores nicotínicos foi uma ferramenta útil por muito tempo nos estudos desses receptores. Entretanto, com o emprego de técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a clonagem e o seqüenciamento de várias

subunidades desses receptores (Role, 1992; Sargent, 1993). A α -bungarotoxina (α -BGT), uma toxina da serpente *Bungarus multicinctus* foi também um importante instrumento para o estudo dos receptores nicotínicos em órgãos elétricos de peixes e na junção neuromuscular, fornecendo dados importantes para o estudo desses receptores neuronais, bem como de outros receptores ionotrópicos (Lindstrom, 1998).

Diversos estudos sugerem que os receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChRs) são formados por dois tipos de subunidades, as do tipo ligante (α) e as estruturais (β) (Lindstrom et al., 1990). Entre subunidades do mesmo tipo existem diferenças na sequência de aminoácidos, subdividindo as subunidades do tipo α em α 1-10 e as do tipo β em β 2-4 (Schoepfer et al., 1990; Elgoyhen et al., 1994). Da mesma forma que ocorre para receptores glutamatérgicos, a grande variedade de subtipos que formam as subunidades dos receptores nicotínicos garante a esses receptores características fisiológicas diversas.

Os subtipos α 7-10 se ligam à α -bungarotoxina, sendo que suas combinações mais conhecidas são homoméricas ou heteroméricas com α 7 e α 8. Uma característica interessante em relação aos receptores nicotínicos formados pelas subunidades α 7-10 é a alta permeabilidade ao cálcio, uma vez que este poderia funcionar como segundo-mensageiro participando de diversos processos celulares (Elgoyhen et al., 1994).

9 – Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é verificar a influência do sistema nitrinérgico sobre os sistemas colinérgico e glutamatérgico no tecto de pintinhos durante o desenvolvimento embrionário. Estes sistemas estão sendo verificados não só pela sua importância em doenças neurológicas, mas por serem vastamente estudados em nosso laboratório no tocante ao seu desenvolvimento embrionário (Torrão et al., 2000; Batista et al., 2002; Silveira dos Santos Bredariol e Kamassaki-Britto, 2001).

10 – Procedimentos gerais

Para avaliar a influência do NO no desenvolvimento, optamos por utilizar o tecto óptico de embriões de pintinhos. Esta opção foi feita devido ao fato do tecto ser uma estrutura bastante estudada no que diz respeito à proliferação, migração e diferenciação celular, por ser uma estrutura que apresenta organização laminar (Cajal, 1911).

Iniciamos o estudo verificando a distribuição da NOS e de receptores colinérgicos e glutamatérgicos no tecto óptico de pintos durante o desenvolvimento embrionário. Em um segundo momento, realizamos o bloqueio farmacológico da NOS e analisamos a distribuição desses mesmos receptores, além da distribuição de neurofilamentos e proteínas específicas de sinapses.

11 – Materiais e métodos

11.1- Imuno-histoquímica

Animais

Foram utilizados 149 ovos fertilizados de pintos (*Gallus gallus*) fornecidos pela empresa BioVet (Cotia, SP). Os ovos foram colocados em uma incubadora e mantidos em condições de umidade e temperatura adequadas e constantes (51% e 38°C, respectivamente). A idade embrionária foi verificada através da comparação das medidas do bico e do 3º dedo do animal com as medidas de um atlas de desenvolvimento embrionário desta espécie (Hamburger e Hamilton, 1951).

Preparação do tecido

Os embriões com idade inferior a E10 não foram perfundidos e, devido à fragilidade óssea, sua cabeça foi colocada em paraformaldeído (PFA) a 2% em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Animais com idade superior a E12 eram perfundidos com PFA 2% e em seguida tinham o seu encéfalo retirado e mantido na mesma solução. Ambos eram mantidos por 5-6 horas no fixador, após o que foram transferidos para uma solução de sacarose a 30% em PB para a crioproteção. O material foi cortado no plano coronal com espessura de 16-20 µm em um criostato. Os cortes que possuíam o tecto óptico foram colocados em lâminas gelatinizadas que permaneciam sobre uma placa quente (37°C) por 14 -16 horas e eram a seguir colocadas em um dessecador, onde permaneciam por aproximadamente 4 horas. Depois de retiradas as lâminas, os cortes eram submetidos à metodologia imuno-

histoquímica específica para cada proteína que se desejava estudar, como descrito abaixo para cada caso.

Reação imuno-histoquímica

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

Anticorpos de coelho específicos contra a porção carboxi-terminal das subunidades GluR1 e GluR2/3 dos receptores de glutamato do tipo AMPA (Chemicon) em uma concentração de 1:250 e 1:500, respectivamente; anticorpo monoclonal de camundongo contra a NOSn (Sigma); anticorpo de rato específico contra a subunidade $\alpha 8$ dos receptores nicotínicos (mAb305, Schoepfer et al., 1990); anticorpo de camundongo anti-neurofilamento (PAN) (Zimed) e anticorpo de coelho específico contra sinaptofisina, esses últimos em concentração de 1:1000.

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário por 14-18 horas. Após 3 lavagens (10 minutos cada) em PB, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos secundários, respectivamente: anti-coelho biotinilado feito em cabra, anti-camundongo biotinilado feito em burro, anti-rato biotinilado feito em cabra (Vector Labs., Burlingame, CA), todos diluídos a 1:200 em PB com Triton X-100 a 22°C por 2 horas. Os cortes foram novamente lavados com PB e incubados com uma solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite KIT; Vector Labs.) por 1:30 hora, seguindo-se a reação com 0,05% de 3 -3'- diaminobenzidina e uma solução de 0,01% de peróxido de hidrogênio em PB e intensificação com 0,05% de tetróxido de ósmio em água. Os cortes foram desidratados e cobertos com lamínulas usando-se Permount (Fisher).

Análise de dados

Os cortes foram analisados em um microscópio óptico observando-se a intensidade da imunorreatividade para as proteínas estudadas. Foram atribuídos 5 valores subjetivos, levando-se em conta a intensidade de marcação para cada camada do tecto óptico durante o desenvolvimento embrionário. Estes valores foram comparados a um esquema de desenvolvimento de tecto óptico baseado no modelo de Scicolone e colaboradores (1995). As imagens digitais foram obtidas por meio de uma câmera digital acoplada a um microscópio.

11.2- Uso do Indicador de NO 4,5-diaminofloresceína-2 (DAF-2)

Animais

Foram utilizados 3 ovos fertilizados de pintos (*Gallus gallus*) fornecidos pela empresa BioVet (Cotia, SP).

Preparação do tecido

Os animais foram sacrificados por decapitação e foram feitas fatias coronais do mesencéfalo com espessura de 150 a 200 μm .

Reação com DAF-2

Essas fatias foram incubadas com 5 μM de DAF-2 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) em PB contendo 0,5 mM de cloreto de cálcio por 1 hora a 37° C. Metade das fatias receberam, além das substâncias citadas, 12,5 μM de 7-NI (SIGMA). Após esse período de incubação, o material foi examinado em um microscópio de fluorescência, observando-se a intensidade da imunorreatividade.

Análise de dados

A análise dos dados foi feita através de uma comparação visual entre as fatias que receberam o 7-NI e as que não receberam. As imagens digitais foram obtidas por meio de uma câmera digital acoplada ao microscópio.

12 – Experimento I - Avaliação da expressão da NOS, receptores glutamatérgicos e colinérgicos no tecto óptico de pintos durante o desenvolvimento

Diversos autores descreveram a localização da enzima de formação do NO em áreas visuais de pintos (Willians et al., 1994; Paes de Carvalho et al., 1996; Ríos et al., 2000) e de outros animais (Norris et al., 1996; Bredt et al., 1990). A fim de padronizar nossos experimentos de imuno-histoquímica, optamos por iniciar pela localização da expressão da NOS. Estes experimentos foram feitos utilizando-se pintos em diferentes épocas do desenvolvimento embrionário, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2: Número de animais utilizados em cada um dos estágios embrionários.

ESTÁGIO EMBRIONÁRIO	NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS
<E7	3
E7	3
E8	2
E9	2
E10	4
E12	4
E14	4
E16	4
E18	3
E20	2

O interesse no estudo das subunidades GluR1 e GluR2/3 no tecto de pintos em desenvolvimento se dá principalmente pela disparidade no

aparecimento destas subunidades durante este período em algumas espécies. Enquanto a subunidade GluR1 tem sido observada no início do desenvolvimento em ratos, as subunidades GluR2/3 parecem ser mais expressas nos estágios finais. Isto poderia indicar uma maior permeabilidade ao cálcio durante fases mais precoces em relação às fases tardias do desenvolvimento (Caiedo e Ebaly, 1999), uma vez que o predomínio da subunidade GluR2 produz pouca permeabilidade a este íon em receptores correspondentes (Jonas et al., 1994).

Vários estudos têm demonstrado a expressão precoce de receptores nicotínicos no sistema nervoso periférico e central por métodos de hibridização *in situ* e imuno-histoquímica (Conroy e Berg, 1998, Kaneko et al., 1998). Estes estudos sugerem que os receptores nicotínicos presentes nas extremidades neuríticas participam de eventos de regulação durante o desenvolvimento neural, tais como crescimento de neuritos e seleção de alvos (Role e Berg, 1996). Para a realização deste estudo optamos por localizar a subunidade $\alpha 8$. A escolha se deu com base em um estudo de mapeamento da expressão de receptores nicotínicos da acetilcolina no sistema nervoso de pintinhos (Torrão et al., 2000). Neste estudo, os autores observaram a expressão dos diversos receptores em várias áreas e demonstraram uma intensa expressão do subtipo $\alpha 8$ em neurônios do tecto óptico.

13 - Experimento II – Avaliação do bloqueio farmacológico da NOS em pintos durante o desenvolvimento

Iniciamos os testes de bloqueio da NOS utilizando duas das principais drogas utilizadas para o bloqueio da síntese de NO descritas na literatura, a N ω -nitro-L-arginina (NoArg) e a N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Wu et al., 1994). Tais drogas não representam inibidores seletivos da NOS neuronal e a ação destas drogas sobre a NOS endotelial pode ter causado a morte de diversos animais por alteração no fluxo sanguíneo cerebral (Moncada et al., 1991). A alta taxa de mortalidade fez com que procurássemos uma droga mais específica e menos letal.

Tem sido descrito que o 7-NI inibe a NOS no cérebro de ratos com uma potência maior ou igual ao L-NAME (Babbedge et al., 1993) e que este efeito não está associado com o aumento da pressão sanguínea, como é característico nas drogas usadas anteriormente. Dessa forma, o 7-NI possibilitaria o estudo do papel do NO no SNC sem a interferência de efeitos centrais causados pela elevação da pressão sanguínea (Dzolic et al., 1996).

O bloqueio farmacológico foi realizado utilizando-se o 7-NI (SIGMA) diluído em água. Utilizamos 25 mg/Kg, o que corresponde a uma dose intermediária descrita para uso intraperitoneal em ratos (Gillian et al., 1994). Injetamos 100 μ L da solução por ovo a cada 4 horas durante 12 horas. Este protocolo foi escolhido devido à ação da droga ser reversível e apresentar efeito máximo após 30 minutos da aplicação, conferindo uma atividade da NOS inferior a 20% e volta a aumentar gradativamente até atingir, em

algumas regiões como, por exemplo, o hipocampo, níveis próximos a 100% após 4,5 horas (Burlet et al., 1999).

Os animais foram divididos em quatro grupos: um grupo tratado com água (controle I), outro tratado com a droga e retirado da casca 24 horas após a primeira aplicação (experimental I), um terceiro grupo, tratado com água (controle II) e um quarto grupo tratado com a droga, cujos animais eram sacrificados no primeiro dia de vida (experimental II). As aplicações foram feitas através de um pequeno orifício feito na casca dos ovos. Seguiu-se então o procedimento para imuno-histoquímica para cada uma das proteínas estudadas, da mesma forma como já descrito no Experimento I. O número de animais utilizados em cada grupo está descrito na tabela 3.

Tabela 3: Número de animais utilizados em cada um dos grupos. Esses animais estavam entre E10 e P0.

GRUPOS DE ANIMAIS	NÚMERO DE ANIMAIS
Controle I	35
Experimental I	25
Controle II	32
Experimental II	26

14 - Experimento III – Estudo da morfologia dos neurônios após o bloqueio com 7-NI

Esse estudo tentou elucidar se alterações encontradas na expressão das proteínas seriam relacionadas à sua distribuição ou à morfologia do neurônio. Para tanto utilizamos um anticorpo contra a sinaptofisina, proteína presente nas vesículas pré-sinápticas (Schmid et al.,1994). Para verificarmos a morfologia dos neurônios no tecto utilizamos ainda um marcador de neurofilamentos (PAN). Por serem essas proteínas bastante estáveis, esse anticorpo pode ser usado de forma segura para estudar a diferenciação neuronal, as conexões entre neurônios e sua morfologia (Schmidt et al.,1991).

Os animais foram divididos em dois grupos: um grupo tratado com água (controle) e outro tratado com a droga (experimental), ambos retirados da casca após a primeira aplicação. As aplicações foram feitas através de um pequeno orifício feito na casca dos ovos. Seguiu-se então o procedimento para imuno-histoquímica para visualização de neurofilamentos e sinaptofisina. Os animais foram os mesmos utilizados nos grupos Controle I e Experimental I do Experimento anterior (vide Tabela 3).

15 – Resultados

Como dito anteriormente, o desenvolvimento do tecto não ocorre de forma homogênea. No Experimento I, que teve por objetivo avaliar a expressão das várias proteínas, optamos por realizar um estudo das diferentes porções do tecto e compará-las entre si. Entretanto, nos experimentos em que havia grupo controle, optamos inicialmente por comparar a porção rostral ventro-lateral que corresponde à porção mais desenvolvida em cada um dos estágios de desenvolvimento (Figura 3). Porém, ao perceber que as alterações ocorriam também em outras regiões passamos a incluí-las na análise, fazendo sempre uma comparação entre as mesmas regiões em animais de grupos diferentes. A Figura 2 demonstra a citoarquitetura do tecto óptico em algumas fases do desenvolvimento ilustrando as camadas celulares e os compartimentos que dão origem a elas.

15.1 – Experimento I: Avaliação da expressão da NOS, receptores glutamatérgicos e colinérgicos no tecto óptico de pintos durante o desenvolvimento

A Figura 4 demonstra o padrão de marcação para NOS. Foram analisados animais entre E5 e E20. Os animais em E5 não apresentaram marcação para NOS, visualizada somente a partir de E6. Neste estágio de desenvolvimento a marcação foi vista nos compartimentos intermediários do tecto óptico dorsal. Foram visualizados alguns poucos corpos celulares

marcados na porção ventral. Em E8 a presença de corpos celulares se torna mais evidente e é possível diferenciar dois compartimentos com prolongamentos celulares, que são mais visíveis nas porções ventrais do tecto. A partir de E9 percebe-se que há um compartimento intermediário cujos prolongamentos celulares se projetam de forma organizada para os adjacentes, adquirindo uma característica radial, e é também possível observar a divisão deste compartimento em dois, ao menos nas porções mais ventrais do tecto. Neste estágio também é bem marcante o aparecimento do compartimento externo do tecto que formará a camada que recebe axônios da retina. Em E10 a marcação deste compartimento superficial é bem intensa. A partir de E12 o compartimento de células intermediárias parece se dividir em dois. O compartimento mais externo permanece bem marcado e aparecem corpos celulares marcados em níveis inferiores. Em E14 ocorre a diminuição da marcação do compartimento interno que recebe axônios da retina e também dos plexos. No estágio E18, diminui muito a expressão de NOS no compartimento externo formado por axônios da retina. O padrão de expressão durante o desenvolvimento está demonstrado na Figura 5.

A subunidade GluR1 iniciou sua expressão a partir de E7, apresentando uma única camada marcada. A partir de E8 foi possível identificar duas camadas celulares, sendo a externa formada basicamente por prolongamentos marcados e a intermediária por células, sem marcação. Esta camada celular não sofreu divisão nem mesmo marcação durante todo o desenvolvimento do tecto. A marcação da camada externa tornou-se mais intensa a partir de E9, juntamente com um espessamento das camadas do tecto. A partir de E10 é possível identificar a formação de camadas

intermediárias, que no adulto formam as camadas 9, 10, 11 e 12. Em E14 ocorre o surgimento de novos compartimentos. O externo tem marcação moderada e irá originar, a partir de E18, as camadas 2, 3 e 4. O compartimento intermediário irá formar a camada 5 e apresentou marcação intensa, enquanto o compartimento mais interno não apresentou marcação e origina as camadas 6, 7 e 8 no animal adulto. Em E18 as camadas 3 e 7 apresentaram expressão moderada de GluR1 (Figuras 6 e 7).

As subunidades GluR2/3 mostraram-se presentes já em E5. O padrão de marcação para essas proteínas pode ser visto na Figura 8. Em E7 houve mudança na intensidade da marcação, além do alargamento da porção marcada, assim como de todo o tecto. Em E8 foi possível visualizar dois compartimentos distintos no tecto óptico, sendo que ambos apresentavam-se marcados para as subunidades GluR2/3. A camada mais interna apresentou um padrão de marcação mais intenso que a camada externa. No 9º dia esta camada externa passou a apresentar marcação intensa. A partir de E10 até E12 não houve mudança no padrão de expressão, sendo que no início deste período o tecto óptico apresentou três compartimentos celulares distintos. O compartimento mais interno apresentou marcação intensa, o compartimento intermediário apresentou marcação fraca e o mais externo, moderada.

Assim como o observado na marcação para GluR1, a partir de E14 ocorreu o surgimento de novos compartimentos (Figura 9). Dentre os compartimentos surgidos neste estágio o mais externo apresentou marcação moderada, o intermediário não apresentou marcação e o interno foi o que apresentou a marcação mais fraca. O compartimento que forma as camadas 9, 10, 11, 12 apresentou expressão fraca até E18, e a partir daí até o dia do

nascimento houve pequeno aumento na expressão das subunidades GluR2/3. O compartimento que forma a camada 13 apresentou marcação muito intensa a partir deste período. Também em E18 se observa o aparecimento de compartimentos situados mais externamente dando origem às oito primeiras camadas.

A subunidade $\alpha 8$ iniciou sua expressão em E8, ocorrendo nas camadas intermediárias do tecto óptico de forma leve. Esta camada apresenta corpos celulares e prolongamentos. A partir de E10 aparece uma marcação leve nos compartimentos mais profundos do tecto, visualizando-se somente prolongamentos. Em E12 os prolongamentos celulares presentes na camada intermediária passam a apresentar uma organização radial, sendo este fato mais evidente nas porções ventrais do tecto. Esta organização radial foi vista também em neurônios que expressam NOS. Esta camada intermediária virá a formar as camadas 8, 9, 10 e 11. Em E14, além da camada intermediária, aparece marcação em um compartimento mais externo que deverá formar a camada 7. Em E16 a camada 7 apresenta marcação intensa e a camada intermediária parece se dividir formando dois compartimentos. O mais externo apresenta mais corpos celulares, enquanto o mais interno apresenta, além de corpos celulares, prolongamentos que também começam a se organizar de maneira radial. Este padrão permanece até E20 (Figuras 10 e 11).

15.2 - Experimento II – Avaliação do bloqueio farmacológico da NOS em pintos durante o desenvolvimento

A fim de verificarmos se a droga utilizada para o bloqueio da NOS estava sendo efetiva, utilizamos um controle que permite a detecção do NO. Esse método tem sido descrito na literatura como sendo de grande valia para a detecção de NO em fatias de tecidos. Através deste estudo foi possível observar a produção basal de NO em fatias do tecto óptico de pintos após 1 hora de incubação. Depois de 1 hora do bloqueio farmacológico com 7-NI foi possível notar uma diminuição significativa da intensidade de fluorescência (Figura 12), indicando que ocorre uma queda marcante da produção de NO devido ao 7-NI.

Quanto à ação do 7-NI, observamos que os animais do grupo experimental I, tratados com 7-NI, apresentam pequenas diferenças com relação ao grupo controle I no que diz respeito à expressão de GluR1. Aparentemente ocorre um pequeno aumento da expressão de GluR1 pelos neurônios da camada intermediária (Figura 13). Foram observadas também diferenças em animais do grupo experimental I com relação à expressão de GluR2/3, NOS e $\alpha 8$.

A marcação para GluR2/3 apresentou diferenças nos animais tratados nos estágios E15 e E17 (Figura 14). Aparentemente ocorre, assim como para GluR1, um aumento de células que expressam GluR2/3 nas camadas mais profundas do tecto.

Diferentemente da marcação para os receptores glutamatérgicos, a diferença encontrada para a marcação de NOS para os animais do grupo I parece estar mais relacionada à organização celular do que com o aumento

da expressão propriamente dito, uma vez que os neurônios marcados apresentam-se mais longos e a organização radial desses neurônios é vista mais claramente. Os animais tratados no estágio E16 apresentam a camada mais profunda densa, enquanto os outros apresentam a camada mais alargada, o que poderia até significar um pequeno atraso na organização desta camada (Figura 15).

Houve também diferença em animais tratados em relação à marcação para $\alpha 8$. Os animais de E15 apresentam os prolongamentos da camada intermediária organizados radialmente. Esta organização não se apresenta tão rígida em animais tratados com 7-NI. Além da alteração na organização observada já a partir de estágios mais precoces, observamos que em animais do estágio E17 os prolongamentos celulares dos animais do grupo experimental I são menores do que os observados nos animais controle (Figura 16).

Já nos grupos de animais sacrificados no dia da eclosão (P0), notamos que os animais tratados com 7-NI apresentam pequenas diferenças com relação ao controle no que diz respeito à expressão de GluR1. Nos animais tratados em E17 ocorre aparentemente um discreto aumento de marcação de GluR1 pelos neurônios da camada intermediária do tecto, que nesses animais apresenta-se mais alargada (Figura 17). Também nesse estágio as camadas superficiais se apresentam levemente mais densas, indicando um provável aumento de expressão de GluR1 nessas camadas.

Os animais do grupo experimental II também apresentam diferenças com relação aos animais controle II no que diz respeito à expressão de GluR2/3 e $\alpha 8$, porém, nenhuma diferença foi encontrada quanto à expressão

de NOS (Figura 18). Nos animais tratados com 7-NI em E10, é possível observar um pequeno aumento na expressão de GluR2/3 na camada 13; entretanto, a camada mais profunda apresentou uma diminuição no número de corpos celulares nesses animais (Figura 19). Os animais tratados em E15 e E18 também apresentam diferença na expressão de GluR2/3; nesse caso, porém, essa diferença foi notada somente na camada 13, onde houve diminuição de sua expressão (Figura 20).

A expressão de $\alpha 8$ também apresentou diferença. Animais do grupo experimental II apresentam uma diminuição da expressão de $\alpha 8$ nas camadas intermediárias do tecto óptico, entretanto a organização radial característica dessa camada foi mantida (Figura 21).

15.3- Experimento III – Estudo da morfologia dos neurônios após o bloqueio com 7-NI

Quando avaliamos os animais controle notamos que a marcação para neurofilamentos é mais intensa em animais em estágios mais tardios. Comparando-se animais em estágio E13 com animais no estágio E19, notamos que a marcação com PAN é mais intensa nestes (Figura 22).

Já os animais tratados com 7-NI apresentaram um aumento da marcação para PAN em todas as camadas do tecto, demonstrando maior imunorreatividade às proteínas dos neurofilamentos. Tal aumento foi mais significativo nos animais tratados em E13 do que nos animais tratados em E18 (Figuras 23 e 24).

Os animais tratados com 7-NI apresentaram também maior imunorreatividade para a proteína sinaptofisina quando comparados aos

animais controle (Figura 25). Esse aumento foi mais significativo nas regiões rostro-mediais do tecto óptico.

16 – Discussão

Comparando nossos dados de localização com os estudos de localização de NOS que utilizam a histoquímica da NADPH-diaforase, verificamos que o início da expressão no tecto óptico se dá em E6 (Mc Loon, 1985), que há um aumento da expressão desta enzima no período de E8 a E14, e que passa a diminuir nas camadas superficiais quando o período de desenvolvimento vai chegando ao fim (Willians et al., 1994).

O desenvolvimento de projeções retinotectais em estágios precoces de algumas espécies é muito diferente do padrão adulto. Em estágios precoces do desenvolvimento embrionário de pintos é possível observar padrões semelhantes aos do adulto; entretanto, muitos axônios ainda se projetam para regiões topograficamente inapropriadas no tecto (Mc Loon, 1982, Nakamura & O'Leary, 1989). Segundo Mc Loon (1985) os axônios retinianos chegam ao tecto por volta de E6. Visto que o papel da NOS parece estar relacionado com o refinamento das sinapses, seria esperada ocorrência de um aumento progressivo de NOS na fase seguinte à chegada dos axônios retinianos e do estabelecimento das conexões retinotectais (Wu et al., 2001), como foi por nós observado.

A diferença encontrada para a NOS no Experimento II parece estar relacionada com a organização celular e não com o aumento da expressão propriamente dito. Entretanto o grupo experimental II, em que os animais eram sacrificados em P0, não demonstrou diferença nem em relação ao

aumento da expressão da NOS nem em relação à organização celular (Figura 15).

Sobre as subunidades GluR1 e GluR2/3 (Batista et al., 2002) é interessante destacar que, diferentemente do que ocorre no rato, em que o aparecimento da subunidade GluR1 é mais precoce do que o de GluR2/3, em tecto de pintos a subunidade GluR1 inicia sua expressão em E7, enquanto a subunidade GluR2/3 surge em E5. Isto talvez possa ser explicado pela diferença da velocidade do desenvolvimento das estruturas do tecto óptico de pintos, da duração do processo da migração celular e da camada onde os neurônios completarão seu deslocamento. O aparecimento das subunidades GluR2/3 poderia ainda estar relacionado, neste caso, com um papel de regulação da proliferação celular (Batista et al., 2002), já que as regiões que darão origem a novas camadas apresentam aumento da expressão destas subunidades no período subsequente. Este fato também pode ser verificado na expressão de GluR1, o que poderia sugerir a participação destas subunidades na formação de novas camadas no tecto.

Nos animais tratados com 7-NI a expressão das subunidades GluR1 e GluR2/3 revelou um fato que seria esperado. Por serem estas subunidades relacionadas com a proliferação celular (Batista et al., 2002), uma vez que a NOS estaria bloqueada, estaria também suprimido o seu papel na remodelação sináptica e na perda neuronal; tal fato faria com que o número de células aumentasse e conseqüentemente aumentasse a expressão de GluR1 e GluR2/3, subunidades que antecedem a formação de novas camadas no tecto. Este aumento foi de fato observado, mas pode estar relacionado temporalmente com o período de diferenciação de camadas.

A avaliação do bloqueio da NOS em animais sacrificados em P0 revelou dados interessantes no que diz respeito a essas subunidades. Os dados encontrados para a expressão de GluR1 em animais tratados em E17 corroboram os dados anteriores, entretanto nos animais do grupo experimental I encontramos um pequeno aumento na expressão de GluR2/3 nas camadas mais profundas do tecto. Esse efeito só foi verificado com relação à camada 13, enquanto as camadas mais profundas apresentaram uma diminuição da expressão de GluR2/3. Essa diferença pode ter sido causada por uma reorganização dos receptores, provavelmente uma regulação negativa. É possível que essa reorganização leve algum tempo para acontecer e por isso não tenha sido verificada nos animais que foram sacrificados 24 horas após a aplicação da primeira dose da droga.

Da mesma forma, a expressão de receptores colinérgicos no sistema nervoso central e periférico tem sido estudada por diversos autores utilizando métodos de hibridização *in situ* e de imuno-histoquímica (Role e Berg, 1996; Kaneko et al., 1998; Matter et al., 1990). Estes estudos sugerem que os receptores nicotínicos presentes nas extremidades de neuritos em crescimento teriam papel importante na regulação de eventos durante o desenvolvimento embrionário como crescimento neuronal e seleção de alvo (Role e Berg, 1996). Este papel tem sido especialmente sugerido em relação aos subtipos formados pelas subunidades $\alpha 7$ e $\alpha 8$, inclusive pelo fato dessas subunidades formarem canais altamente permeáveis ao cálcio, que atua como segundo mensageiro em diversos processos neurais. No contexto deste estudo, este fato sugere que o $\alpha 8$ pode estar relacionado com o crescimento de neuritos num processo cálcio-dependente.

A diferença no padrão de expressão de $\alpha 8$ no tecto óptico de animais tratados corrobora dados anteriores. Estudos sugerem que estes receptores (principalmente $\alpha 7$ e $\alpha 8$), localizados nas extremidades de neuritos em crescimento e altamente permeáveis ao cálcio têm papel importante durante o desenvolvimento embrionário no que tange ao crescimento neuronal e seleção de alvos (Role e Berg, 1996). Esse dado, aliado ao fato dos animais tratados apresentarem diminuição na expressão de $\alpha 8$, mas não apresentarem diferença nos prolongamentos celulares (Figura 21), como observado no grupo experimental I, sugere que as diferenças morfológicas que foram encontradas nos animais tratados não permanecem até o nascimento, o que não ocorre com as diferenças encontradas no que diz respeito à expressão de $\alpha 8$. O efeito de bloqueio da NOS parece reforçar ainda mais esta idéia, visto que as alterações encontradas em relação a $\alpha 8$ estão fortemente relacionadas a comprimento de neuritos e sua organização radial no tecto. Entretanto este efeito parece ser indireto, já que os neurônios que produzem NOS não são os mesmos que expressam $\alpha 8$ (Torrão, 2000).

O aumento da imunorreatividade tanto para PAN quanto para sinaptofisina sugere fortemente que há um rearranjo das proteínas estudadas. Um aumento mais acentuado da imunorreatividade para o PAN em E13 do que em períodos mais tardios pode estar relacionado com o período em que se inicia a extensão dos neuritos, ou seja, a partir de E12. Já o aumento de expressão de sinaptofisina em períodos mais tardios do desenvolvimento pode estar relacionado com a falta do refinamento sináptico.

Em resumo, os dados obtidos nesse trabalho reforçam a idéia de que os animais tratados com 7-NI sofrem uma modificação no padrão da

expressão de proteínas neuronais, demonstrando a importância do NO no estabelecimento e manutenção dos circuitos neurais durante o desenvolvimento embrionário de pintinhos.

Referências

- Arai, Y., Mizuguchi, M. & Takashima, S. Developmental changes of glutamate receptors in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Anat. Embryol.* **195**: 65-70, 1997.
- Babbedge, R.C., Bland-Ward, P.A., Hart, S.L., Moore, P.K., Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles, *BR. J. Pharmacol.*, **110**: 225-228, 1993.
- Batista, S.S.; Pires, R.S.; Britto, L.R.G. Differential expression of AMPA- type glutamate receptor subunits during development of the chick optic tectum. *Braz. J. Biol Res*, **35**: 973-978, 2002.
- Bochet, P., Audinat, E., Lambolez, B., Crépel F., Rossier, J., Iino, M., Tsuzuki, K. & Ozawa, S. Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron* **12**: 383-388, 1994.
- Bredt D.S.; Ferris, C.D.; Snyder.S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. *J. Biol. Chem.* **267**: 10976-10981, 1992.
- Bredt D.S.; Hwang, P.M.; Snyder.S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**: 768-770, 1990.
- Bredt D.S.; Snyder.S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9030-9033, 1989.
- Bredt, D.S. ; Snyder, S.H. Isolation of nitric oxide mediates enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 682-685, 1990.
- Burlet,S., Leger,L., Crespuglio, R., Nitric oxide and sleep in the rat: a puzzling relationship *Neurosc.* **92** :627-639, 1999.
- Caiedo, A e Ebalyn, M. Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. *Eur.J. Neurosci.* **11**:51-74, 1999.

- Cajal, S.R. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris: Maloine, 1911. 2v.
- Chen, C., Tonegawa, S. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning and memory in the mammalian brain *Annu. Rev. Neurosci.* **20**: 157-184, 1997.
- Conroy, W.G., Berg, D.K. Nicotinic receptor subtypes in the developing chick brain: appearance of a species containing the $\alpha 4$, $\beta 2$ and $\alpha 5$ gene products. *Mol. Pharmacol.* **53** :392-401, 1998.
- Contestabile, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development, *Brain Res. Rew*, **32**:476-509, 2000.
- Cowan, W.M.; Martin, A.H.; Wenger, E. Mitotic patterns in the optic tectum of the chick during normal development and after early removal the optic vesicle. *J.Exp.Zool* **169**, 1968.
- Cramer, K.S., Leamey, C.A., Sur, M. Nitric oxide as a signaling molecule in visual system development, *Progr. Brain. Res.* **118**: 101-114, 1998.
- Dawson, T.M.; Dawson, V.L. Nitric oxide: Action and pathological roles: *The neuroscientist*, **1**: 7-18, 1995.
- Dev, K.K., Morris, B.J. Modulation of AMPA binding sites by nitric oxide. *J. Neurochem.* **63**: 946-52, 1994.
- Dusse, L.M.S.; Vieira, L.M.; Carvalho, M.G. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **39**: 343-50, 2003.
- Dzoljc, M.R., Vries, R., van Leeuwen, R., Sleep and nitric oxide effects of 7-nitro indazole, inhibitor of brain nitric oxide synthase *Brain Res.* **718**:145-150, 1996.
- Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E. & Heinemann, S. Alpha-9-An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, **4**: 705-715, 1994.

- Ferrendelli, J.A. et al., Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. *J. Neurochem.* **22**: 535-40, 1974.
- Gardino, P.F., Schmal, A.R., Calaza, K.C., Identification of neuron with acetylcholinesterase and NADPH-diaforase activities in the centrifugal visual system of the chick. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **72** 267-273, 2004.
- Gillian, A.M.; Brion, J.P.; Breen, K.C. Expression of the neural cell adhesion molecule in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration*, **3**:283-291,1994.
- Green L.C. et al. Nitrate synthesis in germfree and conventional rat. *Science* **212**: 56-8, 1981b.
- Green L.C. et al., Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 7764-8, 1981a.
- Hamburger, V. ; Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 49-92, 1951.
- Haul, S., Godecke, A., Schrader, J., Hass, H.L., Luhmann, H.J., Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase, *J. Neurophysiol.*, **81**: 494-497, 1999.
- Heggest, E. e Shiload, J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin. Acta* **125**:107-42, 1982.
- Hibbs, J.B.; Vaurin, Z.; Tarinton, R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* **138**: 550-65, 1987.
- Holscher, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity, *Trends Neurosci.* **20**: 298-303, 1997.
- Insel, T. R., Miller, L. P. & Gelhard, R. E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrains-I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* **35**: 31-43, 1990.

- Jonas, P., Racca, C., Sakmann, B., Seeburg, P. e Monyer, H. Differences in Ca permeable AMPA- type glutamate receptor channels in neurocortical neurones caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* **12**: 1281-1289, 1994.
- Kalb, R. G. ; Agostini, J. Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development. *Neuroscience*, **57**: 1-8, 1993.
- Kaneko W.M., Britto, L.R.G., Lindstrom, J.M., Karten, H.J. Distribution of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in the developing chick cerebellum. *Dev. Brain Res.* **105**: 141-145, 1998.
- Katsuki et al., Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic. Nucleotide Res.*, **3**:23-5, 1977.
- LaVail, J.H.; Cowan, W.M., The development of the chick optic tectum I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Br. Res.* **28**:391-419, 1971.
- Lei, S.Z., Pan, Z.H., Aggarwal, S.K., Chen H.S.V., Hartman, J., Sucher, N.J., Lipton, S.A. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of NMDA receptor-channel complex. *Neuron* **8**: 1087-99, 1992.
- Lindstrom, J. Purification and cloning of nicotinic acetylcholine receptors. In Arneric S.P. and Brioni, J.D. (Eds). *Neuronal Nicotinic Receptors: Pharmacology and therapeutic Opportunities*. New York: Wiley-Liss, 1998, p3-33.
- Lindstrom, J., Schoepfer, R., Conroy, W.G., Whiting, P. Structural and functional heterogeneity of nicotinic receptors. In *The Biology of Nicotine Dependence*. Ciba Foundation Symposium 152. New York: John Wiley, 1990, p43.

- Martin, L. J.; Furuta, A. & Blackstone, C. D. AMPA receptor protein in developing rat brain: Glutamate receptor-1 expression and localization change at regional cellular, and subcellular levels with maturation. *Neuroscience*, **83**: 917-928, 1998.
- Matter-Sadzinski, L., Ballivet, M. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes in developing chick visual system, *EMBO J.* **9**: 1021-1026, 1990.
- Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R. Sequence and expression of a metabotropic receptor. *Nature*, **349**: 760-5, 1991.
- Mayer, M.L. & Westbrook, G.L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **28**: 197-276, 1987.
- Mayer, M.L.; Westbrook, G.L.; Guthrie, P.B. Voltage-dependent block Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature*, **309**: 261-3, 1984.
- McGraw, C.F., McLaughlin, B.J. Fine structural studies of synaptogenesis in the superficial layers of chick optic tectum *Neurocytol.* **9**: 79-93, 1980.
- McLoon, S.C. Alterations in precision of the crossed retinotectal projection during chick development. *Science* **215**: 1418-1420, 1982.
- McLoon, M.C. Evidence for shifting connections during development of the chick retinotectal projection. *J. Neurosci.* **5**: 2570-2578, 1985.
- Mey, J.; Thanos, S. Development of the visual system of the chick - I. Cell differentiation and histogenesis *Brain Research Reviews*, **32**: 343-379, 2000.
- Miki, N. et al., Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**: 851-6, 1977.
- Mize, R.R., Banfro, F.T., Scheiner, C.A. Pre and postnatal expression of amino acid neurotransmitters, calcium binding proteins and nitric oxide synthase in the developing superior colliculus *Prog. Brain Res.* **108**: 321-330, 1996.

- Monaghan, D. T., Holets, V. R., Tov, D. W. & Cotman, C. W. Distribution of [3H]Kainic acid binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. *Brain Res.* **324**: 160-164, 1984.
- Monaghan, D.T., Bridges, R.J., Cotman, C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **29**: 365-402, 1989.
- Moncada, S., Palmer, R.M, Higgs, E.A. Nitric Oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**:109-142, 1991.
- Mori, H.; Mishina, M. Review: Neurotransmitter receptors VIII, structure and function of NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, **34**:1219-1237, 1995.
- Nakamura H, O Leary, D.D.M Inaccuracies in initial growth and arborization of chick retinotectal axons followed by course corrections and axons remodeling to develop topographic order. *J. Neurosci.* **9**:3776-3795, 1989.
- Nakamura H., Ichijio, H., Kobayashi, T. Differentiaton of avian retinotectal projection *Neurosci. Res.* **13**: S18-23, 1990.
- Nakanishi, N., Axel, R., Shneider, N.A., Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl –D- aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 8552-65, 1992.
- Nakanishi, N., Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, **258**:597-603, 1992.
- Norris, P.J.: Faull, R.L.M.; Emson, P.C. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA expression and NADPH-diaphorase staining in the frontal cortex, visual cortex and hippocampus of control and Alzheimer's disease brains. *Mol. Br. Res.* **41**:36-49, 1996.

- Ozawa, S., Kamiya, H. & Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **54**: 581-618, 1998.
- Paes de Carvalho, R., de Faria, M.H.; do Nascimento, J.L.M.; Hokoç, J.N. Development of NADPH-diaforase in the Avian Retina: Regulation by Calcium Ions and Relation to Nitric Oxide Synthase. *Journal of Neurochemistry* **67**: 1063-1071, 1996.
- Palmer, R.M.J.; Ashton, D.S., Moncada, S., Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. regulation of blood pressure, *Nature*, **333**: 664-8, 1988.
- Paperna, T., Lamed, Y. & Teichberg, V. I. cDNA cloning of chick brain α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors reveals conservation of structure, function and post-transcriptional processes with mammalian receptors. *Mol. Brain Res.* **36**: 101-113, 1996.
- Pires, R.S., Ferro, E.S., Britto, L.R.G. Expression of the AMPA-type glutamate receptor subunits in the chick optic tectum changes biphasically after retinal deafferentation. *Brain Res.* **810**: 283-7, 1998.
- Posada, A, Clarke, P.G. Role of nitric oxide in fast retrograde signal during development *Dev. Brain Res.* **114**: 37-42, 1999.
- Prast H e Philippu, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*, **64**: 51-68, 2001.
- Pugh, P.C. & Berg, D.K. Neuronal acetylcholine receptors that bind α -bungarotoxin mediate neurite retraction in a calcium-dependent manner. *J. Neurosci.*, **14**: 889-896, 1994.
- Rapoport R.M e Murad F. Agonist induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ Res*, **52**: 352-7, 1983.
- Ríos, H., López-Costa, J.J.; Fossr, N.S. *Develop. Br. Res.* **120**: 17-25, 2000.

- Robello, M., Amico, C., Cupello, A., Rapalino, M.V., Thellung, S. Nitric oxide and GABA A receptor function in the rat cerebral cortex and cerebellar granule cells. *Neuroscience* **74**:99-105, 1996.
- Role, L.W. diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors channels. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2**: 254-62, 1992.
- Role, L.W. e Berg, D.K. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses, *Neuron*. **16**: 1077-1085, 1996.
- Sargent, P. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann. Rev. Neurosc.*, **16**: 403-43, 1993.
- Schilling, K., Schmidt, H.H., Baader, S.L. Nitric oxide synthase expression reveals compartments of cerebellar granule cells and suggests a role for mossy fibers in their development, *Neuroscience* **59**: 893-903, 1994.
- Schmid, K.W., Schroeder, S., Dockhorn-Dworniczak, B., Bikirschmair, R., Bocker, W., *Mod. Pathol.* **7**: 347-53, 1994.
- Schmidt, H.H.H.W. e Walter, U. NO at work. *Cell* **78**: 919-25, 1994.
- Schmidt, M. et al., *Am. J. Pathol.* **139**: 53, 1991.
- Schoepfer, R., Conroy, W.G., Whiting, P., Gore, M. & Lindstrom, J. Brain α -bungarotoxin binding protein cDNAs and mAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron*, **5**: 35-48, 1990.
- Schroeder, h., Zille, K., Maelicke, A., Hajos, F. Immunohisto- and cytochemical localization of cortical nicotinic cholinergic receptors in rat and man. *Brain Res.*, **502**:287-95, 1989.
- Schultz, K.D. et al., Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMPc in rat ducts deferent. *Nature*, **265**:750-1, 1977.

- Scicolone, G., Pereyra-Alfonso, S., Brusco, A. Pecci-Saavedra, J., Flores, V. Development of the laminated pattern of the chick tectum opticum. *Int. J. Dev. Neurosci.* **13**(8):845-58, 1995.
- Silveira dos Santos Bredariol, A e Kamassaki-Britto, D.E. Ionotropic glutamate receptors during the development of chick retina. *J. Comp. Neurol.* **441**: 58-70, 2001.
- Snyder, S.H. e Bredt D.S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American* **28**: 35, 1992.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Köhler, M., Takagi, T., Sakman, B. & Seeburg, P. H. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* **249**: 1580-1585, 1990.
- Stuehr D.J. e Marletta, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia Coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:7738-42, 1985.
- Tanaka, M., Yoshida, S., Yano, M. Hanaoka, F. Roles of endogenous nitric oxide in cerebellar cortical development in slice cultures, *NeuroReport* **5**: 2049-2052, 1994.
- Thanos, S., Bonhoeffer, F. Axonal arborization in the developing chick retinotectal system. *J. Comp. Neurol* **261**:155-164, 1987.
- Theiss, C., Hellmann, B., Güntürkün, O. The differential distribution of AMPA-receptor subunits in the tectofugal system of the pigeon. *Brain Res.*, **785**:114-28, 1998.
- Torrão, A.S.; Carmona, F.M.M.; Lindström, J.; Britto, L.R.G. Expression of cholinergic system molecule during development of the chick neurons system. *Development Brain Research*, **124**:81-92, 2000.

- Virgili, M.; Monti, B.; LoRusso, A; Bentivogli, M; Contestabile, A. Development effects of *in vivo* and *in vitro* inhibition of nitric oxide synthase in neurons. *Brain Research*, **839**: 164-172,1999.
- Williams, C.V., Nordquist, D.; Mc Loon, S.C. Correlation of oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system. *J. Neurosci* **14**: 1746-1755, 1994.
- Wu H.H., Selski, D.J.; El-Fakahany, E.E.; McLoon, S.C. The role of nitric oxide in development of topographic precision in the retinotectal projection of chick. *J. Neurosci*, **21**: 4318-4325, 2001.
- Wu H.H.; Williams, C.V.; McLoon, S.C. Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. *Science* **265**: 1593-1596,1994.
- Zoli, M., Le Novère, N., Hill Jr., J.A. & Changeux, J.P. Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.*, **15**: 1912-1939, 1995