

- Desenvolvimento Neural

01.001

O AUMENTO NA SOBREVIDA DAS CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA INDUZIDO PELA IL-2 INDEPENDE DOS RECEPTORES TRK. Souza, L. O. J.; Araújo, E. G. Neurobiologia UFF

Objetivo:

A interleucina 2 modula importantes fenômenos nas células nervosas tais como sobrevivência e diferenciação. O objetivo do nosso trabalho é analisar as vias de sinalização envolvidas no efeito trófico da IL-2 sobre as células ganglionares da retina.

Métodos e Resultados:

24 horas após o nascimento, ratos Lister Hooded receberam injeções de HRP (30% em DMSO2%) nos colículos superiores. Após 16 horas, os animais foram sacrificados, suas retinas dissecadas em solução salina sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , dissociadas quimicamente e mecanicamente e plaqueadas em lamínulas previamente tratadas com p-L-o (50 μ g/ml), na densidade de $1,0 \times 10^5$ cels./cm². As culturas foram incubadas por 2-4h na presença de meio de cultura completo. Após este período, as lamínulas correspondentes ao controle de 100% da população de CG foram fixadas em aldeídos e as demais receberam tratamento com as drogas a serem testadas. A revelação da HRP foi feita por reação histoquímica, que utiliza a tetrametilbenzidina como cromógeno. O n^o de CG foi obtido por contagem em microscopia de campo claro com aumento de 400X. Resultados prévios do laboratório demonstraram que a IL-2 aumenta a sobrevivência das células ganglionares de maneira dose-dependente. O melhor efeito (100% de sobrevivência) foi obtido com 50U/mL. Todavia não foi abolido pela inibição dos receptores M1 e nem pela inibição da proliferação celular (Sholl-Franco et al., 2001, NeuroReport v.12, p.109-112). Prosseguindo nossos estudos analisamos se o efeito da IL-2 dependia da ativação dos receptores de alta afinidade para as neurotrofinas (Trk). Utilizamos K252a (50nM) e observamos que esta droga não foi capaz de reverter o efeito da IL-2.

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que a IL-2 esteja mediando o aumento da sobrevivência das células ganglionares de forma independente da atividade colinérgica, da proliferação celular e da ativação dos receptores de alta afinidade para as neurotrofinas.

01.002

EFEITO MITOGÊNICO DE ATP EM CÉLULAS DE RETINA EM CULTURA: MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE RECEPTORES PURINÉRGICOS POR MEIOS CONDICIONADOS DE CÉLULAS MAIS DIFERENCIADAS. França, G. R.; Ventura, A. L. M. Neurobiologia UFF

Objetivo:

ATP, através da ativação de receptores P2Y1, PKC e MAP cinases é capaz de induzir a proliferação de células da retina de pinto em cultura (Intl. J. Dev. Neurosci. 20: 21-27, 2002). Neste trabalho, investigamos se populações celulares mais diferenciadas modulam a sinalização mediada por receptores de nucleotídeos envolvidos na proliferação durante o desenvolvimento nestas células.

Métodos e Resultados:

O tratamento de células de retina embrionária com 7 dias (E7) com ATP 0.1mM induziu um aumento de ~100% na incorporação de [³H]-timidina, sendo este efeito dependente do estágio embrionário e do tempo de cultivo das células. Inibição da proliferação induzida por ATP foi observada quando células de retinas de embriões em E7 e E9 foram cultivadas conjuntamente, um efeito que foi dependente da densidade de células em E9. O tratamento de células em E7C1 com meios condicionados (MC) de culturas mais diferenciadas (E7C2, E8C2, E8C8 e glia) foi capaz de inibir, de maneira dependente da dose, a proliferação induzida por ATP. A retirada de MC seguida por cultivo das células em meio fresco reverteu a inibição, fazendo com que as células voltassem a incorporar [³H]-timidina. A diálise do MC para retirada de moléculas \leq 12KDa não reverteu a inibição da proliferação dependente de ATP observada em meios não dialisados. Além disto, o tratamento de culturas com MC bloqueou o acúmulo de [³H]-fosfoinositídeos induzido por ATP 0.1mM, sendo este efeito inibido pelo antagonista PPADS 0.1mM.

Conclusões: Nossos dados sugerem que a proliferação celular induzida por ATP seja dependente do estágio de desenvolvimento da retina e que, durante a diferenciação das células, fatores (>

12KDa) capazes de inibir a ativação de receptores P2Y1 por ATP sejam liberados. É possível que a resposta proliferativa ao ATP diminua durante o desenvolvimento através da dessensibilização e/ou inibição da transcrição de receptores P2Y1 neste tecido.

01.003

ATIVIDADE SEROTONINÉRGICA AUMENTA A SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA *IN VITRO* ATRAVÉS DA LIBERAÇÃO DE NEUROTROFINAS: EFEITO MEDIADO PELA INTERLEUCINA-4. ¹Santos, R. C. C. ²Araújo, E. G.; ¹IBCCF-UFRJ; ²Neurobiologia UFF

Objetivo:

Neurônios e células gliais produzem citocinas que regulam a sobrevivência, a diferenciação neuronal, o crescimento neurítico, a síntese e a liberação de neurotransmissores. Nosso objetivo foi investigar a relação entre o efeito da IL-4 na sobrevivência das células ganglionares da retina (CGRs) e a ativação de receptores para serotonina e neurotrofinas.

Métodos e Resultados:

Utilizamos ratos neonatos da linhagem Lister Hooded. Após 16h da injeção de HRP nos colículos superiores, as retinas foram dissecadas, tratadas com tripsina 0,1%, trituradas com pipeta Pasteur de ponta afilada e as células plaqueadas em meio 199 completo, em laminulas de vidro tratadas previamente com 50 µg/mL de poli-L-ornitina. Após 48h foi feita a revelação da HRP, as laminulas foram montadas em lâminas de vidro e foi feita uma contagem sistemática num aumento de 400X. Nossos dados mostraram que o inibidor de receptores 5HT-4 (SDZ 205557, 50 µM) bloqueia a sobrevivência das CGRs induzida pela IL-4 (5U/mL). O agonista de receptores 5HT-4 (5-metoxitriptamina hidrocloreto, 15 µM), assim como, doses sub-ótimas do agonista (7,5 µM) mais doses sub-ótimas de IL-4 (0,5 U/mL), mimetizaram o efeito da IL-4 (5U/mL) aumentando a sobrevivência das CGRs. O bloqueio da liberação de polipeptídeos promovida pela brefeldina A, assim como, o bloqueio de receptores Trk, inibiu completamente a sobrevivência das CGRs promovida pela IL-4. A utilização de concentrações sub-ótimas de BDNF (10ng/mL) e IL-4 (0,5 U/mL) conjuntamente foi capaz de aumentar a sobrevivência das CGR após 48 horas, já o NGF não foi capaz de obter o mesmo efeito.

Conclusões:

Nossos dados indicam que o efeito da IL-4, no aumento da sobrevivência das células ganglionares da retina, seja mediado pela liberação de serotonina e conseqüente ativação de receptores 5HT-4, que aumentam os níveis intracelulares de AMPc e que esse efeito é mediado pela liberação de neurotrofinas em nossas culturas. Nossos experimentos indicam que uma das possíveis neurotrofinas envolvidas, seja o BDNF. Esses dados demonstram que a atividade de neurotransmissores na retina durante o desenvolvimento pode estar diretamente ligada à presença e liberação de citocinas nesse período.

01.004

EFEITO TEMPORAL DO FGFb SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DA RETINA DE RATOS NEONATOS MANTIDAS EM CULTURA. Silva, G. M; Guillarducci-Ferraz, C. V. V.; Araújo, E. G. Neurobiologia UFF

Objetivo:

O FGFb é uma citocina capaz de regular a migração, a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência de diferentes tipos celulares, incluindo os neurônios. Este fator trófico está presente no tecido retiniano e tem sido demonstrado o seu papel em diversas etapas da formação e maturação da retina. O objetivo deste trabalho foi estudar a responsividade das células da retina ao FGFb em diferentes intervalos de tempo.

Métodos e Resultados:

Células da retina de ratos recém natos, da linhagem Lister Hooded, foram dissociadas e plaqueadas na densidade de $1,25 \times 10^5$ céls/cm² sobre placas de Petri de 35mm, previamente tratadas com poli-L-ornitina 50 µg/mL. O FGFb foi adicionado em diferentes períodos de tempo, de acordo com o experimento realizado. Seu efeito sobre a proliferação celular foi avaliado por incorporação de [³H]-timidina (0,5 µCi/placa). Nossos resultados demonstram que o FGFb induz um significativo aumento na proliferação das células da retina de forma dose e tempo dependentes. FGFb 25ng/mL induziu um aumento de 100% enquanto o FGFb 50ng/mL induziu

efeito máximo (aproximadamente 150% de aumento). O tratamento de culturas mais velhas (5 dias) com FGFb 25ng/mL igualmente apresentou um aumento expressivo na proliferação celular (100% de aumento) após 48h na presença desta citocina. O tratamento com FGFb nas primeiras 24h não é capaz de induzir aumento na proliferação após 48h. Entretanto o tratamento após 24 induz o mesmo efeito que o tratamento crônico por 48h.

Conclusões:

Os resultados mostram que o FGFb aumenta a proliferação de células da retina de forma dose e tempo dependente e que existem células responsivas ao FGFb ao longo do desenvolvimento das células em cultura. Entretanto, é necessário que esta citocina seja mantida por todo o tempo em cultura.

01.005

TRANSDUÇÃO DE SINAL MEDIADA POR AGONISTAS PURINÉRGICOS P2 NA RETINA DE PINTO EM DESENVOLVIMENTO. ¹Nunes, P. H. C.; ²Albuquerque, L. M. D.**; ¹Ventura, A. L. M. ¹Neurobiologia UFF; ²Fisiologia e Farmacodinâmica, IOC-FIOCRUZ

Objetivo:

Dados recentes do nosso grupo sugerem que ATP e ADP, mas não UTP, estão envolvidos na regulação da proliferação celular da retina de embrião de pinto através da ativação da PKC e da via das MAP cinases. No presente estudo, investigamos o efeito de ADP e UTP no acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos (InsPs) e na ativação da via das ERKs na retina embrionária.

Métodos e Resultados:

Retinas de embriões de pinto foram utilizadas na determinação do acúmulo de [³H]-InsPs e na detecção de ERKs fosforiladas (Western Blot) induzidos por ATP, ADP ou UTP. Todos os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes em duplicata. ATP, ADP e UTP induziram um aumento do acúmulo de [³H]-InsPs dependente da dose (% controle; EC₅₀ mMol/L: 548 ± 20,5; 0,18; 314 ± 53,85; 0,51; 704 ± 139,9; 0,018). A resposta ao ADP, mas não ao ATP ou UTP, foi totalmente bloqueada por PPADS e suramina. Todas as respostas diminuíram com a diferenciação da retina. ATP, ADP e UTP aumentaram a taxa de fosforilação de ERKs na retina em E8 (% controle: 174±16; 199±16,4 e 206±37). As respostas ao ADP e ao UTP foram dependentes do tempo e da dose (pico: 5 minutos; EC₅₀ mMol/L: 0,21; 0,043). Ao contrário do observado com UTP, a resposta ao ADP foi completamente bloqueada por PPADS, U73122 e queleritrina. Herbimicina A também não bloqueou a resposta ao UTP. A ativação com ATP e ADP, mas não UTP permitiu a detecção de ERKs fosforiladas em frações nucleares após 5 minutos de estímulo.

Conclusões:

ATP, ADP e UTP induzem o acúmulo de [³H]-InsPs e a fosforilação de ERKs na retina embrionária de pinto. Os resultados obtidos com UTP sugerem a existência de uma via de ativação das ERKs independente de fosfolipase C, PKC e Src e que não está envolvida no fenômeno de proliferação. A detecção de Erks em frações nucleares sugere que o tráfego destas proteínas pode ter participação no fenômeno da proliferação induzido por ATP e ADP.

01.006

EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE O TRANSPORTE DE [¹⁴C] ÁCIDO ASCÓRBICO EM FATIAS HIPOCAMPAIS DE RATOS WISTAR. ¹Siqueira, I. R.; ²Godinho, G.*; ²Battu, C. E.**; ²Wofchuk, S. T.; ²Souza, D. O.; ²Netto, C. A. ¹Ciências Fisiológicas UNIVATES; ²Bioquímica UFRGS

Objetivo:

Resultados obtidos no nosso laboratório corroboram os estudos que sugerem que o estresse oxidativo está envolvido no envelhecimento cerebral. Foi observada uma redução da capacidade antioxidante total em homogeneizados de estruturas cerebrais de ratos de 20 meses, esta diminuição pode estar relacionada à diminuição no conteúdo de ácido ascórbico (AA). A fim de investigar se o envelhecimento é acompanhado de alterações no transporte de ácido ascórbico em células hipocampais, avaliamos a captação de [¹⁴C]- ácido ascórbico.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos Wistar machos de diferentes idades (4, 12 e 24 meses). Os animais foram decapitados, os cérebros rapidamente removidos e os hipocampus dissecados e

seccionados em fatias transversais. As fatias foram incubadas em meio de incubação contendo [¹⁴C]AA durante 60 minutos a 37°C. O tampão foi aspirado e foram realizadas três lavagens com tampão gelado. Após, as fatias foram lisadas e alíquotas do lisado foram usadas para determinar o conteúdo intracelular de [¹⁴C]AA utilizando um contador de cintilação. A captação de [¹⁴C]AA independente de sódio foi determinada através da incubação com N-metilglucamina ao invés de NaCl. A captação de [¹⁴C]AA obtida em fatias de animais jovens foi tomada como 100%. As fatias hipocâmpais obtidas de ratos de 11 e de 24 meses apresentaram menores níveis (de cerca de 40%) de captação de ácido ascórbico.

Conclusões: Os resultados demonstram uma redução da captação de ácido ascórbico hipocâmpal, que pode, pelo menos em parte, explicar a diminuição da capacidade antioxidante total nesta estrutura. Estes eventos podem ser relevantes no processo de envelhecimento celular e podem estar envolvidos na susceptibilidade a doenças neurodegenerativas relacionada ao envelhecimento.

01.007

ANATOMIA DOS CIRCUITOS DO CÓRTEX VISUAL DO GAMBÁ NO MOMENTO DA ABERTURA DOS OLHOS, REVELADA POR MOLÉCULAS DE CARBOCIANINA. Furtado, D. A.; Lent, R. Anatomia ICB-CCS UFRJ

Objetivo:

Carbocianinas são moléculas fluorescentes que se difundem pelas membranas celulares dos neurônios revelando a morfologia das conexões estabelecidas pelo local de inserção do corante. Estes corantes foram empregados com o objetivo de documentar a morfologia das conexões do córtex visual de gambás no momento da abertura dos olhos, quando a informação luminosa do meio-ambiente passa a influenciar a morfofisiologia das células e dos circuitos.

Métodos e Resultados:

Foram inseridos um ou três cristais de carbocianina (Dil) em cada um dos seguintes locais: no córtex estriado, no córtex periestriado anterolateral, na borda entre estes ou na linha média da comissura anterior. Com o uso de câmara-clara foram obtidos diversos desenhos da morfologia das conexões: 1- morfotipos neuronais nas camadas das áreas marcadas; 2- fragmentos de axônios individuais; 3- setores corticais marcados; 4- cortes coronais contendo a distribuição dos corpos celulares; e 5- cortes coronais com a marcação reconstituída por inteiro. A partir destes desenhos foram elaborados mapas da superfície do córtex contendo a distribuição das células e das projeções. Em cada cérebro pode-se obter esta diversidade de dados morfológicos e ainda preservar suas relações naturais de proporção.

Conclusões:

Uma nova área visual foi identificada (periestriada anteromedial), outras foram topograficamente redefinidas (periestriada posterolateral, periestriada medial), ou subdivididas (periestriada anterolateral). A distribuição laminar e tangencial dos axônios e dos neurônios possibilita: a análise da organização topográfica das conexões visuais; a elaboração de um mapa de parcelamento das áreas visuais, cujos limites preservam as relações topográficas naturais e a interpretação das relações de hierarquia funcional entre as áreas. Os resultados também podem ser interpretados fisiologicamente, no que se refere ao fluxo da informação no sistema nervoso, e sob a perspectiva da evolução da organização morfológica do córtex de mamíferos.

01.008

ANÁLISE QUALITATIVA DE MARCADORES MOLECULARES NA SVZ DE RATOS NEONATOS. Pimentel-Coelho, P. M.; Mendez-Otero, R.; Santiago, M. F. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Estudos recentes demonstraram a existência de células-tronco, capazes de gerar neurônios e células gliais na zona subventricular (SVZ) de mamíferos adultos. Algumas dessas células expressam o gangliosídeo 9-O-acetil GD3, um glicosíngolípido de membrana, expresso no SNC principalmente durante o desenvolvimento. O objetivo desse trabalho é caracterizar a expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 na SVZ de ratos neonatos, observando as diferentes populações celulares das regiões que a compõem e as mudanças que ocorrem ao longo do desenvolvimento pós-natal.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos Lister em quatro idades: no dia do nascimento (P0), P4, P7 e P14. Os cérebros foram fixados por perfusão transcardíaca com paraformaldeído 4%, cortados em criostato e submetidos a reações de imunohistoquímica para vários marcadores. Alguns animais receberam injeções intracerebroventriculares (ICV) do anticorpo monoclonal anti-9-O-acetil GD3 (Jones) 2h antes do sacrifício. Em P0 encontramos uma intensa marcação de 9-O-acetil GD3 na SVZ, que diminuiu progressivamente em P4, P7 e P14, o que pretendemos quantificar por citometria de fluxo. Nos animais que receberam a ICV de Jones, as células apresentaram uma marcação mais intensa, delineando o corpo celular e alguns prolongamentos. Em seguida, analisando a expressão de GFAP, marcador astrocitário e de células-tronco da SVZ de ratos adultos, observamos que, de P0 a P14, sua expressão está mais restrita à SVZ posterior, enquanto há expressão de 9-O-acetil GD3 por toda a SVZ, não havendo aparente colocalização entre esses dois marcadores. O gangliosídeo parece ser expresso mais intensamente nas extremidades anterior e posterior da SVZ e, em cortes horizontais, notamos uma diferença no padrão de sua expressão, ao comparamos as porções anterior e posterior da SVZ.

Conclusões:

Nossos resultados demonstram que a redução progressiva na expressão de 9-O-acetil GD3 na SVZ ocorre nas primeiras semanas após o nascimento. A ausência de co-localização de GFAP e 9-O-acetil GD3 sugere que a população de células-tronco presentes na SVZ de ratos adultos difere daquela presente nas primeiras semanas pós-natais. Por fim, nossos dados corroboram a teoria de que há diferenças entre as porções anterior e posterior da SVZ de ratos neonatos.

01.009

POSTNATAL MATURATION OF THE RAT'S PRIMARY SOMATOSENSORY CORTEX (S1) AS REVEALED BY THE *VICIA VILLOSA* LECTIN. ¹Bahia, C. P.; ²Houzel, J. C.; ³Diniz, C. W. P.; ¹Pereira Júnior, A. ¹Fisiologia UFPA; ²Anatomia, UFRJ; ³Morfologia UFPA

Objetivo:

The lectin *Vicia villosa* agglutinin (VVA) selectively recognizes N-acetylgalactosamine-terminal glycoconjugates that form perineuronal nets around select neurons in the central nervous system. These structures are thought to play a role as recognition molecules for incoming axon terminals. In the present work, we examined the labeling pattern of VVA during the postnatal development of the S1 in rats, with special emphasis on the period around the formation and maturation of the barrels in layer IV.

Métodos e Resultados:

Wistar rats (n=30) of different postnatal ages (P3, P5, P10, P17, P24, P30 and P>60) were deeply anesthetized and perfused transcardially with PBS 0.1M followed by 4% paraphormaldehyde. After craniotomy, the cerebral hemispheres were flattened and cut in 100µm sections. The tangential sections were then incubated in a PBS solution containing 0.5% biotinylated *Vicia villosa* (Vector) and 6% Triton X-100 (Sigma) for 16 hours, under constant agitation and at room temperature. The presence of biotin in the tissue was revealed using the ABC kit (Vector) and DAB (Sigma), as a chromogen. Next, all cells located in S1 were plotted, in each section, with the help of the Neurolucida System. After the fifth postnatal day, the VVA binds diffusely to the neuropil in S1. The perineuronal nets around cells in the barrel cortex are labeled by the VVA only after the second postnatal week. In the PMBSF, labeled cells were located preferentially in the septa between barrels.

Conclusões:

Since the binding sites for VVA appear previously to the formation of the barrel-field, in the neuropil, and labeled cells arise only later, we hypothesize that the glycoconjugates forming perineuronal nets might be involved in signaling the synaptic targets of incoming thalamic afferents in the barrel cortex as well as in the later stabilization of the formed synapses.

01.010

9-O-ACETYL GD3 AND ADHESION MOLECULES: A SPATIAL AND FUNCTIONAL CO-LOCALIZATION? Lima, V. B. C. D.; Nascimento, I. C. C. d.; Santiago, M. F.; Mendez-Otero, R. Biofísica UFRJ

Objetivo:

During development of the central nervous system, postmitotic neurons undergo a marked migration toward their final position. This migration process is a complex developmental program involving a series of steps including cell-cell recognition, cell-cell adhesion and cell motility. There are some evidences that the mechanisms underlying neuronal migration and other directional movements such as axonal pathfinding are similar. Some adhesion/migration-related molecules had their expression characterized in regions of cell migration and neurite outgrowth during the development of the nervous system. One of these molecules is recognized by a monoclonal antibody named Jones (mAb Jones) and was identified as the ganglioside 9-O-acetyl GD3. Some experiments have shown that gangliosides are important components of membrane rafts, where they can mediate important physiological functions such as cell adhesion and signal transduction events and consequently affect cellular phenotypes and functions. In addition, several studies have shown the association of gangliosides with integrins and their ability to modulate integrin function. Previous studies in our laboratory have shown that dorsal root ganglia growth cones collapse after few minutes of treatment treated with mAb Jones and that the 9-O-acetyl GD3 ganglioside co-localizes with focal adhesion proteins during the extension of these growth cones. Furthermore, it was also shown that the ganglioside 9-O-acetyl GD3 has a crucial role in the migration of granule cells precursors in the post-natal cerebellum.

The objective of the present work is to evaluate the involvement of 9-O-acetyl GD3 in processes related to adhesion events during the radial neuronal migration of the postmitotic granular cells in the developing cerebellum.

Métodos e Resultados: To analyze the ganglioside 9-O-acetyl GD3 distribution and its interaction with integrin receptors we used cerebellar explants from P7 rats. Immunocytochemical experiments were made using mAb Jones against the ganglioside 9-O-acetyl GD3, the B-subunit of Cholera toxin to recognize GM1 and a polyclonal antibody against the $\beta 1$ -integrin receptor. All microscopy analysis was made under a LSM 510 Meta confocal microscope. During the migration of granular neurons from the P7 explants we observed a significant co-localization of the ganglioside 9-O-acetyl GD3 and $\beta 1$ -integrin, whereas there was no co-localization of 9-O-acetyl GD3 and GM1. In other set of experiments we did not find any co-localization of $\beta 1$ -integrin and GM1.

Conclusões:

These results suggest a possible localization/function of 9-O-acetyl GD3 in glycosynapses, a specific lipid raft related to glycosil compounds and adhesion signaling events. The absence of co-localization between GM1 and $\beta 1$ -integrin/9-O-acetyl GD3 suggest that the glycosynapses in migrating neurons are different (at least in their molecular content) from the regular lipid rafts.

01.011

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE METALOPROTEASES NO SISTEMA VISUAL DE ROEDORES DURANTE O DESENVOLVIMENTO. ¹Oliveira-Silva, P.; ²Jurgilas, P. B.; ¹da Rocha, R. F. D. B*; ¹Ventura, A. L. M.; ³Savino, W.; ¹Serfaty, C. A.; ¹Neurobiologia UFF; ²Fisiologia e Farmacodinâmica FIOCRUZ; ³Imunologia FIOCRUZ

Objetivo:

Durante o período pós-natal do desenvolvimento das projeções retinotectais sofrem um processo de eliminação de axônios transitórios, essencial para a correta representação do campo visual nos núcleos visuais centrais. Metaloproteases são uma família de enzimas dependentes de zinco que degradam a maior parte das moléculas de matriz extracelular, possibilitando a inativação de moléculas inibitórias ao crescimento axonal, e participam ainda de regeneração induzida por lesão no SNC. Nosso objetivo foi o de estudar a atividade proteolítica das metaloproteases no desenvolvimento das projeções retinoculares.

Métodos e Resultados:

Ratos da linhagem Lister Hooded em diferentes idades pós-natal foram profundamente anestesiados e tiveram os colículos superiores extraídos e submetidos a análise zimográfica e western blotting. Nossos resultados apontam para uma diminuição da atividade proteolítica das metaloproteases nas camadas visuais do colículo superior em desenvolvimento nas três primeiras semanas pós-natal, período consistente com o desenvolvimento topográfico destas projeções.

Conclusões: Os dados sugerem que metaloproteases possam estar agindo durante fases iniciais do desenvolvimento, participando da reorganização e eliminação sináptica que dá origem ao ordenamento topográfico que ocorre durante o período crítico.

01.012

ATP INDUCES CELL PROLIFERATION IN CULTURED EXPLANTS OF THE VERTEBRATE RETINA. ¹Macama, A.C.C.; ²Fragel-Madeira, L.; ²Linden, R.; ⁴Ventura, A. L. M.; ²Sholl-Franco, A. ¹Biofísica UFRJ; ²Neurobiologia – IBCCF-UFRJ; ³Neurobiologia UFF

Objetivo: ATP is a transmitter that induces the proliferation of chick retinal cells in cultures via activation of P2Y1 receptors, PKC and MAP kinases (Sanches and Ventura, Intl. J. Dev. Neurosci., 20, 21-27, 2002). In the present work, we investigated the effect of this nucleotide on the proliferation of cells from chick and mouse retinal explants.

Métodos e Resultados: The proliferative effect of ATP was estimated by [³H]-thymidine incorporation and BrDU immunohistochemistry. ATP promoted a time-dependent increase in [³H]-thymidine incorporation in retinal explants obtained from 7-day-old chick embryos. A maximal effect of ~100% was observed after 24 hours of treatment, decreasing to 75% and 55% after 48 and 72 hours of treatment, respectively. After 96 hours, no response to ATP was observed, suggesting that the proliferative effect of ATP is restricted to a limited period of the chick retina development. A similar pattern of [³H]-thymidine incorporation was obtained in explants from newborn mouse retina. In explants from mouse retina obtained from animals at P0 and cultured for 24 h, ATP-induced proliferation was dependent of P2Y1 receptor activation, as shown by co-treatment of the cultures with a P2Y1 purinoceptor antagonist (100 μ M PPADS). An increase of ~100% in BrDU-labeled cells from ATP-treated explants was observed over the whole extension of the neuroblastic of the mouse retina.

Conclusões: These results suggest that ATP, acting through activation of purinoceptors (P2Y1), can induce an increase in the cell population that cycles in the mouse retina at this stage of development.

01.013

EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE SEROTONINA NO DESENVOLVIMENTO E PLASTICIDADE DO SISTEMA RETINOTECTAL DE RATOS. Rodrigues Júnior, W. D. S.*; Campello-Costa, P.; Serfaty, C. A. Neurobiologia UFF

Objetivo: A serotonina é um importante neurotransmissor que modula o desenvolvimento da topografia de axônios retinotectais. Estudos anteriores demonstraram que a disponibilidade de serotonina é determinante para formação e manutenção dos circuitos retinotectais bem como para a plasticidade induzida por lesões de retina (Bastos e cols, Dev Brain Res, 824:28035,1999). A disponibilidade de serotonina é regulada pelo transportador de serotonina (SERT). Neste trabalho, investigamos a expressão do SERT durante o desenvolvimento e na plasticidade das projeções retinotectais ipsilaterais.

Métodos e Resultados: Ratos da linhagem Lister Hooded em diferentes etapas do desenvolvimento foram utilizados neste estudo. Animais submetidos a enucleação monocular e animais não operados em diversas fases do desenvolvimento, foram perfundidos com aldeídos. Os cérebros foram dissecados imersos em sacarose a 20% em tampão fosfato 0.1M overnight e cortados em criostato a 20 μ m. Lâminas foram processadas para imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal para o transportador de serotonina (anti-SERT 1:1000) e incubação com anticorpo secundário biotilado. Lâminas controle foram processadas na ausência do anticorpo primário. Os resultados demonstram um aumento na expressão do SERT nas camadas superficiais do colículo superior durante o desenvolvimento coincidindo com o período crítico de desenvolvimento da topografia retinotectal. Os resultados demonstram ainda que a expressão do transportador pode ser modulada durante a plasticidade induzida com a enucleação monocular.

Conclusões: Estes resultados apontam para um possível papel da via serotoninérgica na regulação do desenvolvimento e plasticidade do sistema retinotectal de roedores já que o SERT modula a disponibilidade da serotonina na fenda sináptica.

01.014

EVIDENCE OF A SPECIFIC INTERACTION BETWEEN ADAM23 AND CELLULAR PRION PROTEIN. ¹Costa, M. D. M.; ²Almeida, T. F.*; ³Costa, F. F.; ¹Klassen, G.; ³Camargo, A. A.; ³Martins, V. R.; ⁴Nakao L.S.; ¹Zanata, S. M.; ¹Patologia, UFPR; ²Patologia Imunologia UFPR; ³Bioquímica e Biologia Molecular Instituto Ludwig; ⁴CCBS PUC-PR

Objetivo: ADAM 23 (a desintegrin and a metalloprotease) and PrPc (the cellular prion protein) are highly expressed in central nervous system and have been proposed to act as extracellular matrix receptors. While ADAM 23 is a type I transmembrane receptor, PrPc is a sialoglycoprotein anchored to the plasma membrane by a GPI moiety. Knockout mice to PrPc gene have motor disturbances and increased Purkinje cell layer of the cerebellum. Interestingly ADAM23 gene disruption leads a post-natal lethality and motor impairment due cerebellum degeneration. Both observations led us to hypothesize that ADAM23 and PrPc could act in association to mediate CNS development, maintenance and function.

Métodos e Resultados: To test our hypothesis we did pull down assays using immobilized 6His-tagged heterologously expressed ADAM23 and whole brain homogenate. After extraction of protein partners bound to 6His-ADAM23-Ni-NTA agarose beads, material was resolved by SDS-PAGE. Western blotting analysis showed that PrPc was recovered from the beads, suggesting that PrPc and ADAM23 can interact with each other under these experimental conditions. At the moment we are carrying out co-localization assays using polyclonal antibodies raised against both molecules in a primary cell culture model and confocal microscopy analysis.

Conclusões: Our results describe for the first time an interaction between PrPc and ADAM23 and open new perspectives to elucidate part of the mechanisms employed by the CNS to establish correct contacts during development.

01.015

EARLY TREATMENT WITH FLUOXETINE DOES NOT AFFECT HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS IN RAT. ¹Amancio-dos-Santos, A.; ²Stevens, J.; ²Zhang, S. X.; ³Takase, L. F.**; ²Fornal, C.A.; ²Jacobs, B. L.; ¹Nutrição UFPE; ²Psychology Department, University of Princeton; ³Anatomia ICB III-USP

Objetivo: This study aimed to determine whether neonatal treatment with fluoxetine (FLX) affects hippocampal neurogenesis in young rats and whether this treatment would produce long lasting effects as well as protect animals against stress-induced decreases in hippocampal cell genesis.

Métodos e Resultados: Sprague-Dawley male rats received daily during the lactation period either FLX (10 mg/kg/day s.c.) or equivalent volume of saline (SAL). At the 25th day of life, FLX-25 (n=6) and SAL-25 (n=5) animals received Bromodeoxyuridine (BrdU; 200 mg/kg, i.p.), followed 2h latter by perfusion. Other 22 animals were allowed to reach 60 days of age and then subjected to one of the following treatments: a) BrdU (FLX-60, n=4; SAL-60, n=2); b) 2 injections of the stressor lipopolysaccharide (LPS, 1 mg/kg, i.p.) or SAL and then BrdU (groups: FLX+LPS, n=3; FLX+SAL, n=2; SAL+LPS, n=3; SAL+SAL, n=2); c) 2 h restraint stress (RST) and then BrdU (groups: FLX+RST, n=2; SAL+RST, n=4). All animals were perfused 2 h after BrdU and their brains processed for BrdU immunohistochemistry. The number of BrdU-labelled cells was significantly higher at the 25 days than at 60 days. In both ages, neither early fluoxetine treatment nor the two acute stressors employed (LPS and RST) altered those values. The number of BrdU-labelled cells (mean±SEM) in each condition (FLX-25; SAL-25; FLX-60; SAL-60; FLX+LPS; FLX+SAL; SAL+LPS; SAL+SAL; FLX+RST; SAL+RST) was respectively: 848.5±35.6; 858.0± 23.6; 289.0±19.9; 313.0±11.0; 228.0±25.9; 265.0±4.0; 282.0±31.7; 288.0±10.0; 225.0±5.0; 288.8±10.5.

Conclusões: In contrast to what has been showed at adulthood, early treatment with fluoxetine did not influence hippocampal neurogenesis in rats. The stressors presently used at 60 days also had no effect on hippocampal neurogenesis, suggesting some protective mechanism in the hippocampus against that serotonergic drug and those stressors.

01.016

OVEREXPRESSION, PURIFICATION AND PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST SEMAPHORIN 5B. ¹Ikegami, C. M.; ²Nakao, L. S.; ¹Zanata, S. M.; ¹Patologia UFPR; ²CCBS PUC-PR

Objetivo:

In the developing nervous system, neurons project axons over long distances in order to reach their final targets. Along the way, growth cones located at the leading edges of axons detect and respond to environmental cues that guide them to their appropriate targets. Some of these molecules belong to the semaphorins, a family of secreted and membrane-anchored proteins characterized by an amino-terminal semaphorin (sema) domain. Class V semaphorins are membrane-bound proteins, that contain seven carboxy terminal thrombospondin repeats. Some recent studies have revealed dual roles for Sema 5A: acts as an inhibitory cue for fibroblasts and retinal ganglion cells, and promotes a permissive environment for endothelial cells and developing axons of the fasciculus retroflexus, a diencephalon fiber tract. We wonder if Sema 5B can act as a guidance cue in the same way as Sema 5A. Up to now Sema 5B expression, localization and modulation were not studied. So to better characterize Sema 5B protein, our goals were to produce specific tools to study this semaphoring, so this work consisted of: to clone the intracellular coding region of Sema 5B in pQE30 vector; heterologously express this protein in *E.coli*; purify recombinant protein and inject into rabbits to induce the production of polyclonal antibodies.

Métodos e Resultados:

To produce semaphorin 5B recombinant, the intracellular coding region (600 pb) was cloned in pQE30 vector. This protein was expressed in *E. coli* M15 strain, purified by Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC). The isolated Sema 5B was injected into rabbits to induce the production of specific polyclonal antibodies. After a schedule of injections, the serum was positive against recSema 5B. These polyclonal antibodies were employed in Western blotting essays. Brain membrane preparations of embryonic and post natal CNS mice, were immunoblotted against anti-Sema 5B, revealing expression of Sema 5B.

Conclusões:

Further biochemical studies are being carried out, using the recombinant protein, and polyclonal antibodies against Sema 5B.

01.017

UMA NOVA METODOLOGIA PARA O ESTUDO DA EXUBERÂNCIA TRANSITÓRIA DAS CONEXÕES CORTICAIS. Furtado, D. A.; Carvalho, M. L. ; Houzel, J. C.; Lent, R.; Anatomia ICB-CCS UFRJ

Objetivo:

O desenvolvimento dos circuitos corticais obedece a um fenômeno de exuberância inicial seguida de uma regressão seletiva de seus constituintes. Este fenômeno nunca foi descrito para as conexões tálamo-corticais. Objetivamos desenvolver um novo método de estudo dos eventos de exuberância seguida de regressão das conexões corticais, e empregá-lo na investigação da maturação das conexões tálamo-corticais visuais no rato.

Métodos e Resultados:

Para marcar as células tálamo-corticais inserimos, *in vivo*, cristais de Dil no córtex visual primário de ratos P1. Durante a sobrevida o corante é internalizado e transportado para o corpo celular dentro de vesículas que se tornam assim fluorescentes (marcação vesicular). Após intervalos de sobrevida (P2, P3, P7, P8, P11 e P14), os animais são sacrificados, e seus cérebros são (1) processados e analisados imediatamente; ou (2) armazenados em fixador por vários meses para permitir a difusão do corante por toda a membrana celular (marcação membranar). Animais-controle são sacrificados nas referidas idades e recebem, *post-mortem*, o cristal de Dil no córtex visual primário. Documentam-se os resultados com micrografias e desenhos sob câmara clara.

Nos grupos experimentais 1 e 2 encontramos células fluorescentes nas regiões dorsolateral e medial do tálamo, enquanto, no grupo controle, somente na região dorsolateral. Nos cérebros do segundo grupo identificamos células com marcação membranar, indicando que, na idade do sacrifício, conectavam-se com o local de inserção do cristal. Nestes cérebros também são vistas células apenas com marcação vesicular, sugerindo que estas tenham retraído suas conexões antes do dia do sacrifício. Entre P2 e P14 ocorre uma diminuição gradativa e acentuada na proporção de células plenamente marcadas no tálamo medial. No tálamo dorsolateral também são vistas células com marcação vesicular, porém, em menor proporção.

Conclusões:

Concluimos que a metodologia proposta permite o estudo da exuberância e regressão das conexões corticais, e que as aferências tálamo-corticais passam por um processo de exuberância

seguido de regressão bastante expressiva, envolvendo diversos núcleos talâmicos, inclusive alguns que não projetam para o córtex visual em adultos.

01.018

EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA SOBRE AS RESERVAS DE GLICOGÊNIO DE CÉLULAS HIPOTALÂMICAS DE RÁTOS. ¹Sinder M. P.*; ¹Lima, S. S.*; ²Marcelino, A. A.; ³Sanchez de Moura, A.; ¹Barradas, P. C.; ¹Tenório, F.; ¹Farmacologia e Psicobiologia UERJ; ²IBRAG, UERJ; ³Ciências Fisiológicas UERJ

Objetivo:

A glicose é a principal fonte de energia do cérebro sob condições fisiológicas. Em casos de requerimento metabólico intenso e agudo a glicose é obtida a partir das reservas de glicogênio. Ratos apresentam glicogênio em neurônios e células gliais durante o desenvolvimento e já foi demonstrado que o jejum pode afetar estas reservas energéticas. Animais submetidos à desnutrição protéica durante período restrito de seu desenvolvimento apresentam alterações na expressão/distribuição de moléculas envolvidas no metabolismo energético do corpo. Em nosso laboratório observamos que nestes animais, ocorre um atraso na expressão da óxido nítrico sintase em núcleos hipotalâmicos envolvidos neste metabolismo energético. Neste trabalho pretendemos analisar as reservas de glicogênio em células hipotalâmicas de ratos machos submetidos à dieta hipoprotéica durante os primeiros 10 dias de lactação.

Métodos e Resultados: Foram utilizados ratos com idades variando entre 10 e 45 dias posa-natal. Os ratos foram sacrificados e perfundidos com salina, seguido de paraformaldeído a 4%. Foi realizada a crioproteção com solução contendo 20% de sacarose. No dia seguinte os cérebros foram emblocados e congelados para serem cortados em criostato a 30µm. Os cortes foram então recolhidos em lâminas gelatinizadas e submetidos a reação pelo método do Ácido Periódico (PAS) modificado para marcação do glicogênio intracelular. Foram observados perfis radiais marcados na borda do terceiro ventrículo, com características de tanicitos. Esta marcação se mostrou menos intensa em animais dieta, na região do núcleo arqueado, em relação aos animais controle.

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que, em virtude de uma menor disponibilidade de macronutrientes, possa estar ocorrendo uma maior metabolização das reservas de glicogênio neste período de desnutrição.

01.019

EFEITO DA APLICAÇÃO DE ONDAS CURTAS CONTÍNUO EM RATAS PRENHAS SOBRE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DA PROLE. Nunes, D.*; Dall Pizzol, C. P.*; Moreira, C. A. G.*; Schneider, L. P.*; Rigoti, K. M.; Guedes, R. P. Fisioterapia ULBRA

Objetivo:

Estudos vêm demonstrando uma estreita associação entre mal nutrição perinatal e o desenvolvimento do sistema nervoso central. A relação entre o estado nutricional e doenças crônicas na vida adulta já está bem estabelecida, demonstrando que a mal nutrição perinatal aumenta a pré-disposição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, hipertensão, obesidade, diabetes mellitus e alterações na secreção dos hormônios do eixo tireóide pituitária. O hipotálamo tem importante papel para o metabolismo energético e está organizado em populações neuronais como os núcleos ventro medial (VMH) paraventricular (PVN) e arqueado (ARC). Moléculas orexigênicas e anorexigênicas como o óxido nítrico (ON), NPY e leptina atuam em conjunto nestes núcleos na regulação dos estados energéticos do indivíduo. Em estudos anteriores observamos um atraso na expressão da óxido nítrico sintase (NOS) nestes núcleos hipotalâmicos em animais que sofreram mal nutrição. Afim de melhor compreender a ontogenia dos circuitos envolvidos no controle do metabolismo energético do rato, nosso trabalho objetiva identificar o fenótipo bioquímico de células envolvidas no controle do metabolismo energético, como o NPY e o Ob-R em alguns núcleos hipotalâmicos de ratos.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados ratos no primeiro mês de vida. No dia do nascimento as ninhadas foram igualadas para 6 animais por nutriz. Um grupo de nutrizas foi mantido com ração regular, enquanto o grupo experimental recebia ração com 0% de proteína até o décimo dia de amamentação, retornando à

alimentação normal após este período. Os animais foram anestesiados e perfundidos com salina, seguida de paraformaldeído 4%. Os cérebros foram isolados, cortados em criostato coronalmente a 30µm sendo recolhidos em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram então submetidos à reação imunohistoquímica utilizando os anticorpos anti-Ob-R (Santa Cruz, 1:100) e anti-NPY (DiaSorin, 1:200). A revelação foi feita com uma IgG anti-camundongo biotilado (Santa Cruz, 1:100) + extravidina com CY3 (1:100) e com IgG anti-coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes, 1:400), respectivamente. Posteriormente as lâminas foram montadas e fotografadas ao microscópio. Em animais controle foram observadas células Ob-R+ bem delimitadas com marcação predominantemente no corpo celular no núcleo periventricular (PeV). A marcação para NPY neste núcleo apresentou-se de forma pontual em processos celulares, tanto em animais controle como em animais dieta. Não foi observada co-localização de Ob-R com NPY no PeV, no entanto diversos processos celulares NPY+ aparecem circundando neurônios Ob-R+ em animais controle. Em animais dieta, é marcante a ausência de células Ob-R+ no PeV. O núcleo hipotalâmico lateral (LH) de animais controle apresentou tanto células marcadas para Ob-R como para NPY, além disto, neste núcleo foi possível evidenciar em pequeno número de células duplamente marcadas para Ob-R e NPY. Além de corpos celulares, também foram observados diversos processos celulares marcados para NPY neste núcleo.

Conclusões:

A co-localização de NPY e Ob-R em um número limitado de células apenas no LH, sugere que o controle da expressão deste neuropeptídeo pela leptina seja feito, em grande parte, de forma indireta. A dieta a qual os animais experimentais foram submetidos provocou alterações no fenótipo de células de núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle do metabolismo energético.

01.020

OLFACTORY BULB CELLS PRODUCE GABA FROM PUTRESCINE. ¹Sequeira, E. B.; Gardino, P. F.; Hedin-Pereira, C.; de Mello, F. G. IBCCF-UFRJ

Objetivo:

In the developing CNS neural progenitors were shown to produce GABA from an untraditional pathway using putrescine (PTS) instead of glutamate (via glutamic acid decarboxylase – GAD). This alternative mechanism for GABA synthesis appears to be typical of development. Since the olfactory bulbs (OB) are known to retain developmental characteristics such as neurogenesis, migration and differentiation until adulthood it is possible that these cells synthesize GABA through this alternate pathway. New neurons generated in the subventricular zone (SVZ) migrating into OB express GABA while migrating. In this study we aim to establish if cells within the OB are able to produce GABA from PTS.

Métodos e Resultados:

To determine if migrating neuroblasts of the SVZ are both GABAergic and express GAD, we produced chains of migrating neuroblasts *in vitro* from SVZ explants and immunoprocessed for GABA and GAD detection. Although all migrating neuroblasts immunolabel for GABA just a subpopulation of these cells express GAD. To test whether OB cells are able to produce GABA from PTS, we sliced OBs from P6 rats at 350µm. Slices were cultured for 24 hours in medium containing 15µCi of ³H-PTS and ³H-GABA production was measured. For this, GABA was dissolved, extracted and separated by thin layer chromatography. The GABA band was isolated and radioactivity detected in a scintillator. GABA extracted from 10 slices and diluted to 600µl of solution produced 1509 cpm. To estimate the proportion of PTS conversion into GABA, we compared the radioactivity retained in the band that corresponds to PTS, spermin and spermidin with that which corresponds to GABA. Surprisingly, the former band measured only 77 cpm suggesting that most of the ³H-PTS captured by the cells were converted into GABA in 24 hours of culture.

Conclusões:

We show that cells within postnatal OB are able to produce GABA from PTS. Migrating neuroblasts coming from the SVZ are natural candidates for the production of GABA from this alternative source; however, we still have to identify the cell types responsible for the PTS/GABA conversion.

01.021

INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE L-TRIPTOFANO NO DESENVOLVIMENTO DA RETINA DE RATOS ¹Rung, P. A.*; ¹Pinheiro, C. F.*; ²Gardino, P. F.; ¹Serfaty, C. A.; ³Santos, R. M. D. ¹Neurobiologia UFF; ²IBCCF-UFRJ; ³Fisiologia e Farmacologia UFF

Objetivo:

Antes de assumir seu papel como neurotransmissor, a serotonina (5-HT) atua como um modulador do desenvolvimento do sistema nervoso central. Um dos fatores controladores da síntese de 5-HT é a disponibilidade de seu precursor, o aminoácido essencial, L-triptofano (TRP). Diversos estudos têm demonstrado que misturas específicas deficientes em TRP podem ser utilizadas como uma ferramenta para avaliar o papel da 5-HT no sistema nervoso central. Neste trabalho, nós estudamos a influência da deficiência nutricional de triptofano durante as duas primeiras semanas de aleitamento sobre a população de células imunorreativas à calretinina, um marcador de diferenciação neuronal, na camada de células ganglionares (CCG) da retina de ratos.

Métodos e Resultados:

Ratos neonatos, da linhagem Lister Hooded, foram amamentados por mães alimentadas com uma dieta normocalórica, deficiente em L-triptofano (grupo experimental), ou com uma dieta padrão para roedores (grupo controle), durante as duas primeiras semanas. Animais com 10 (DPN10) e 14 (DPN14) dias pós-natal tiveram suas retinas dissecadas, fixadas em solução de paraformaldeído 4% e cortadas em criostato. A imunohistoquímica foi realizada com emprego de anticorpo anti-calretinina (1:5000) com o método do complexo avidina-biotina e revelação com diamino benzidina (DAB). Nossos resultados demonstraram nos grupos experimentais em DPN10 e DPN14, respectivamente, uma redução de 85% e 50% no número de células imunorreativas à calretinina na camada de células ganglionares (CCG) em relação ao grupo controle.

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que a deficiência nutricional de triptofano promove uma redução no número de células imunorreativas à calretinina na camada de células ganglionares da retina de ratos, compatível com um retardo no desenvolvimento do sistema visual.

01.022

ACÚMULO DE ADENOSINA ENDÓGENA INDUZ EXPANSÃO DAS CONEXÕES RETINOTECTAIS IPSOLATERAIS DE ROEDORES. Maia, F. B.**; Serfaty, C. A.; Campello-Costa, P. Neurobiologia UFF

Objetivo:

No início do desenvolvimento da via retinotectal de ratos, as projeções provenientes dos dois olhos se sobrepõem no colículo superior. Entretanto, observa-se uma restrição topográfica destas conexões, dentro das duas primeiras semanas pós-natal, que é dependente da atividade elétrica neuronal e de neurotransmissores como o glutamato, a serotonina e a adenosina. A adenosina é um neuromodulador que ganha o meio extracelular através de um transportador de membrana ou pela quebra de nucleotídeos de adenina que ocorre no próprio meio. Sua remoção da fenda sináptica ocorre através da recaptção ou degradação a inosina pela ação da enzima adenosina deaminase. Inibidores do transportador de adenosina, como o dipiridamol, aumentam a concentração de adenosina no interstício. Neste trabalho estudamos se o aumento da adenosina endógena influencia a formação e manutenção da via retinotectal ipsolateral.

Métodos e Resultados:

Ratos Lister Hooded em diferentes etapas do desenvolvimento foram submetidos ao tratamento sub-cutâneo diário, por 4 a 8 dias, com dipiridamol (10 e 50 mg/Kg). Animais controle foram tratados com veículo. Após este período os animais foram injetados com traçador anterógrado para mapear a via retinotectal ipsolateral. Após 24hs, os animais foram perfundidos, os cérebros congelados e cortados em orientação parasagital no criostato a 40 µm. Os cortes foram reagidos seguindo o protocolo de Mesulan (*J. Histochem. Cytochem.* v. 26: p. 106, 1978). Os resultados mostram que apenas o tratamento com 50 mg/Kg promove aumento da marcação terminal de fibras ipsolaterais, caracterizado por expansão destes axônios para regiões posteriores do colículo superior.

Conclusões:

Os resultados sugerem que a adenosina participe do processo de refinamento topográfico observado durante o desenvolvimento da projeção retinotectal e apontam para o AMPc como um importante sinalizador intracelular desta via.

01.023

CICLOSPORINA A PROMOVE ALTERAÇÕES NA PLASTICIDADE RETINOTECTAL DE RATOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO E APÓS LESÕES DE RETINA. Trindade, P.; Antonioli Santos, R.*; Teixeira, A. C.**; Serfaty, C. A. Neurobiologia, UFF

Objetivo:

Utilizando a via retinotectal de roedores como modelo experimental, estudamos o papel funcional da calcineurina (CaN), uma fosfatase cálcio-dependente envolvida em fenômenos de plasticidade neural, através da administração de ciclosporina A (CsA), um inibidor da CaN, durante o desenvolvimento topográfico normal e através de lesões seletivas na retina.

Métodos e Resultados:

Verificamos a expressão da CaN ao longo do desenvolvimento de ratos pigmentados através de métodos imunohistoquímicos. Estudamos o efeito do bloqueio da CaN sobre a plasticidade retinotectal em dois grupos experimentais: após lesão na retina temporal esquerda (LRT) em DPN10 e em ratos não-lesionados. Os animais foram submetidos a injeções subcutâneas diárias de CsA em dimetilsulfóxido (DMSO - 10mg/kg) ou veículo, entre DPN07-DPN21. As projeções retinotectais ipsolaterais foram mapeadas através do transporte anterógrado de peroxidase. Os cortes obtidos foram observados em microscopia óptica, fotografados e os resultados analisados a partir das imagens digitalizadas. Os resultados mostram um aumento progressivo da marcação para CaN nas camadas superficiais do colículo superior a partir de DPN10. A administração de CsA em animais não-lesionados promoveu uma expansão dos aglomerados de marcação ipsolateral além de uma diminuição na densidade média em comparação ao grupo controle. Após uma LRT, o tratamento com CsA promoveu uma inibição da reorganização laminar induzida por lesão da ordem de 35% em relação aos controles.

Conclusões:

Em conjunto nossos resultados sugerem um papel da CaN no refinamento de mapas retinotectais e que a administração de CsA esteja associada a um retardo tanto da plasticidade natural quanto daquela induzida por lesão.

01.024

EXPRESSÃO ONTOGENÉTICA DAS ISOFORMAS “FLIP” E “FLOP” DAS SUBUNIDADES GLUR2 E 3 DOS RECEPTORES DE GLUTAMATO DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CEREBELO DE PINTOS. ¹Real, C. C.; ² Britto, L. R. G.; ¹Pires, R. S.; ¹UNICID; ²Biofísica e Fisiologia USP

Objetivo:

Os receptores de glutamato e as proteínas ligantes de cálcio são freqüentemente ligados ao processo de desenvolvimento neural. Usando as técnicas de hibridização *in situ* e de imunohistoquímica avaliamos a expressão das isoformas “flip” e “flop” das subunidades GluR2 e GluR3 dos receptores de glutamato do tipo AMPA e das proteínas ligantes de cálcio calbindina (CB) e parvalbumina (PV) no cerebelo de pintos ao longo do desenvolvimento embrionário.

Métodos e Resultados:

Foram utilizados embriões de pintos (*Gallus gallus*) em diferentes etapas de desenvolvimento (E10-E20) e no primeiro dia de vida pós-natal (P1). Nesses estudos empregamos sondas não-radioativas de RNAs complementares das isoformas “flip” e “flop” de GluR2 e 3 e anticorpos comerciais dirigidos contra CB e PV. O primeiro mRNA expresso foi GluR3 “flop”, em E10, nas futuras células de Purkinje. A expressão das isoformas GluR3 “flip” e GluR2 “flip” e “flop” iniciaram-se em E14. Após o início de expressão das isoformas “flip” e “flop” de GluR2 e 3, observamos um aumento diferencial dos seus mRNAs, atingindo o pico de expressão em E18, e mantendo-se assim até P1. A isoforma GluR3 “flop” foi a mais expressa nas células de Purkinje, enquanto a GluR2 “flip” a menos expressa. A imunorreatividade para CB e PV iniciou-se em E12. Após o aparecimento de CB e PV, houve um aumento progressivo de expressão, atingindo em E18 um padrão semelhante ao de P1. Em E18 foi observado um aumento importante da arborização

dendrítica das células de Purkinje, juntamente com os picos de expressão das isoformas “flip” e “flop” de GluR2 e GluR3 e das proteínas ligantes de cálcio CB e PV.

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que as isoformas “flip” e “flop” das subunidades GluR2 e 3 dos receptores de glutamato do tipo AMPA apresentam expressão diferencial durante o desenvolvimento embrionário, podendo contribuir para a diferenciação neuronal e sinaptogênese.

01.025

ACOPLAMENTO CELULAR NO TELENCEFALO DE RATOS RECÉM-NATOS REVELADO POR CARREGAMENTO PIAL DE FLUOROCROMOS ¹Freitas, A. S. ^{**}; ¹Furtado, C. M.; ¹Menezes, J. R. L.; ²Hedin-Pereira, C.; ¹Frões, M. M. Anatomia CCS-UFRJ; ²IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Células de glia radial (RGC) são as principais progenitoras dos neurônios piramidais (NP) do córtex (Cx) e proveriam a zona subventricular (SVZ) de astrócitos, possíveis precursores neuronais. Evidências apontam a comunicação juncional (CJ) como moduladora de eventos do desenvolvimento como proliferação, migração e a constituição de unidades funcionais no Cx. Neste trabalho, analisaremos o acoplamento populacional de RGC e de NP imaturos que estendem seus prolongamentos apicais à camada 1. Para isto, desenvolvemos uma técnica de carregamento de populações celulares com fluorocromos, mediante permeabilização da superfície do cérebro.

Métodos e Resultados:

Cérebros de ratos com 5 dias pós-natais (P5) foram imersos em PBS \emptyset Ca⁺²/EGTA/glicose e as meninges rebatidas. Realizou-se um esfregaço com papel na superfície cortical exposta e gotejou-se solução com o permeante Lucifer yellow (LY; 443Da) e não permeante dextran conjugado à Rodamina (RD; 3KDa). Após lavagem (Gey) o material foi fixado (PF4%/PBS) por 3h, crioprotetido, e os cortes parasagitais analisados à epifluoromicroscopia. Células carregadas diretamente (LY+RD+) distribuíram-se na placa cortical (CP) e na SVZ, incluindo neurônios com morfologia piramidal e astrócitos, além de RGC na SVZ. Células acopladas (LY+RD-) foram localizadas em diferentes camadas corticais que incluem a substância branca, a SVZ e a CP. Grupos de células piramidais acopladas foram identificados na CP, dispersos entre células duplo marcadas. Distribuindo-se rostralmente à superfície de carregamento direto encontramos células LY+RD- na SVZ/RMS, como forte indicação de acoplamento a partir das RGC, diretamente carregadas em nosso modelo.

Conclusões:

Nossos dados sugerem que tanto as RGC quanto os NP perfazem circuitos juncionais ativos no telencefalo em desenvolvimento. Acreditamos que a CJ possa revestir-se de diferentes significados nestes dois microambientes telencefálicos, modulando processos proliferativos e migratórios na SVZ ou promovendo a formação de domínios funcionais na circuitaria em formação da CP. Por fim, um possível acoplamento entre RGC e NP, não afastado neste modelo, poderia prover circuitos de correspondência funcional Cx/SVZ.

01.026

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE PINTO E DIFERENCIAÇÃO NEUROQUÍMICA DO COMPLEXO NUCLEAR VESTIBULAR. Passetto, M. D. F. ^{**}; Real, C. C. ^{*}; Pires, R. S. Fisioterapia UNICID

Objetivo:

A maturação da circuitaria neural envolve a expressão diferenciada de inúmeras substâncias; muitas delas relacionadas com a concentração citosólica do íon cálcio. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o padrão de expressão das subunidades GluR_{2/3} dos receptores de glutamato do tipo AMPA e das proteínas ligantes de cálcio parvalbumina (PV) e calbindina (CB) nos núcleos vestibulares durante o desenvolvimento embrionário de pinto.

Métodos e Resultados:

Encéfalos de pintos (*Gallus gallus*) entre 10-20 dias de vida embrionária (E10-E20) e com um dia pós-natal (P1) foram removidos, fixados e processados para imuno-histoquímica. A imunorreatividade (IR) para GluR_{2/3} apareceu em corpos celulares nos núcleos vestibular superior

(NVS), dorsal de Deiters (NdD), ventral de Deiters (NvD), vestibular descendente (NVD) e tangencial (NT) em E11, e em E14 no núcleo vestibular medial (NVM). Após E11, no NVS, NdD e NvD, houve um aumento progressivo de GluR_{2/3} atingindo um padrão semelhante ao P1 em E14. Nos NVD e NVM ocorreu um aumento em E16 e E20, respectivamente, mantendo esse padrão até P1. A expressão de GluR_{2/3} no NT foi semelhante ao de E11 em todas as fases. A IR para PV iniciou em E10 no NVM e NVD, em E12 no NVS e NvD, e em E14 no NT. O aumento de neurópila e células PV+ atingiu níveis semelhantes ao de P1 no NVM e NT em E14, e em E16 no NVS, NvD e NVD. A expressão de CB foi predominante em neurópila, exceto do NVM onde foram observadas algumas células CB+. O início da expressão de CB no NdD, NvD, NVD, NVM e NT foi em E16, aumentado em E18, mantendo-se estável até P1. No NVS a expressão de CB iniciou em E20, sustentando o arquétipo até P1.

Conclusões: Os nossos resultados indicam um padrão de expressão espacial e temporal distinto de GluR_{2/3}, PV e CB no complexo nuclear vestibular; sugerindo papéis distintos dessas proteínas durante a embriogênese e sinaptogênese.

01.027

EXPRESSÃO DOS RECEPTORES A1 E A2A DE ADENOSINA NO DESENVOLVIMENTO E NA PLASTICIDADE INDUZIDA DO SISTEMA RETINOTECTAL DE RATOS Gomes, A. L. T*; Paes-de-Carvalho, R.; Serfaty, C. A.; Campello-Costa, P. C. Neurobiologia UFF

Objetivo:

No sistema visual de roedores, observa-se a representação topográfica da superfície receptora no tecido neural. A estabilização seletiva de sinapses depende da atividade elétrica, liberação de neurotransmissores, dentre outros. Estudos anteriores mostraram que é possível induzir respostas plásticas após lesões no sistema visual. A adenosina é um importante neuromodulador que, no colículo superior, pode desempenhar tanto um papel facilitador na transmissão sináptica como um efeito inibitório na resposta pós-sináptica. Estes efeitos são mediados por diferentes receptores. Neste trabalho investigamos a ontogênese dos receptores A1 e A2a no colículo e sua regulação na plasticidade induzida por enucleação.

Métodos e Resultados:

Utilizamos ratos Lister Hooded normais ou submetidos a enucleação monocular no décimo dia pós-natal. Neste grupo, foi dada sobrevida de 24, 48, 72h e 1 semana pós-lesão. Em seguida, preparamos amostras com o colículo. Dosamos proteína pelo método de Bradford (Anal. Biochem. 72: 248, 1976). Pronta as amostras, realizamos western blotting para os receptores A1 A2a. Nossos resultados preliminares demonstram que a expressão do receptor A1 no colículo é 75% maior em etapas precoces do desenvolvimento, em relação ao animal adulto. Por outro lado, a expressão do receptor A2a é 100% maior no animal adulto em relação ao neonato (P0). No grupo enucleado, os experimentos sugerem uma discreta alteração na expressão destes receptores no colículo denervado em relação ao controle.

Conclusões:

Os resultados mostram um perfil complementar de expressão dos receptores A1 e A2a, sendo o primeiro expresso na fase de refinamento natural destas projeções, além da regulação após enucleação. Em conjunto, os dados sugerem que o sistema purinérgico participe no desenvolvimento e na plasticidade das conexões retinotectais.

01.028

MODULAÇÃO NA EXPRESSÃO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS M1 PELOS TRATAMENTOS COM CARBAMILCOLINA E PMA EM CULTURAS DE CÉLULAS RETINIANAS ¹Santos, A. A.; ²Medina, S. V.; ²Araújo, E. G. ¹IBCCF-UFRJ ²Neurobiologia UFF

Objetivo:

Os neurotransmissores são capazes de regular fenômenos que ocorrem durante o desenvolvimento do sistema nervoso, como proliferação e diferenciação celular. Em cultura de células da retina de ratos, os tratamentos com carbamilcolina e acetato de forbol miristato (PMA) diminuíram a proliferação celular, sendo o efeito mediado por receptores muscarínicos (M1). O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão destes receptores e a modulação desta expressão pelos tratamentos com carbamilcolina e PMA em diferentes tempos em cultura.

Métodos e Resultados:

Ratos neonatos (P2) da linhagem Lister Hooded foram sacrificados, as retinas dissecadas em salina sem cálcio e sem magnésio, tripsinizadas e dissociadas mecanicamente. As células foram plaqueadas na densidade de $1,0 \times 10^5 / \text{cm}^2$ em placas de Petri tratadas com poli-L-ornitina e mantidas em meio de cultura completo por diferentes tempos em cultura. A proteína foi extraída e dosada pelo método de Bradford e as amostras coradas com azul de bromofenol. Foi realizado o Western blot com a corrida em gel de acrilamida 9% (60 μg proteína/amostra) e transferência para uma membrana PVDF sendo tratada com o anticorpo primário anti-M1 (por 18h) e incubada com anticorpo secundário por 1 hora. A revelação foi feita com ECL. Nossos resultados demonstram a presença de receptores M1 em culturas de células da retina. Os tratamentos com Carbamilcolina 25 μM e PMA 20ng/mL induzem um pequeno aumento (40% e 20% respectivamente) na expressão destes receptores em culturas mantidas por 30 min, seguido de uma diminuição gradativa nesta expressão chegando a 20% e 40%, respectivamente, em culturas de 48h. Esta expressão também diminuiu após 48 horas com a idade da cultura.

Conclusões:

Nossos resultados mostram a expressão de receptores M1 na retina de ratos e a modulação desta expressão pela atividade colinérgica e ativação direta da PKC. A regulação desses receptores durante o desenvolvimento pode estar ocorrendo pela liberação de fatores tróficos em nossas culturas.

01.029

AÇÃO ANTAGÔNICA DE DISTINTAS DOSES DE FLUOXETINA SOBRE A DEPRESSÃO ALASTRANTE EM RATOS Amancio-dos-Santos, A.; Pinheiro, P. C. F.; Lima, D. S. C.; Ozias, M. G.; Batista-de-Oliveira, M.*; Guimarães, N. X.*; Guedes, R. C. A. Nutrição UFPE

Objetivo:

Foi previamente demonstrado que a fluoxetina (FLX), na dose de 10 mg/kg, reduz a propagação da depressão alastrante (DA) no córtex cerebral de ratos (1st Neuroscience Symposium, Natal, 2004, abstracts, pg.6). Visando caracterizar melhor tal efeito, realizou-se, neste estudo, uma “curva dose-resposta” com mais 3 doses de FLX.

Métodos e Resultados:

Ratos Wistar lactentes foram tratados do 2º ao 24º dia de vida com duas injeções (s.c.) diárias de FLX (5 mg/kg, n=15; 20 mg/kg, n=15; 40 mg/kg, n=10; metade da dose em cada uma das injeções). O grupo controle recebeu volume equivalente de solução salina (grupo SAL; n=18). Aos 25-30 dias de vida, os animais foram submetidos ao registro eletrofisiológico da DA. Esta foi provocada pela aplicação de KCl (2%, por 1 min) no córtex frontal e registrada, durante 4 h, em dois pontos da superfície parietal. As velocidades de propagação da DA foram obtidas baseando-se no tempo gasto para a DA percorrer a distância entre os dois eletrodos registradores. Os grupos tratados com FLX apresentaram velocidades médias da DA significativamente menores que o grupo SAL, sendo esse efeito dependente da dose de FLX. As velocidades médias (em mm/min) por hora de registro variaram de 3.82 ± 0.29 a 4.08 ± 0.37 , de 3.51 ± 0.19 a 3.75 ± 0.40 , de 3.06 ± 0.34 a 3.43 ± 0.75 e de 2.93 ± 0.23 a 3.39 ± 0.22 para os grupos SAL, FLX-5, FLX-20 e FLX-40, respectivamente.

Conclusões:

O sistema serotoninérgico parece influenciar antagonicamente a propagação da DA. Tal efeito pode ter relevância clínica em processos neuropatológicos possivelmente relacionados à DA, tais como a epilepsia e a enxaqueca com aura.

01.030

INTERLEUCINA-4 AUMENTA A SOBREVIDA DAS CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA. ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS DE MÜLLER E DE NEUROTROFINAS. ¹Cabral, T. A. R.; ²Santos, R. C. C.*; ³Araújo, E. G.; ¹Biofísica Neurobiologia UFF; ²BCCF-UFRJ; ³Neurobiologia UFF

Objetivo:

A sobrevivência neuronal é modulada por diferentes citocinas tanto durante o desenvolvimento como na vida adulta. Dados da literatura mostram o papel das células gliais na modulação da sobrevivência

neuronal através da liberação de neurotrofinas. Nosso objetivo foi investigar o papel das células gliais estimuladas pela IL-4 na sobrevida das células ganglionares da retina (CGRs).

Métodos e Resultados:

Utilizamos ratos da linhagem Lister Hooded nas primeiras 48 horas pós-natais. Após 16 horas da injeção de peroxidase, os animais foram sacrificados por decapitação, suas retinas dissecadas, dissociadas em tripsina 0,1% por aproximadamente 16 min, trituradas mecanicamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta afilada, plaqueadas na presença de meio 199 completo diretamente sobre monocamadas purificadas de células gliais tratadas previamente ou não com interleucina-4 por um período de 48h. Após dois dias em cultura foi feita a revelação da HRP, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e foi feita uma contagem sistemática num aumento de 400X. Nossos dados mostraram um aumento na sobrevida das células ganglionares da retina plaqueadas sobre culturas de células gliais estimuladas previamente com IL-4 (5U/mL). O efeito das células gliais estimuladas por IL-4, na sobrevida das CGR, foi bloqueado pela Brefeldina A (inibidor da liberação de polipeptídeos) e pelo K252a (bloqueador de receptores Trk).

Conclusões:

Nossos dados preliminares indicam que a IL-4 pode agir diretamente sobre as células gliais da retina. A ação da IL-4 sobre seus receptores nas células de Müller pode estar induzindo uma liberação de moléculas solúveis e/ou de adesão capazes de aumentar a sobrevida das células ganglionares da retina. Esse aumento na sobrevida das CGR depende da liberação de polipeptídeos e ativação de receptores Trk, indicando a ação de neurotrofinas nesse processo.

01.031

EXPRESSÃO DE NEUROPEPTÍDEO Y (NPY) E RECEPTORES DE LEPTINA (OB-R) EM NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS DE RATOS NORMAIS E SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA ¹Marcelino, A.A.; ²Lima, S. S.*; ³Sanchez de Moura, A.; ²Barradas, P. C.; ²Tenório, F.; ¹IBRAG-UERJ; ²Farmacologia e Psicobiologia UERJ; ³Ciências Fisiológicas UERJ

Objetivo:

O ondas curtas (OC) é um equipamento empregado no tratamento fisioterapêutico, seus efeitos são produzidos por oscilações eletromagnéticas de alta frequência que causam aquecimento profundo dos tecidos, por isso, sua utilização é contra-indicada no período gestacional. A partir disso, este estudo teve como objetivo verificar as alterações morfométricas da prole de ratas submetidas a esse tipo de irradiação durante o período de organogênese.

Métodos e Resultados:

Foram utilizadas 17 ratas, divididas em três grupos: controle (n=5), sham (n=5) e experimental (n=7). No grupo experimental foi realizada a aplicação de OC contínuo (27MHz) por um minuto na região lombar das ratas prenhas do 7º ao 14º dias gestacionais. No grupo sham as placas de aplicação do OC foram colocadas na região lombar das ratas prenhas porém o aparelho permaneceu desligado. As ratas do grupo controle não sofreram qualquer manipulação ao longo do período gestacional. Após o nascimento dos filhotes, estes foram analisados de acordo com três parâmetros: peso corporal, comprimento e perímetro cefálico. Os resultados foram analisados através do teste estatístico de Kruskal-Wallis, considerando diferença significativa quando $p < 0,05$. Os filhotes dos grupos sham ($6,37 \pm 1,38$) e experimental ($5,87 \pm 0,47$) apresentaram peso corporal superior ao grupo controle ($5,49 \pm 0,73$). Em relação ao perímetro cefálico, os filhotes do grupo experimental ($12,95 \pm 1,31$) apresentaram medidas inferiores aos demais grupos (sham – $13,70 \pm 1,15$; controle – $14,84 \pm 2,23$). O comprimento corporal não variou de forma significativa entre os três grupos.

Conclusões:

Os resultados indicam que a aplicação da irradiação por OC no período de organogênese pode interferir no desenvolvimento fetal ocasionando alterações morfométricas na prole. Contudo, os efeitos inerentes à manipulação das ratas prenhas não deve ser desconsiderado.

01.032

PAPEL DOS SISTEMAS SEROTONINÉRGICO E COLINÉRGICO NO AUMENTO DA SOBREVIDA DAS CÉLULAS GANGLIONARES MANTIDAS CRONICAMENTE DESPOLARIZADAS EM CULTURA. ¹Fonseca, A. G.; ²Araújo, E. G.; ¹IBCCF-UFRJ; ²Neurobiologia UFF

Objetivo:

Altas concentrações de K^+ mimetizam a atividade elétrica celular e aumentam a sobrevivência neuronal "in vitro". Neste trabalho analisaremos as vias de sinalização envolvidas no aumento da sobrevivência das células ganglionares (CGR), induzido por altas concentrações de K^+ .

Métodos e Resultados:

Ratos neonatos (Lister Hooded, P1) receberam injeções múltiplas de HRP (30%; DMSO 2%) em ambos os colículos superiores. Após 16h suas retinas foram dissecadas, tratadas com tripsina (0,2%), trituradas e plaqueadas em meio de cultura completo, sobre lamínulas tratadas com poli-L-ornitina 50 μ g/mL (densidade 10^5 cels/cm²). A adição das drogas e das altas concentrações de K^+ foi feita 4h após o plaqueamento. A identificação das CGR foi feita por reação histoquímica para a HRP e a quantificação obtida por contagem em microscópio (400X). Nossos resultados mostram que KCl 35mM induz um aumento de 100% na sobrevivência das CGR sendo este efeito totalmente abolido por SDZ 10 μ M e telenzepina 1mM indicando a participação dos receptores 5HT₄ e M₁. O tratamento das culturas com doses sub-ótimas de K^+ e agonista 5-HT₄ também induziu aumento de 100% na sobrevivência das CGR. Nifedipina 5 μ M e benzamil 25 μ M, bloqueadores de canais de Ca^{2+} e Na^+ dependentes de voltagem não inibiram o efeito do agonista 5HT₄, contudo, o BAPTA-AM 30 μ M, aboliu o efeito do aumento da sobrevivência induzida pelo agonista. H89 1 μ M, (bloqueador da PKA) inibiu o efeito do aumento da sobrevivência das CGR induzido pelo agonista 5-HT₄. Contudo, o antagonista 5-HT₄, não inibiu o efeito do carbacol 25 μ M na sobrevivência das CGR. Amiloride 50 μ M, um bloqueador dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T, abole o aumento da sobrevivência induzida pelo agonista. Contudo, não altera o efeito do Carbacol 25 μ M.

Conclusões: Nossos resultados permitem concluir que o aumento da sobrevivência induzido pelas altas $[K^+]$ depende de uma rede de sinalização no microambiente de nossas culturas, mediada pela ativação de receptores metabotrópicos e diferentes canais iônicos.

01.033

EFEITO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DA RETINA INDUZIDO POR FGFb. ¹Guilarducci-Ferraz, C. V. V.; ¹Silva, G. M. da^{**}; ¹Souza, A. R. de*; ²Torres, P. M. M.; ¹Araújo, E. G. ¹Neurobiologia UFF; ²Psicologia UNESA

Objetivo:

O FGFb está envolvido em vários eventos durante o desenvolvimento e na idade adulta. Na retina, ele é capaz de induzir proliferação, porém as vias intracelulares envolvidas neste efeito ainda não estão bem descritas. O objetivo deste trabalho foi estudar as vias intracelulares responsáveis pelo efeito proliferativo desta citocina.

Métodos e Resultados:

Células da retina de ratos neonatos da linhagem Lister Hooded foram dissociadas e plaqueadas na densidade de $1,25 \times 10^5$ céls/cm² sobre placas de Petri de 35mm, pré-tratadas com poli-L-ornitina 50 μ g/mL. O efeito do FGFb 25ng/mL foi avaliado por incorporação de [³H]-timidina (0,5 μ Ci/placa) e os resultados são expressos em porcentagem do controle. Nossos resultados anteriores demonstraram que o FGFb é capaz de aumentar a proliferação dessas células e este efeito é mediado pelas vias da tirosina cinase e da PI3 cinase. Para continuarmos estudando as vias bioquímicas envolvidas, tratamos as culturas com Ly 12,5 μ M + genisteína (geni) 10 μ M (inibidores da PI3 cinase e de tirosina cinase, respectivamente). Este tratamento concomitante não foi capaz de bloquear o efeito do FGFb (FGFb 194,1% \pm 19,01% n=6; Ly/geni 86,7% \pm 9% n=6; Ly/geni/FGFb 185,9% \pm 22,1% n=8). Foi testado também o tratamento conjunto com Ly 6,25 μ M + cloreto de queleritrina (CC) 0,3 μ M (inibidor da PKC). Estas drogas bloquearam totalmente o efeito proliferativo induzido pelo FGFb (FGFb 221,5% \pm 22,7% n=9; Ly/CC 90,7% \pm 22,2% n=10; Ly/CC/FGFb 129,3% \pm 27,9% n=8). Para avaliarmos o envolvimento do cálcio neste efeito utilizamos BAPTA AM (B) 20 μ M (quelante de cálcio intracelular) e Nifedipina (N) 5 μ M (bloqueador de canais de cálcio tipo L). Nenhuma dessas drogas foi capaz de bloquear o efeito do FGFb: (FGFb 256,5% \pm 26,8% n=9; B 92,8% \pm 29,2% n=9; B/FGFb 222,9% \pm 28,6% n=9); (FGFb 291,3% \pm 16,2% n=9; N 132,3% \pm 11,6% n=9; N/FGFb 242,0% \pm 25,4% n=9).

Conclusões:

Os resultados demonstram que a proliferação de células da retina induzida por FGFb é mediada pelas vias da tirosina cinase, da PI3 cinase e da PKC. Porém não há mobilização do cálcio intracelular e nem a participação dos canais de cálcio tipo L.

01.034

EFEITO DE INIBIDOR DA RECAPTAÇÃO DE NORADRENALINA SOBRE A ONTOGÊNESE DE REFLEXOS EM RATOS DURANTE PERÍODO DE ALEITAMENTO. ¹Oliveira, L. S.; ¹Oliveira de Lira, L.*; ¹Lima, A. K. S.*; ¹Leite Jr., S. F.*; ¹Sales, Aline Cabral*; ²Souza, S. L. D.; ³Nogueira, M. I.; ¹Manhães-de-Castro, R. ¹Nutrição UFPE; ²Anatomia CCS-UFPE; ³Anatomia ICB III-USP

Objetivo:

O uso de antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (citalopram), no período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso, parece retardar a maturação de reflexos em ratos. No entanto, ao se utilizar inibidores da recaptação de ambos, serotonina e noradrenalina (clomipramina), não se observou o mesmo efeito. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação isolada de um inibidor da recaptação de noradrenalina (reboxetina) sobre a ontogênese de reflexos.

Métodos e Resultados:

Ratos neonatos Wistar foram divididos em 2 grupos segundo o tratamento diário (1º ao 21º dia de vida), via subcutânea: Grupo Salina (NaCl 0,9%, n=25) e Grupo Reboxetina (20mg/Kg, n=25). Cada ninhada foi composta por 6 filhotes machos. Foi avaliada diariamente a maturação dos reflexos: preensão palmar (PP), recuperação de decúbito (RD), colocação pelas vibrissas (CV), aversão ao precipício AP, geotaxia negativa (GN), reação ao susto (RS) e reação de aceleração (RA). Os resultados foram agrupados quanto à idade de maturação (dias; mediana ± max e min). Comparando-se os dois grupos (teste Mann-Whitney) observou-se antecipação (p<0.05) do período de maturação para o reflexo de Aversão ao Precipício no grupo reboxetina (7, 4-10) em relação ao grupo Salina (8, 6-12). Para os demais reflexos não se observou alteração.

Conclusões:

O tratamento neonatal com inibidor da recaptação de noradrenalina (reboxetina), diferentemente do que aconteceu em trabalhos anteriores com a utilização de ISRS, não retardou a maturação dos reflexos. A antecipação na maturação do reflexo de aversão ao precipício, entretanto, não descarta totalmente a participação da noradrenalina em eventos do desenvolvimento nervoso. O reflexo alterado parece estar relacionado à preservação do animal frente à situação de risco. Outrossim, efeitos em outros sistemas propiciados pela droga não devem ser descartados, necessitando, entretanto de outras investigações nesse sentido.

01.035

EXPRESSÃO DE P27/KIP1 EM CÉLULAS DE RETINA DE PINTO. Portugal, L. C. L.; Ventura, A. L. M. Neurobiologia, UFF

Objetivo:

A proteína p27/Kip1 é um inibidor do ciclo celular que também estaria envolvida com fenômenos de migração e diferenciação celular. Neste trabalho, caracterizamos a expressão e a localização sub-celular de p27/Kip1 durante o desenvolvimento da retina de pinto *in vivo* e *in vitro*.

Métodos e Resultados:

A expressão de p27/Kip1 foi caracterizada por *western blotting* e imunocitoquímica. A análise do conteúdo de p27/kip1 em culturas de células de retina obtidas de embriões com 7 dias (E7) revelou um perfil de expressão que aumentava com o desenvolvimento da cultura. A expressão desta proteína aumentou a partir de C2 (163 ± 9,9% da expressão em C0, n =7), atingindo um nível máximo, de 261 ± 14,4% (n=4) em C4. A expressão desta proteína permaneceu elevada até C9 (273 ± 15,8%, n=4). Em retinas intactas, a expressão de p27/kip1 também foi transitória, sendo sua expressão máxima observada em retinas de embriões com 12 dias de incubação (144,7% e 146,8% dos níveis observados em E8 e E16, respectivamente, n=2). Nossos dados de imunocitoquímica em culturas revelaram que esta proteína é expressa em neurônios, incluindo fotorreceptores e outros tipos celulares. Pouca imunorreatividade (IR) foi observada em células gliais até o 7º dia de cultivo. Em retinas intactas de pintos de 2 dias, intensa IR foi observada nos corpos celulares, exceto em células gliais, onde a IR foi menos intensa. Corpos celulares não

marcados foram observados na camada de células ganglionares. Processos de células amácrinas marcados também foram identificados na camada plexiforme interna. Experimentos de fracionamento celular e western blotting mostraram a presença de p27/kip1 tanto em frações nucleares quanto citoplasmáticas. Enquanto em retinas de pinto com 2 dias, $25,2 \pm 3,9\%$ (n=7) da expressão de p27/kip1 foi observada na fração nuclear, em retinas de embrião com 8 dias de incubação esta proporção foi de $54,5 \pm 7,2\%$ (n=6).

Conclusões:

Nossos dados revelam que o conteúdo de p27/Kip1 aumenta e passa a se localizar no citoplasma durante o desenvolvimento da retina sugerindo um papel desta proteína na diferenciação deste tecido.

01.036

INVOLVEMENT OF THE CELLULAR PRION PROTEIN AND ITS LIGANT STI-1 IN THE ASTROCYTE DEVELOPMENT. ¹Arantes, C. P.; ²Nomizo, R.; ²Muras, A. G.*; ²Martins, V. R.; ²Lima, F. R. S. ¹Biologia Celular e Molecular Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer; ²Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer

Objetivo:

Prion diseases are transmissible fatal neurodegenerative disorders associated with the conversion of the cellular prion protein, PrPc, to its infectious isoform, PrPsc. The physiological functions of PrPc are under intensive investigation particularly those associated to brain development. We described that the PrPc binds STI1 (stress inducible protein 1) and this interaction rescue neuronal cells from apoptosis (EMBO J. 21:3307, 2002). Herein, the role of PrPc-STI1 interaction in astrocyte proliferation and differentiation, as well as intracellular signaling involved in these events were studied.

Métodos e Resultados:

Embryonic cerebral cortex primary cultures (E17) obtained from wild type (Prnp^{+/+}) and PrPc gene ablated (Prnp^{0/0}) mice (Nature 16:577, 1992) were performed. After 5 days, sub confluent astrocyte were treated with recombinant STI1 (3.3ng/μl) for 24 hours and their proliferation evaluated by tritiated thymidine incorporation for more 24hours. We showed that STI1 inhibited Prnp^{+/+} astrocyte proliferation by $67 \pm 8\%$ (p<0.01) and Prnp^{0/0} cells by $60 \pm 12\%$ (p<0.01) (compared to untreated cells), indicating that this event was independent on PrPc expression. The STI1 effect on astrocyte proliferation was reversed by a PKC inhibitor (Chelerytrin Ci) while no effect was observed when PKA (KT5720), PI3K (Ly294002) or MAPK (U0126) blockers were applied. On the other hand, when Prnp^{+/+} confluent astrocytes (15 days in culture) were treated with STI1 (33ng/μl), closely to 100% of the cells differentiate from a flat to a process-bearing morphology, while no alteration was observed in Prnp^{0/0} ones. This morphological change was repressed by a MAPK inhibitor but not by PKC, PKA or PI3K blockers.

Conclusões:

Our data indicate that STI1 is able to mediate PrPc independent astrocyte proliferation through PKC pathway and PrPc dependent astrocyte differentiation through MAPK pathway (Supported by FAPESP).

01.037

O EFEITO DA OUABAÍNA NA SOBREVIDA DE CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA DE RATOS NEONATOS *IN VITRO* É MEDIADO DIRETAMENTE PELA PKC. Correa, G. R.; Araújo, E. G. Neurobiologia, UFF

Objetivo:

Diferentes vias de sinalização intracelular são ativadas por fatores tróficos. O objetivo do nosso trabalho foi estudar os efeitos da ouabaína na sobrevivência de células ganglionares (CG) da retina de ratos neonatos, estabelecendo uma relação entre este efeito e suas vias já descritas.

Métodos e Resultados:

24 horas após o nascimento, os ratos Lister Hooded receberam injeções de HRP 30% em DMSO 2% nos colículos superiores. Após 16 horas, os animais foram sacrificados e suas retinas dissecadas em solução salina sem Ca²⁺ e Mg²⁺, dissociadas quimicamente e mecanicamente e plaqueadas em laminulas previamente tratadas com p-L-o (50μg/ml), na densidade de $1,0 \times 10^5$

céls./cm². As culturas foram mantidas por um período de 2-4h na presença de meio de cultura completo. Após este período, as lamínulas correspondentes ao controle de 100% da população de CG (800 a 1000 céls/placa) foram fixadas em aldeídos e as demais receberam tratamento com as drogas a serem testadas. A revelação da HRP foi feita por reação histoquímica, que utiliza a tetrametilbenzidina como cromógeno. O n° de CG foi obtido por contagem em microscopia de campo claro com aumento de 400X. Nossos resultados mostram que o tratamento com ouabaína 3,0nM por 48h, aumenta a sobrevida das CG (ct48h= 51,5% ± 3,87% e oua= 99,2% ± 1,5%, n=9). Analisando a participação das vias ativadas pela ouabaína, observamos que a brefeldina A (BFA) 30ng/ml, o K252a 50µM, o BAPTA-AM 20µM e 30µM, a genisteína 10µM, a herbimicina 1µM, a nifedipina 5µM, o PD98059 50µM e 60µM, o LY294002 25µM e a tyfostina 2,5µM, não reverteram o efeito da ouabaína na sobrevida das CG. O tratamento com cloreto de queleritrina (CC) 1,25µM inibiu o efeito da ouabaína (ct48h= 55,78% ± 2,83; cc=53,73% ± 2,65%; oua=85,73% ± 2,83; oua+cc=60,33% ±3,0%, n=9).

Conclusões:

Nossos resultados sugerem que a ouabaína esteja regulando a sobrevida das CG em culturas, através de um mecanismo que envolve a PKC.01.038

PARTICIPATION OF SYNAPTOBREVIN II IN EXOCYTOSIS EVENTS DURING NEURONAL DIFFERENTIATION. ¹ Majumder, P.; ²Fang, Q.; ²Lindau, M.; ¹Ulrich, H.; ¹Bioquímica USP; ²Instituto de Física Cornell University

Objetivo:

Membrane trafficking plays an important role in regulating the surface expression of membrane proteins such as neurotransmitter receptors and is also involved in neurotransmitter release. Our question is: how is synaptobrevin II (VAMP II) involved in exocytosis events during neuronal differentiation in order to develop the functional neuron? After triggering the process of neuronal differentiation by addition of retinoic acid, gene expression is altered by switching on and off specific genes, including such controlling neurotransmitter release.

Métodos e Resultados:

VAMP II gene expression is down-regulated during on-going neuronal differentiation as determined by RT-PCR. We have detected synaptobrevin II gene expression as part of the vesicle in undifferentiated cells and functional neurons. To understand the participation of the exocytosis process, we are knocking down the VAMP II expression using RNA interference (RNAi). We have tested 3 different small interfering RNA (siRNA) fragments which had been chosen against different portions of the mRNA in order to identify which of these siRNA is most effective in knocking down VAMP II mRNA expression. Using calcium phosphate transfection, the siRNA fragments V2, V13 and V6 knocked down VAMP II expression around ± 60 %, ± 10 % and ± 40 % in mouse chromaffins cells, respectively. The most effective fragment siRNA fragment (V2), was permanently integrated in P19 cells as short hairpin RNA (shRNA) under the control of a CMV promoter in order to study the exocytosis events following VAMP II knock-down experiment.

Conclusões:

In order to understand the participation of VAMP II during neuronal differentiation of P19 cells, we have detected VAMP II expression during neuronal differentiation of P19 cells. VAMP II gene expression is below detection limits in pluripotent, undifferentiated cells. Beginning from day 8 following induction to neuronal differentiation, P19 have developed to functional neurons, express neuron-specific proteins and also VAMP-II.

After testing three fragments of siRNA targeting VAMP II RNA, we have selected an effective one which promoted 60 % of down regulation VAMP II using transient transfection experiments. We are evaluating exocytosis events during neuronal differentiation process in functional P19 neurons by using FM1-43 as fluorescent reporter of exocytosis events in the absence and presence of RNA interference.

01.039

RESTAURAÇÃO DA PLASTICIDADE RETINOTECTAL PELA RETINTRODUÇÃO DIETÉTICA DE TRIPTOFANO DURANTE E APÓS O PERÍODO CRÍTICO. Maciel, R. D. S.; Penedo, L. A.*; Serfaty, C. A.; Campello-Costa, P.; Gonzalez, E. M. C. Neurobiologia UFF

Objetivo:

Em roedores a especificação dos circuitos neurais ocorre durante o período pós-natal com marcante influência de fatores ambientais. A serotonina (5-HT), cuja única fonte metabólica é o triptofano proveniente da alimentação, está envolvida diretamente nos processos de desenvolvimento neural uso-dependente e nos mecanismos de plasticidade sináptica. Estudamos o efeito da restrição nutricional de triptofano sobre a plasticidade do sistema visual de roedores.

Métodos e Resultados: Neste trabalho utilizamos um modelo de plasticidade de projeções retinotectais após lesões unilaterais de retina no décimo dia pós-natal (P10). O padrão de inervação da projeção retinotectal ipsilateral foi avaliado através da injeção intraocular de peroxidase (HRP) entre P14 e P41 em animais alimentados durante 10 a 32 dias com uma dieta pobre em triptofano baseada em milho e gelatina (TRY-). Os resultados foram comparados dados os obtidos de animais alimentados com a mesma dieta, acrescida de quantidades-padrão de triptofano (dieta suplementada, TRY+), ou dieta padrão Novital. Os resultados sugerem uma diminuição na capacidade de brotamento de axônios intactos para regiões desnervadas do colículo superior após uma lesão na retina contralateral nos animais TRY-. A reintrodução de triptofano entre P10 e P14 não foi capaz de restaurar a plasticidade retinotectal, mas a realimentação entre P10-21 ou P10-28 restaurou a capacidade plástica dos axônios intactos. A re-alimentação com triptofano entre P28-41 também restaurou parcialmente a plasticidade retinotectal apesar do fim do período crítico.

Conclusões: Estes achados evidenciam a importância do triptofano como modulador de plasticidade induzida por lesão durante e após o período crítico de reorganização dos circuitos sinápticos centrais.

01.040

VIAS DE SINALIZAÇÃO DO PMA NA SOBREVIDA DE CÉLULAS GANGLIONARES DA RETINA DE RATOS NEONATOS *IN VITRO*. ¹Cunha, K. C. S.; ²Santos, A. A.*; ¹Araújo, E. G.; ¹Neurobiologia, UFF; ²IBCCF-UFRJ

Objetivo:

Avaliar a ação do PMA na sobrevivência de células ganglionares (CG) da retina de ratos neonatos, estabelecendo a via de sinalização utilizada pela proteína cinase C.

Métodos e Resultados:

Ratos neonatos (Lister Hooded) recebem injeções de HRP 30% nos colículos superiores e após 16 horas são sacrificados, suas retinas dissecadas em solução salina sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , tripsinizadas (0,1%, 15 min), dissociadas mecanicamente e plaqueadas em laminulas tratadas com poli-L-ornitina (50 μ g/ml), na densidade de $6,5 \times 10^4$ cels./cm². As diferentes drogas são adicionadas após 2-4h "in vitro". A HRP é revelada por reação histoquímica que utiliza a tetrametilbenzidina como cromógeno. O número de CG é obtido por contagem sistemática em microscopia de campo claro com aumento de 400X. Nossos resultados indicam que o tratamento com PMA, por 48h, aumenta em 100% a sobrevivência das células ganglionares. O melhor efeito é observado na concentração de 10ng/mL (CT48h=59,3% \pm 3,0%, PMA=105% \pm 2,6%, n=9). O tratamento com 50 μ M de PD98059 aboliu o efeito do PMA (CT48h=64,92% \pm 2,4, PMA=100,5% \pm 0,5, PD98059=70,25% \pm 6,12, PMA+PD98059 =62,88% \pm 3,43, n=7). A inibição da PI3 cinase e da liberação de polipeptídeos não alterou o efeito do PMA.

Conclusões:

Os resultados obtidos com o PMA sugerem que o aumento na sobrevivência das CG depende da ativação da PKC e da via da MAPkinase.