

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

RENATO FIGUEIREDO DE SANTANA



**EXPRESSÃO DE SUBUNIDADES DO RECEPTOR DE
GLUTAMATO TIPO AMPA E DE PROTEÍNAS LIGANTES
DE CÁLCIO NOS NÚCLEOS DA BASE DURANTE O
DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DE POMBOS**

Este exemplar corresponde à redação final

da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Renato Figueiredo de Santana

é aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre
em Biologia Funcional e
Molecular, na área de
Fisiologia

Orientador: Prof. Dr Cláudio Antonio Barbosa de Toledo

CAMPINAS, 2007

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	TIUNICAMP
	Sa59e
V. _____	Ed. _____
TOMBO BC/	73090
PROC.	16.145-07
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	14,00
DATA	27/06/07
BIB-ID	415096

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

*Título diferente
da página de
reverso*

Sa59e Santana, Renato Figueiredo de
 Expressão de subunidades do receptor de glutamato e de proteínas ligantes de cálcio nos núcleos da base durante o desenvolvimento pós-natal de pombos / Renato Figueiredo de Santana. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Cláudio Antonio Barbosa de Toledo.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.


1. Biologia do desenvolvimento. 2. Neurobiologia. 3. Pombo. +4. Maturação. 5. Neurônios motores. I. Toledo, Cláudio Antonio Barbosa de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Developmental time-course for the expression of ampa-type subunits and calcium binding proteins in pigeon basal ganglia.
Palavras-chave em inglês: Development biology; Neurobiology; Pigeons; Maturation; Motor neurons.
Área de concentração: Fisiologia.
Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.
Banca examinadora: Cláudio Antonio Barbosa de Toledo, Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Newton Sabino Canteras.
Data da defesa: 17/04/2007.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 17 de Abril de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari



Assinatura

Prof. Dr. Newton Sabino Canteras



Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas

Assinatura

Profa. Dra. Raquel Simoni Pires

Assinatura

À:

Cristina, minha esposa, que de diferentes maneiras caminhou
ao meu lado, incentivou e compreendeu;

Sr.Santana e D. Glória, meus pais, que nunca mediram esforços
e me ensinaram os verdadeiros valores;

Regina, minha irmã. Se você soubesse o quanto
torço por você!;

Ao Sr. Claudemir e D. Vera, meus sogros,
pelo “presente” tão importante.

Agradeço

À DEUS;

Ao Prof. Cláudio Toledo,
cuja seriedade, empenho e dedicação são referências para mim;

Aos colegas do neuro I e II, (em especial você, Marcinha),
sem vocês, tudo seria diferente;

À Profa. Raquel S. Pires,
pelas reflexões;

À FAPESP,
pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
I. Introdução.....	01
II. Objetivos.....	23
III. Materiais e Método.....	24
IV. Resultados.....	33
IV.1. Aspectos morfológicos	33
IV.1.1. Giemsa.....	33
IV.1.2. Receptores do tipo AMPA	36
IV.2 Aspectos quantitativos.....	67
IV.2.1 Giemsa.....	67
IV.2.2 Receptores do tipo AMPA.....	74
V. Discussão.....	93
VI. Conclusões.....	109
VII. Referências Bibliográficas.....	110

Resumo

Glutamato, um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central participa do tráfego de informação neural nos núcleos de base de aves e mamíferos através de receptores ionotrópicos do tipo AMPA. Investigamos a variação da expressão das subunidades que compõem esse receptor em áreas motoras telencefálicas do encéfalo de pombos (*C. lívia*) em diferentes idades: do nascimento até 10 dias de vida e na idade adulta. As aves foram perfundidas e seus cérebros foram processados por imunohistoquímica usando anticorpos contra as subunidades GluR1 e GluR4 e contra um epítipo comum às subunidades GluR2 e GluR3 (GluR2/3); além disso anticorpos contra proteínas ligantes de cálcio foram utilizados como marcadores. O globo pálido (GP) apresentou marcação crescente de neurônios GluR1+ durante os primeiros dias de vida, atingindo pico em P3, decaindo em seguida e sendo novamente expresso na fase adulta. A expressão de GluR2/3 mostrou-se relativamente estável no GP durante os primeiros dias de vida, mas decaiu após P3. Células expressando GluR4 foram principalmente evidentes entre P3 e P7 no GP. Com relação ao corpo estriado, a neurópila estriatal foi intensamente marcada para GluR1 e GluR2/3, contrastando com a pobre marcação de neurópila apresentada pelo globo pálido. Nos diferentes estágios de desenvolvimento a neurópila estriatal foi pobre em GluR4. O número de células GluR1+ no corpo estriado mostrou pico máximo em P5 e o de GluR2/3+ foi crescente ao longo das idades. A região lateral do estriado lateral indicou marcação semelhante à região central em todas as idades, com padrão estável de crescimento para GluR2/3, um pico em P5 para GluR1 e escassa presença de marcação GluR4+ em todas as idades. O número de células PV+ decaiu durante o desenvolvimento e CB foi expressa nos gânglios da base somente na fase adulta. Nossos resultados indicam que subunidades do receptor de glutamato do tipo AMPA são diferencialmente expressas durante o crescimento pós-natal. Estas alterações podem estar relacionadas com mudanças funcionais que conduzem à estruturação final da circuitaria sináptica envolvida nas respostas motoras desta espécie, cujo desenvolvimento até o estágio de auto-suficiência depende dessa habilidade.

Abstract

AMPA-type glutamate receptors mediate the responses of neurons of the striatal part of the basal ganglia to excitatory cortical input in both birds and mammals. We have investigated the maturation of the expression of the four AMPA receptor subunits in 42 pigeons (*C. livia*) at different stages, from hatching (P0) to 1, 3, 5, 7, or 10 days posthatch (P1-10), to adulthood. Pigeons are altricial, become relatively mobile by 12 days, and independent by one month. The birds were perfused and their brains processed by standard immunolabeling using antibodies against the GluR1 or GluR4 subunits, or against an epitope common to both GluR2 and GluR3 (GluR2/3) subunits. Antibodies against calcium binding proteins parvalbumin (PV) and calbindin (CB) were used as neuronal marker. Globus pallidus at P0 showed labeling in neurons for GluR1 and GluR2/3, which reached its peak at P3. The GluR1 perikaryal labeling in globus pallidus decreased after P5, but was labeling another time at adulthood. GluR2/3 remained stable into early age, but decrease after P3. The perikarya of globus pallidus and their processes were also labeled for GluR4 at P0, and GluR4 cells GluR4+ was peak between P3 and P7. PV was decrease during the development. CB was expressed in basal ganglia only at adulthood. At P0, the striatal neuropil was intensely (though diffusely) labeled for GluR1 and GluR2/3, which contrasted distinctly with the poor neuropil labeling for both in globus pallidus. GluR1+ was peak at P5 and GluR2/3 increase during the time. At all stages, the striatal neuropil immunolabeling was poor for GluR4, although neurons were labeled for GluR4. GluR4 was peak at P7. PV was peak at adult age. The labeling of GluR2/3 in lateral region of lateral striatum was similar to central region, but GluR1+ was increase by ages. Our results indicate that AMPA receptor subunits was expressed differentially at the development post-hatching. This may support maturational changes that facilitate the motor development of this altricial species.

I. INTRODUÇÃO

Diversas estruturas estão envolvidas no processamento da informação que envolve motricidade, sendo a medula espinhal é a via final comum de todos os movimentos, sejam eles reflexos automáticos ou voluntários. Os voluntários, de gênese mais complexa, iniciam-se no encéfalo com distintas estruturas funcionando em paralelo e suas vias de saída são responsáveis pelo controle dos circuitos que geram padrões motores. Duas estruturas associadas, o cerebelo e os núcleos da base estão diretamente envolvidos com o movimento, tendo crucial importância na sua organização e controle (GHEZ, 1991).

Amniotas, como mamíferos, aves e répteis, apresentam o conjunto de estruturas conhecidas como núcleos da base muito similares em suas conexões e mediadores sinápticos (KARTEN & DUBBELDAM, 1973; KITT & BRAUTH, 1982; REINER *et al.*, 1983; MEDINA *et al.*, 1995; VEENMAN *et al.*, 1995; MEDINA & REINER, 1997; REINER *et al.*, 1998; JIAO *et al.*, 2000; REINER *et al.*, 2001; REINER, 2002). Em todos estes grupos pode ser observada a seguinte divisão anátomo-funcional dos núcleos da base: a porção dorsal ou somática, que está relacionada às funções sensorio-motoras, e a porção ventral, relacionada às funções límbicas (MEDINA e REINER, 1995; BUTLER e HODOS, 1996; REINER, 1998; REINER, 2002).

Nos mamíferos primatas, o grupo dorsal é composto por dois principais aglomerados nucleares: o corpo estriado e o globo pálido. Também compõem a divisão dorsal dos gânglios da base o núcleo subtalâmico, a substância negra e a formação reticular pontina parabraquial. O grupo funcional ventral é composto

pela *substantia innominata* (inclui núcleo basal de Meynert), o núcleo acumbens e o tubérculo olfatório (MEDINA e REINER, 1995; BUTLER e HODOS, 1996; REINER, 1998; REINER, 2002).

Dois fortes indícios de conservação filogenética nos núcleos da base são 1) a preservação da maquinaria neuroquímica e 2) a preservação das conexões internas e externas estabelecidas nas diferentes estruturas componentes de um sistema. Estes fatores de similaridade, no que diz respeito aos núcleos de base, parecem estar presentes em mamíferos, aves e répteis (MEDINA e REINER, 1995; BUTLER e HODOS, 1996; REINER, 1998; REINER, 2002) sendo que ambos são consequência de sua história embriológica comum. Durante o desenvolvimento embrionário, alguns estudos demonstraram que a expressão de genes homeobox e outros genes regulatórios exercem um importante papel na especificação regional. Esta especificação regional revelou a existência de domínios espacialmente restritos, chamados prosômeros. Regiões correspondentes aos núcleos da base no embrião parecem expressar os mesmos genes homeobox tanto em camundongos quanto em pintos, o que também corrobora com os indícios de conservação filogenética destas estruturas (RUBENSTEIN, 1994; MEDINA e REINER, 1995; PUELLES, *et al.*, 1999; PUELLES, *et al.*, 2000).

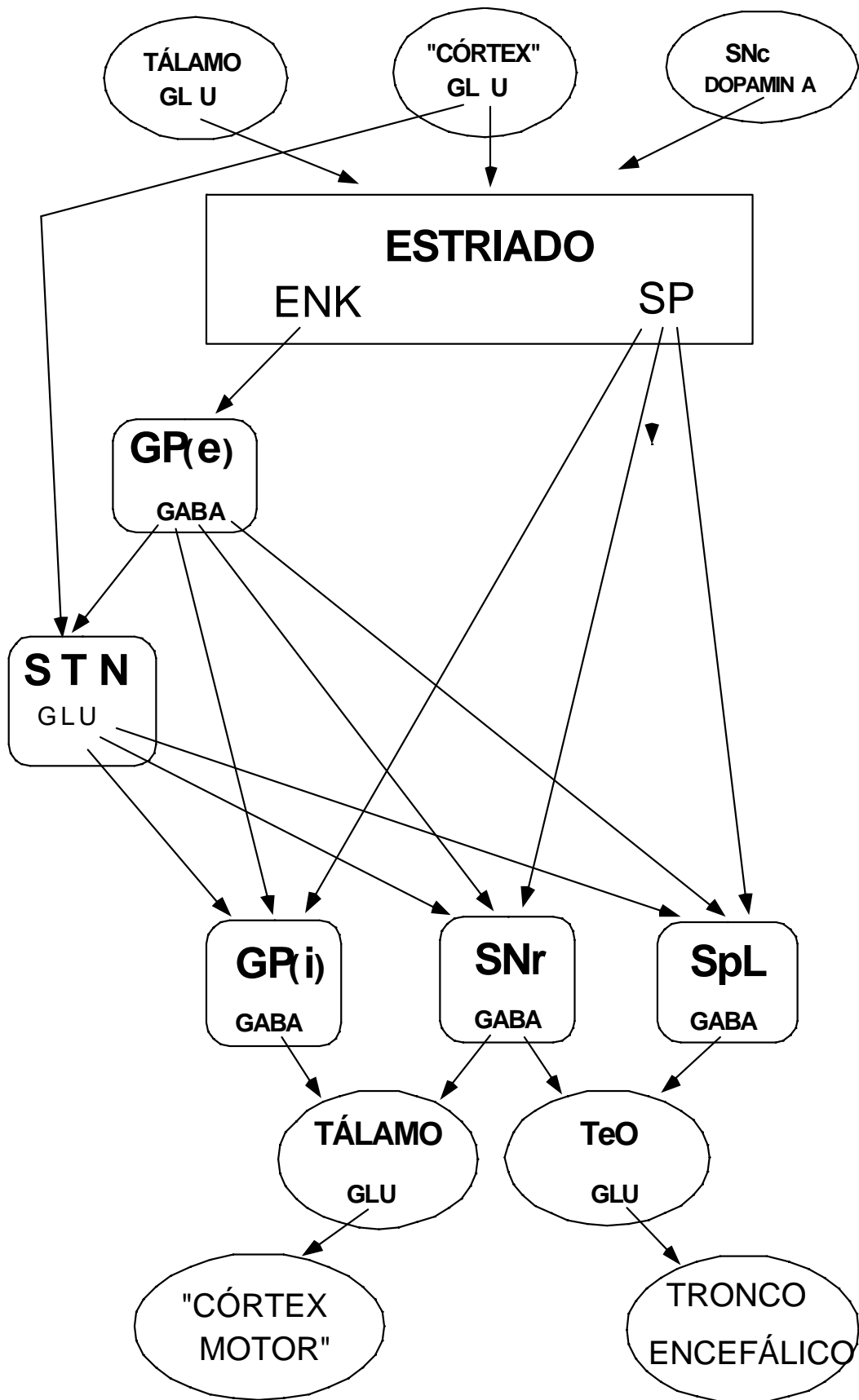
As divisões anatômicas dos diferentes núcleos que compõem os núcleos da base durante a evolução filogenética foram, e continuam sendo alvo de estudos envolvendo vários aspectos como segue nas próximas seções deste texto.

COMPLEXO ESTRIATAL

O corpo estriado é a porta de entrada das aferências que se projetam aos núcleos da base. Ele recebe aferências de praticamente todas as regiões corticais, sendo as principais provenientes de áreas associativas nos lobos frontal e parietal, também com contribuições substanciais dos córtices temporal, insular e cingulado. Tálamo e tronco encefálico também integram o conjunto de estruturas que enviam aferências sobre o estriado (KARTEN & DUBBELDAM, 1973; MEDINA e REINER, 1995; BUTLER e HODOS, 1996; REINER, 1998; REINER *et al.*, 2001; REINER, 2002).

Independente da espécie, as projeções córtico-estriatais são excitatórias e glutamatérgicas. Em mamíferos felinos e primatas, o corpo estriado é dividido em núcleo caudado e putâmem, separados pela cápsula interna. Esta divisão é apenas morfológica, pois funcionalmente são muito semelhantes. As projeções corticais ao caudado e ao putâmem não são, contudo, equivalentes. O núcleo caudado recebe projeções corticais principalmente dos córtices associativos multimodais e áreas motoras do lobo frontal que controlam o movimento dos olhos. O putâmem, por outro lado, recebe aferências dos córtices sensoriais somáticos primários e secundários do lobo parietal, dos córtices visuais secundários, dos córtices motor e pré-motor do lobo frontal e áreas associativas do lobo temporal. Essa divisão sugere a presença de diferentes vias atuando em paralelo. Já em roedores, não há divisão, sendo apenas chamado de estriado ou complexo caudado-putâmem (McGEORGE e FAULL, 1989; MEDINA e REINER, 1995; LENT, 2001; REINER 2002; LAVERGHETTA *et al.*, 2005; PURVES, 2005). As principais conexões que envolvem o estriado estão representadas na figura 1.

Figura 1: Esquema representativo das principais conexões envolvidas no processamento da informação pelos núcleos da base em aves. As principais fontes de projeção ao estriado são de origem cortical (ou de áreas correspondentes em aves), talâmica e nigral. Observe que parte da informação que chega ao estriado é transmitida diretamente ao globo pálido interno, substância negra parte reticulada e núcleo espiriforme lateral. No entanto, outra parte da informação do estriado que chega ao globo pálido interno, substância negra parte reticulada e núcleo espiriforme lateral é transmitida de forma indireta, sendo processada no núcleo subtalâmico e globo pálido externo. Abreviaturas: ENK: encefalina; GABA: ácido gama amino butírico; GLU: glutamato; GP: globo pálido externo; GPi globo pálido interno; SNc: substancia negra, parte compacta; SNr: substancia negra, parte compacta; SpL núcleo espiriforme lateral; STN: núcleo subtalâmico; TeO tecto óptico.



Em aves, o complexo estriatal dorsal é composto de dois grupos celulares contíguos: estriado lateral (LSt, antigamente chamado *paleostriatum augmentatum*) e o estriado medial (MSt, antes chamado de lobo paraolfatório). Estas duas porções não são equivalentes às porções do estriado em primatas. Enquanto que em mamíferos, tanto caudado quanto putâmem tem como principal alvo de projeções o globo pálido, o MSt envia projeções em massa para a substância negra, mas poucas se direcionam ao globo pálido. Mesmo sendo composto parcialmente por neurônios médio-espinhais, o MSt parece não apresentar todos os tipos celulares presentes em neurônios estriatais como no núcleo caudado de mamíferos (REINER *et al.*, 2004).

Regiões telencefálicas de aves não são organizadas em lâminas estratificadas típicas, como no caso de mamíferos, mas em locais topograficamente similares, como hiperpálido apical (antigo Wulst), área corticóidea dorsolateral (antigo *pallium* dorsolateral ou externo), *arcopallium* dorsal (antigo *archistriatum* dorsal) e flexura dorsal ventricular (antigo *dorsal ventricular ridge* - DVR). Estas áreas corticais estão envolvidas no processamento sensorial e motor de vertebrados, sendo que suas projeções ao estriado evidenciam o papel dos gânglios da base no controle do movimento. A projeção “córtico-estriatal”, também em aves, utiliza o neurotransmissor excitatório glutamato (McGEORGE e FAULL, 1989; VEENMANN *et al.*, 1995; REINER *et al.*, 2004; JARVIS *et al.*, 2005).

O tálamo dorsal em aves também envia aferências para o estriado. Os núcleos talâmicos que são responsáveis por essa projeção parecem ser topograficamente e hodologicamente comparáveis em aves e mamíferos (WILD, 1987). Estes núcleos recebem informações principalmente sensoriais e

motoras, esta última em menor quantidade. A terceira grande fonte de aferência para o estriado é proveniente das células dopaminérgicas da região tegmental, que inclui área tegmentar ventral, substância negra e campo retrorubral (FALLON e MOORE, 1978; MEDINA e REINER, 1995).

Tanto em mamíferos quanto em aves e répteis, o corpo estriado é composto principalmente por dois tipos celulares: os neurônios de tamanho médio que apresentam espinhas em seus dendritos, chamados médio-espinhais, e os neurônios não-espinhais.

Os neurônios médio-espinhais compõem cerca de 95% da população do corpo estriado e são alvo das projeções corticais. Virtualmente, todos os neurônios médio-espinhais utilizam o ácido gama amino butírico (GABA) como neurotransmissor; embora todos co-localizem com uma outra substância neuromediadora. Assim, subpopulações celulares no estriado podem ser divididas em neurônios GABAérgicos que contêm o neuropeptídeo substância P (SP) ou neuropeptídeos derivados da preprodinorfina (DYN) e neurônios GABAérgicos que contêm encefalina (ENK) (ANDERSON e REINER, 1990a; VEENMAN e REINER, 1994; LENT, 2001; PURVES, 2005). Os neurônios que contêm ENK projetam para o globo pálido, enquanto neurônios SP+ projetam tanto para substância negra quanto para núcleo entopeduncular (homólogo ao globo pálido medial de primatas) (GERFEN, 1992).

A distribuição espacial é outro fator importante que reflete outra subdivisão funcional destes neurônios. Embora estas células estejam distribuídas por todo o território estriatal, elas ocorrem em dois tipos de agrupamentos chamados:

“mácula” (também chamado “estriatossoma” ou “placas”) e “matriz” circundante, distinção que parece estar relacionada a conceitos neuroquímicos e hodológicos. A matriz é imunorreativa à acetilcolinesterase (AChE), a enzima de degradação da acetilcolina. As máculas, no entanto, apesar de apresentarem fraca expressão desta enzima (AChE), podem ser identificadas quando o tecido é processado com anticorpo contra encefalina (ENK) ou contra substância P (SP). Algumas máculas são ENK+ enquanto outras são SP+, não havendo sobreposição. Placa e matriz também participam de circuitos diferentes. A matriz recebe aferências principalmente da área motora primária (MI) e sensorial primária (SI) e projeta, sobretudo para o globo pálido medial (Gpm) e parte reticular da substância negra (SNr). Em contraste, as placas são inervadas pelo lobo pré-frontal e certas estruturas límbicas, como amígdala por exemplo, e sua principal projeção é a parte compacta da substância negra. Estas divisões neuroquímicas e anatômicas sugerem que, no estriado, várias funções fisiológicas são servidas por sistemas paralelos. (KINGSLEY, 2001; PURVES, 2005). A divisão em mácula e matriz parece ser atributo exclusivo de mamíferos, especialmente o núcleo caudado. Em aves, neurônios e fibras AChE+, SP+ e ENK+ estão distribuídos de maneira relativamente uniforme no estriado (REINER *et al.*, 1998).

As projeções eferentes estriatais têm como origem neurônios médio-espinhais e têm como principais alvos o globo pálido e a região tegmental. Em mamíferos, neurônios SP/DYN/GABA projetam para o globo pálido medial e substância negra parte reticulada e compacta, enquanto que neurônios ENK/GABA chegam ao globo pálido lateral e substância negra compacta. Em aves, o globo pálido recebe aferência de ambos os tipos neuronais (ANDERSON e REINER,

1990 a; BERENDSE, *et al.*, 1992; MEDINA e REINER, 1995; REINER *et al.*, 1998).

Já os neurônios não espinhais, que representam os 5% restantes da população, são interneurônios e três diferentes populações são conhecidas: 1) grandes neurônios não espinhais colinérgicos; 2) neurônios não espinhais de tamanho médio co-contendo somatostatina (SS), neuropeptídeo Y (NPY), NADPH-diaforase e a enzima de síntese do óxido nítrico (NOS); 3) neurônios não espinhais de tamanho médio, contendo GABA, a proteína ligante de cálcio parvalbumina (PV) e o hexapeptídeo relacionado à neurotensina (LANT6) (ANDERSON e REINER, 1990b; VEENMAN e REINER, 1994; MEDINA e REINER, 1995).

COMPLEXO PALIDAL

O complexo palidal dorsal situa-se ventralmente ao corpo estriado e em mamíferos é dividido em: 1) globo pálido lateral ou externo nos primatas, e chamado simplesmente de globo pálido nos não primatas; e 2) globo pálido medial ou interno nos primatas, ou núcleo entopeduncular nos não primatas. Já em aves, o complexo palidal dorsal não possui divisões e é chamado simplesmente de globo pálido, antes chamado *paleostriatum primitivum* (MEDINA e REINER, 1995; REINER *et al.*, 2004; JARVIS *et al.*, 2005).

O globo pálido, como já mencionado, é alvo de projeções estriatais. Ele representa o estágio final do processamento da informação nos núcleos da base,

visto que dele partem as projeções eferentes deste conjunto de grupamento celular (figura 1). Porém, em contraste à grande similaridade das projeções estriatais entre os amniotas, as eferências palidais apresentam algumas diferenças entre mamíferos e aves. A maior parte da projeção palidal, em mamíferos, segue em direção ao tálamo (núcleos talâmicos ventral lateral e ventral anterior, e daí para córtex pré-motor) e tegmento (substância negra parte reticulada e compacta). Em aves e répteis, no entanto, apesar de projeção semelhante para o tegmento, o outro alvo de projeção palidal é o pré-tecto de aves, especificamente o núcleo espiriforme lateral, influenciando no controle visuomotor destas espécies ou o núcleo da comissura posterior de répteis. Outra eferência palidal é o núcleo subtalâmico (antigo núcleo anterior da ansa lenticular de aves). (KARTEN e DUBBELDAM, 1973; KITT e BRAUTH, 1982; REINER *et al.*, 1982a; REINER, *et al.*, 1982b; MEDINA e REINER, 1995; VEENMAN *et al.*, 1995; MEDINA e REINER, 1997; PLENZ *et al.*, 1998; JIAO *et al.*, 2000).

Tanto em aves quanto em mamíferos, o principal tipo neuronal palidal é de projeção e expressa o transmissor inibitório GABA, sendo que a maioria também apresenta LANT6 e PV (REINER e ANDERSON, 1993; VEENMAN e REINER, 1994; MEDINA e REINER, 1995).

OUTROS NÚCLEOS

O complexo nigral é formado pela substância negra e área tegmental ventral. Projeções estriatais e palidais são suas principais fontes aferentes, recebendo ainda entrada cortical, subtalâmica e do núcleo pedúnculo-pontino tegmental.

Em mamíferos, a substância negra também pode ser dividida em duas subpopulações, compacta e reticulada. A substância negra, parte compacta (SNc) contém neurônios dopaminérgicos (DA+) que se projetam para estriado (caudado-putâmen). Já a substância negra, parte reticulada (SNr), contém neurônios GABAérgicos e se projeta para o tálamo, o colículo superior, a formação pontina parabraquial, além do estriado. A parte reticulada da substância negra é considerada por alguns como a subdivisão funcional do globo pálido, pois enquanto este último se projeta para o córtex motor via núcleos talâmicos ventral lateral e ventral anterior, a primeira também estabelece conexão com neurônios motores do colículo superior que comandam movimento dos olhos sem qualquer passagem pelo tálamo (MEDINA e REINER, 1995). Apesar de menos distinguível, as divisões e conexões da substância negra em aves parecem seguir o mesmo padrão de divisão (FALLON e MOORE, 1978; ANDERSON e REINER, 1991; SMEETS, 1991; VEENMAN e REINER, 1994; MEDINA e REINER, 1995; PURVES, 2005).

O núcleo subtalâmico recebe projeções aferentes que chegam através da parte lateral do globo pálido, córtex cerebral e substância negra. Este núcleo contém grandes quantidades de neurônios glutamatérgicos que projetam para ambas as porções do globo pálido e para substância negra (PLENZ *et al.*, 1998; JIAO, *et al.*, 2000).

O núcleo pedúnculo pontino tegmental, situado na formação reticular pontina parabraquial, recebe projeções gabaérgicas da substância negra e é fonte de projeções colinérgicas para o neostriado, substância negra e motoneurônios do tronco encefálico (ERRO *et al.*, 1999; ERRO e GIMÉNEZ-AMAYA, 1999).

GLUTAMATO

O neurotransmissor glutamato (Glu) e seus receptores exercem importante função nos circuitos que englobam os gânglios da base. Como já citado, as projeções cortico-estriatais são glutamatérgicas. As projeções do córtex para o núcleo subtalâmico e deste para o pálido também são glutamatérgicas (CHEN, 1998). Juntamente com aspartato, Glu é dos mais proeminentes sistemas excitatórios do sistema nervoso central (SNC). O glutamato é uma molécula chave no encéfalo, estando envolvida com metabolismo celular e neurotransmissão. É ainda precursor para um neurotransmissor igualmente importante: o ácido γ -aminobutírico (GABA). Glu, assim como glutamina (Gln) são sintetizados no cérebro, sendo suas concentrações intracelulares altas e extracelulares baixas, assim mantidas pela alta afinidade por sistemas de captação Na^+ -dependentes (KVAMME, *et al.*, 1998).

Glutamato não atravessa a barreira hemato-encefálica sendo sua síntese local (terminal neuronal). Após sua liberação, o glutamato deve ser rapidamente eliminado do espaço extracelular. A retirada do transmissor glutamato da fenda, e o conseqüente cessamento de sua ação, é então, determinada pela recaptação exercida pelo neurônio pré-sináptico e pela captação efetuada por astrócitos, não havendo enzima de quebra presente na fenda sináptica (TAKUMI *et al.*, 1998). A captação ou recaptação do glutamato ocorre através de co-transportadores Na^+ /Glu. Nas células gliais o glutamato é então convertido a glutamina (Gln) que passa para o fluido extracelular e é então captado pelo neurônio pré-sináptico. A glutamina é hidrolizada na mitocôndria do neurônio pré-sináptico, tornando-se novamente glutamato (NICHOLLS, 1994).

RECEPTORES DE GLUTAMATO

Duas classes de receptores podem mediar a ação do glutamato: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Dentre os ionotrópicos, estão presentes os dos tipos AMPA, KAINATO e NMDA, assim denominados em função de seus agonistas seletivos (respectivamente ácido α -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropiónico; ácido cáinico e *N*-metil-D-aspartato). Já os metabotrópicos pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína-G, que pode modular a transmissão sináptica. A localização precisa de receptores (pré, pós ou peri-sinápticos) é de grande importância para o tráfego da informação neural, inclusive para o desenvolvimento de drogas terapêuticas (NICHOLLS, 1994).

Receptores dos tipos AMPA e KA, por suas semelhanças funcionais, são muitas vezes agrupados e chamados não-NMDA. Este conjunto de receptores medeia um vasto número de sinapses excitatórias rápidas, enquanto os receptores NMDA parecem desempenhar um papel especializado na memória e aprendizado (NICHOLLS, 1994).

Receptores de glutamato do tipo AMPA formam canais iônicos que, quando ligados ao glutamato, permitem o influxo de cátions, geralmente Na^+ e, em alguns casos, de Ca^{2+} além do efluxo de K^+ . Sua estrutura é composta de quatro subunidades protéicas circundando um espaço que constitui o canal iônico e aceita várias combinações funcionais dentre quatro variantes denominadas GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4. Dessa forma, um receptor do tipo não-NMDA pode ter composição homo-oligomérica, quando as quatro subunidades que formam o

tetrâmero são iguais (uma única variante) ou hetero-oligomérica, quando é formado por diferentes subunidades (WENTHOLD e ROCHE, 1998).

Cada subunidade do receptor de glutamato apresenta três domínios transmembrânicos completos (M1, M3, M4) e um segmento de alça reentrante (M2), que contribui para a abertura do canal iônico. As subunidades também apresentam uma porção N-terminal extracelular e uma porção C-terminal intracelular (BORGES e DINGLEDINE, 1998).

As diferentes subunidades que compõem cada receptor adicionam diversidade funcional ao receptor. A presença da subunidade GluR2, por exemplo, é responsável pela baixa permeabilidade ao cálcio. Já a ausência desta subunidade é responsável por alta permeabilidade a este íon. Esta característica parece ser devido à troca de uma glutamina por uma arginina na alça M2 desta subunidade. Já a presença da subunidade GluR4 confere uma alta taxa de dessensitização. A composição das subunidades que formam o receptor de glutamato é então importante, pois representará a maior ou menor permeabilidade ao cálcio, além de interferir na cinética do canal (HOLLMANN, *et al.*, 1991; GÖTZ *et al.*, 1997; BORGES e DINGLEDINE, 1998; OZAWA *et al.*, 1998; STEFANI *et al.*, 1998; LANCELOT e BEAL, 1998; KEW & KEMP, 2005)

Os membros desta família de receptores podem existir em duas isoformas, chamadas “flip” e “flop”. Esta diferença ocorre devido a um processamento (*splice*) alternativo durante a transcrição do RNAm. A isoforma *flop* do RNAm aparece mais tarde durante o desenvolvimento e é menos ativa que a variante *flip* (BORGES e DINGLEDINE, 1998). A isoforma *flip* está presente antes do

nascimento e especula-se que seja importante na sinaptogênese. Assim, a atividade do receptor de glutamato (GluR) parece ser modulada durante o desenvolvimento (BORGES e DINGLEDINE, 1998).

Diversas composições dos receptores de glutamato do tipo AMPA estão presentes em núcleos da base de mamíferos e aves (McGEORGE e FAULL, 1989; TESTA *et al.*, 1994; VEENMAN *et al.*, 1994; CHEN, 1996, 1998; LAVERGHETTA *et al.*, 2005). No estriado, a expressão de receptores do tipo AMPA parece variar conforme o tipo celular. Neurônios estriatais de projeção são ricos nas subunidades GluR2 e/ou GluR3 e pobres em GluR1 e GluR4, enquanto interneurônios parvalbuminérgicos têm se mostrado ricos nas subunidades GluR1 e GluR4, porém, pobres nas subunidades GluR2 e/ou GluR3 (CHEN, 1996; LAVERGHETTA *et al.*, 2005).

Apesar de importantes alvos na transmissão sináptica, a estimulação excessiva de receptores AMPA pode exercer dano excitotóxico. Desordens degenerativas crônicas como as doenças de Huntington, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica parecem estar associadas com esta excitotoxicidade (GARERI, 1995; BORGES e DINGLEDINE, 1998; LANCELOT e BEAL, 1998). Estes danos podem ser, ao menos em parte, devido ao alto influxo de cálcio (KHACHATURIAN, 1991).

PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO

Inúmeras etapas biológicas envolvem o íon cálcio, como por exemplo, o acoplamento excitação-contração muscular, alteração da permeabilidade da membrana celular, transmissão de impulsos nervosos, síntese e liberação de neurotransmissores, utilização da glicose, mecanismos secretores celulares, podendo também representar um tipo de segundo mensageiro intracelular influenciando a transcrição genética, crescimento do soma, neuritos, cones de crescimento e botões terminais, atuando de forma plástica na constituição celular (BENZONANA *et al.*, 1977; RASMUSSEN, 1980; BLAUSTEIN & RASGADO-FLORES, 1981; HEIZMAINN, 1984; HEIZMAINN & KÄGI, 1989; KELLY, 1991; KHACHATURIAN, 1991).

Assim, é de grande importância que a homeostase do cálcio seja regulada por rígidos mecanismos de controle. Da mesma forma, o curso do tempo e a regionalização do aumento transitório do cálcio precisam ser eficientemente controlados de forma a ativar seletivamente múltiplos processos celulares.

A regulação dos níveis de cálcio é essencial para o funcionamento do sistema nervoso, uma vez que o aumento não-fisiológico (agudo ou crônico) do nível citoplasmático deste íon pode levar a morte celular. Quatro mecanismos básicos influenciam na homeostase do cálcio. São eles: 1) canais de cálcio; 2) proteínas ligantes de cálcio; 3) bombas de transporte de cálcio dependentes de energia e; 4) seqüestro de cálcio por organelas intracelulares (CÉLIO, 1989; BAIMBRIDGE *et al.*, 1992; GARERI, 1995). Proteínas ligantes de cálcio podem ser divididas em dois grupos: proteínas disparadoras e proteínas tamponantes. As proteínas

disparadoras como a calmodulina e a troponina-C mudam sua conformação estrutural após ligarem-se ao cálcio, modulando assim a atividade de várias enzimas e canais iônicos, enquanto que as tamponantes equilibram sua disponibilidade (BAIMBRIDGE *et al.*, 1992).

Algumas das proteínas descritas como tamponantes, tais como parvalbumina (PV), calbindina (CB) e calretinina (CR), supostamente mantêm a concentração de cálcio em equilíbrio dentro da célula em patamares fisiológicos (McBURNEY & MEERING, 1978). Elas provavelmente limitam a estimulação metabólica que poderia ser gerada pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio livre (BAIMBRIDGE *et al.*, 1992). Proteínas ligantes de cálcio podem supostamente exercer um papel protetor contra esta excitotoxicidade (KHACHATURIAN, 1981; ECKERT, 1994; GARERI, 1995).

A distribuição intracelular das proteínas ligantes de cálcio é muito diversa, sugerindo implicações fisiológicas diferentes (GOODMAN *et al.*, 1979; PERSEHINI *et al.*, 1989). Isso resulta em enorme polêmica a respeito da forma com que grupamentos celulares específicos fariam uso de passos metabólicos cálcio-dependentes diferentes, coordenados por complexos protéicos também diferentes, o que não impede que dois ou mais tipos de proteínas ligantes de cálcio estejam abrigadas em uma mesma célula (BAIMBRIDGE *et al.*, 1992).

Embora o papel funcional das proteínas ligantes de cálcio não seja inteiramente conhecido, anticorpos contra estas proteínas foram e têm sido utilizados como marcadores celulares para populações neurais específicas, principalmente nas áreas visuais, através de sua distribuição diferencial como meio

de delimitação e caracterização nuclear (CELIO & HEIZMANN, 1981; HEIZMANN, 1984; BAINBRIDGE *et al.*, 1992; ANDRESSEN *et al.*, 1993; TOLEDO *et al.*, 1995; SANTANA *et al.*, 2002).

Proteínas ligantes de cálcio também foram utilizadas nos núcleos da base como marcadores neurais além de possíveis correlações funcionais (KITA *et al.*, 1990; KITA, 1994; FIGUEREDO-CARDENAS; 1998). CICHETTI *et al.*, 1999 descreveram a co-localização parcial entre calretinina e subunidades do receptor de glutamato do tipo AMPA em interneurônios estriatais.

A proteína calbindina parece estar intensamente diminuída em áreas específicas afetadas por patologias neurodegenerativas, como a substância negra na doença de Parkinson, corpo estriado na doença de Huntington e núcleo basal de Meynert na doença de Alzheimer (IACOPINO & CHRISTAKOS, 1990). HEIZMAN & BRAUN (1992) sugerem uma possível resistência de neurônios PV-positivos (PV+) na doença de Alzheimer.

A co-localização entre receptores de glutamato e proteínas ligantes de cálcio foi evidenciada em algumas áreas do encéfalo. Kondo *et al.*, (1997) demonstraram que no córtex somatossensorial de ratos há uma correlação positiva entre as marcações de parvalbumina com a presença da subunidade GluR1 e ausência da subunidade GluR2. Já a proteína calbindina esteve presente nos neurônios que expressam ambas as subunidades. A proteína calbindina também esteve presente nos neurônios que expressam GluR2, mas não expressam GluR1, porém, isto só foi verdadeiro nas camadas II e III do córtex.

MUDANÇAS RELACIONADAS À IDADE

Tanto proteínas ligantes de cálcio quanto receptores de glutamato parecem sofrer alterações dependentes da idade

Kumar *et al.* (2002) mostraram que o nível da subunidade GluR2 em neurônios piramidais (camada 5) do neocórtex de ratos é crescente durante o desenvolvimento pós-natal entre os dias 13 e 21, e este aumento é manifestado não apenas em termos absolutos, mas também é relativo às subunidades GluR1 e GluR4. Eles sugerem que o aumento não é meramente atribuído ao aumento no número total de receptores, mas possivelmente na estequiometria do receptor e conseqüentemente na menor permeabilidade ao cálcio.

A modulação da expressão de receptores de glutamato parece ser de grande importância durante o desenvolvimento. A injeção de agonistas do tipo AMPA, quisqualato e NMDA teve efeito expressivamente mais danoso durante o período pós-natal do que quando injetada no encéfalo adulto (McDONALD, 1988; 1990; 1992). Em núcleos da base de ratos, JAKOWEC (1998) observou que todas as subunidades do receptor de glutamato do tipo AMPA apresentaram decréscimo de sua expressão durante o desenvolvimento pós-natal; enquanto que no neostriado, o início de funcionamento de receptores tipo AMPA/KA parece preceder o funcionamento de receptores do tipo NMDA (COLWELL, 1998).

A utilização das proteínas ligantes de cálcio calbindina e parvalbumina como marcadores neuronais, possibilitou a LETNIC e KOSTOVIC (1998), delinear distintas fases da maturação pós-natal do córtex visual em primatas. Evidentes

mudanças puderam ser observadas nos estágios entre o nascimento, dois meses, cinco meses, oito meses e dois anos de idade. No córtex cerebral, cerebelo e tronco encefálico de ratos, a proteína ligante de cálcio calbindina é detectada em baixos níveis no 15º dia embrionário e aumenta gradativamente até alcançar níveis adultos ao redor da 4ª ou 5ª semana de vida pós-natal (KUROBE *et al.*, 1992). Diferentes regiões apresentaram incremento ou redução na expressão destas proteínas, tanto em corpos celulares quanto em neurópila. Estas variações parecem estar sincronizadas com as mudanças na arquitetura sináptica, evidenciando a profunda reorganização do córtex de mamíferos durante desenvolvimento pós-natal envolvendo eliminação de espinhas dendríticas, sinapses e remodelação de circuitos (LETNIC e KOSTOVIC, 1998).

Em humanos, proteínas ligantes de cálcio apresentaram padrão de expressão variável de acordo com a idade em distintas áreas do encéfalo. No estriado, a chegada seqüencial dos vários sistemas aferentes parece ser refletida em mudanças no padrão de imunorreatividade à proteína calbindina (ULFIG, 2002). Em interneurônios neostriatais de ratos, a proteína ligante de cálcio calretinina está presente desde o nascimento, mas o número de células que expressam essa proteína chega ao pico por volta do 5º dia de vida e decresce nas duas semanas seguintes. Células PV+ aparecem próximo ao 9º dia, aumentando seu número e distribuição nas duas semanas seguintes (SCHLOSSER, 1999).

Mudanças na maquinaria neuroquímica de algumas regiões parecem ser influenciadas, ou talvez dar suporte, a essa maturação fisiológica. Aspectos funcionais parecem influenciar diretamente a expressão de proteínas ligantes de cálcio (BAIMBRIDGE *et al.*, 1992). Em pombos, há uma redução muito grande da

imunorreatividade tanto para calbindina quanto para parvalbumina na região do tecto óptico (TeO) após lesões retinianas, o que sugere que a expressão das proteínas ligantes de cálcio pode ser dependente da inervação oriunda da retina. A expressão destas proteínas aparece novamente 5 a 6 semanas pós-lesão (BRITTO *et al.*, 1994). Assim, a expressão destas proteínas em uma determinada célula pode ser dependente de suas aferências, de modo que sua expressão esteja relacionada ao nível de atividade celular. O mesmo parece ocorrer com as subunidades GluR1 e GluR2/3 do receptor de glutamato. Entretanto, neste caso as lesões retinianas resultaram em um decréscimo inicial, observado no segundo dia após a lesão, seguido por uma superexpressão no sétimo dia pós-lesão (PIRES, *et al.*, 1998; 2000).

O período de maturação pós-natal é variável entre as diferentes espécies. O aparecimento de uma banda característica de células CB+ na camada II das áreas 17 e 18 do córtex visual de humanos ocorre ao redor do segundo mês de vida, enquanto que nos macacos, já está presente ao nascimento. O pico de expressão de PV na camada IV do córtex visual ocorre aos doze meses em macacos, mas apenas aos dois anos em humanos. Assim, o padrão de expressão de PV e CB em macacos e humanos apresentam o mesmo curso de variação durante a maturação, porém, de forma mais lenta nos últimos. Esses dados sugerem participação dessas proteínas em diversas etapas e processos de formação do sistema nervoso como sinaptogênese, maturação sináptica pós-natal, aparecimento de receptores de neurotransmissores e plasticidade (LETINIC e KOSTVIC, 1998).

Em pombos, a maturação funcional dura cerca de 25 a 30 dias. Neste período ainda há dependência parental para sobreviver. Apesar de serem aves, o

período em torno do 25^o dia é chamado comumente de desmame. O pombo inicia a abertura do olho por volta do quarto ou quinto dia e somente após o sétimo dia é que apresenta tentativas eficazes, porém por curto tempo de ficar em pé e é capaz de acertar um alvo ao bicar. Esse dado é sugestivo de que os circuitos visuomotores podem ter desenvolvimento precoce, enquanto que os relacionados com motricidade postural ou voluntária requerem um tempo maior, assemelhando-se com o observado para mamíferos.

Diversos estudos relataram que durante o período pós-natal de ratos, gatos, macacos e cachorros, os neurônios estriatais apresentam uma aparência imatura caracterizada por ausência ou dispersão de espinhas e presença de varicosidades no segmento dendrítico distal (LEVINE *et al.*, 1986; TANAKA, 1980). Estudos de microscopia eletrônica também evidenciam uma prolongada maturação pós-natal nas estruturas sinápticas de roedores, felinos caninos e primatas (ADINOLFI, 1977; DiFIGLIA, 1980; TANAKA, 1980; SHAP e TEPPER, 1998). A própria formação da conexão córtico-estriatal parece ocorrer em três estágios, sendo que o último (arborização terminal) ocorre durante a fase pós-natal e estudos eletrofisiológicos (TEPPER *et al.*, 1997) indicaram resultados que corroboram as alterações morfológicas (estruturais) descritas.

II. OBJETIVO

Levando-se em consideração: 1) a importância dos núcleos da base na função motora, assim como o envolvimento do glutamato, de seus receptores e de proteínas ligantes de cálcio neste sistema; 2) a conservação filogenética destas estruturas entre mamíferos e aves; 3) maturação funcional tardia em pombos à semelhança de mamíferos complexos e; 4) a importância do desenvolvimento pós-natal no refinamento das atividades funcionais e no ajuste dos mecanismos (bioquímicos) intracelulares, será objetivo deste trabalho: caracterizar, no estriado lateral e no globo pálido, uma possível variação na expressão das subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 do receptor de glutamato, assim como das proteínas ligantes de cálcio PV e CB durante a fase inicial de desenvolvimento pós-natal de pombos, utilizando para isso, a técnica de imuno-histoquímica.

III. MATERIAIS E MÉTODO

Sujeitos Experimentais

No decorrer deste estudo, utilizamos 42 (quarenta e dois) pombos (*Columba livia*) divididos nas seguintes idades: P0 (dia do nascimento), P1 (primeiro dia pós-natal) P3 (terceiro dia pós-natal), P5 (quinto dia pós-natal), P7 (sétimo dia pós-natal), P10 (décimo dia pós-natal) e adulto jovem (acima de quatro meses de vida), de ambos os sexos, obtidos com criadores locais, sob condições de alimentação irrestrita e ciclo de luz natural.

Os valores de peso dos animais utilizados variaram da seguinte forma: P0: $15,5 \pm 2,64$; P1: $20,25 \pm 6,89$; P3: $53,8 \pm 21,30$; P5: $103,25 \pm 11,35$; P7: $118 \pm 21,09$; P10: $240,83 \pm 46,73$ e adulto: $361 \pm 47,48$ (média \pm desvio padrão).

Todo tipo de experimento foi levado a termo respeitando-se as normas e preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBREA) e segundo as diretrizes da Society for Neuroscience, em acordo com guia dos National Institutes of Health americanos; além de ter sido aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Unicamp (protocolo número 759-2, aprovado em 17/02/05).

Experimentos Imuno-histoquímicos

Os quarenta e dois animais foram anestesiados profundamente com ketamina (ketalar, PARKE-DAVES, 0,06mL / 100g de peso corporal, i.m.) e xilazina (rompum, MILES-LAB, 0,04mL / 100g de peso corporal, i.m.). Utilizando-se materiais cirúrgicos, a caixa torácica era aberta com exposição do coração e injeção de heparina (HEPARINA SÓDICA 0,2 mL / 100g de peso), os animais foram perfundidos por via intracárdica com solução salina tamponada (pH 7,4) e subseqüentemente com solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 4°C (PFA, pH 7,4). Os cérebros foram então removidos e após serem mantidos no fixador (PFA 4%) por cerca de 12 horas foram transportados para uma solução com sacarose a 30% em tampão fosfato pH 7,4, onde permaneceram ao mínimo 24 horas até serem secionados, com uma espessura de aproximadamente 40 µm, em micrótomo deslizante de congelamento ou criostato.

Os cortes foram recolhidos em ordem seqüencial e armazenados em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C. Os cortes selecionados foram lavados por 3 vezes durante 10 minutos em solução tampão 0,1M em temperatura ambiente.

Parte dos cortes selecionados foi montada em lâminas gelatinizadas e, depois de secos, corados pelo método de Giemsa para servir de guia histológico da região e como referencial para o estudo quantitativo.

Os demais cortes foram processados imuno-histoquimicamente. Para tanto, foram incubados, por 12 a 36 horas a 4°C com um anticorpo primário contra a proteína a ser estudada. Os anticorpos primários utilizados foram: um anticorpo

monoclonal de camundongo contra parvalbumina, um anticorpo monoclonal de camundongo contra calbindina (ambos da Sigma Co. Saint Louis, LO), dois anticorpos monoclonais de coelho contra as subunidades GluR1 e GluR4, um antisoro policlonal de coelho contra um epítipo comum às subunidades GluR2 e GluR3, que chamaremos de GluR2/3 (todos originários de Chemicon, Temecula, CA). As diluições eram sempre feitas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 com Triton-X-100 a 0,3% em concentrações que variaram entre 1:250 a 1:2000, de acordo com o protocolo utilizado.

Os cortes foram então novamente lavados em tampão fosfato em temperatura ambiente e incubados por uma hora com o anticorpo secundário biotilado (Jackson ImmunoResearch Labs. Inc., West Grove, PA) contra as imunoglobulinas do animal do qual foi feito o anticorpo primário (camundongo ou coelho). Após nova série de lavagens à temperatura ambiente, os tecidos foram colocados por uma hora em solução de Triton-X-100 0,3 % em tampão fosfato 0,1M e 0.4 M de NaCl onde se incluía o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC ELITE kit, Vector Lab.) preparado 30 minutos antes. Após nova série de lavagem, os cortes foram imersos num meio contendo diaminobenzidina (DAB) 0,05% em tampão fosfato 0,1M por cerca de 5 minutos. Acrescentou-se a seguir, cerca de 800 µL de solução de peróxido de hidrogênio (concentração final: 0,01%), mantendo-se os cortes neste banho até que a reação fosse evidenciada. Atingido o ponto ótimo de contraste entre a região marcada e o tecido não reativo, os cortes foram removidos da solução com DAB e imersos em tampão fosfato 0.1M. Depois de nova série de lavagens em tampão fosfato 0,1M, com o objetivo de remoção do excesso de reagente, os cortes foram montados em lâminas tratadas com gelatina.

Após secagem por três a quatro dias em placa quente a 35°C, foram brevemente hidratados em água destilada, banhados em solução de tetróxido de ósmio 0,1% por 15 – 30 segundos, desidratados por uma série de álcoois em concentrações crescentes, clarificadas com Hemo-De (Fisher) e cobertos com lamínulas tendo como meio de montagem o Permount (Sigma). Uma vez prontos, os cortes foram observados em microscopia de luz para análise histológica.

Alguns cortes foram processados excluindo-se apenas a etapa de incubação com o anticorpo primário e em outros foi excluída apenas a etapa de incubação com o anticorpo secundário no intuito de estabelecer um controle negativo. Todos experimentos realizados nestas condições apresentaram padrão nulo de marcação.

A homologia entre a seqüência de nucleotídeos das subunidades do receptor de glutamato do tipo AMPA de aves e de ratos é entre 94% e 98% idêntica (OTTIGER, *et al.*, 1995; PAPERNA, *et al.*, 1996; RAVNDRANATHAN, *et al.*, 1996). Posteriormente, RENG, *et al.* (1999), utilizando experimentos de Western Blot mostraram que o anticorpo contra as subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 do receptor de glutamato do tipo AMPA originários da Chemicon (Temecula, CA) apresentam alta especificidade em pombos.

Técnica de Giemsa

Logo após a etapa de microtomia, parte dos cortes foi separada e montada em lâminas gelatinizadas, conforme citado acima. Após a secagem em placa quente (35°C) durante três ou quatro dias, as Lâminas foram desengorduras em

clorofórmio, reidratadas em seqüência decrescente de álcoois, banhadas em água destilada, coradas em mistura morna do corante GIEMSA, lavadas em tampão fosfato, diferenciadas em álcool, novamente lavadas em tampão fosfato, fixadas em molibdato de amônia, lavadas em água destilada, desidratadas em seqüência crescente de álcoois, clarificadas com Hemo-De (Fisher) e cobertos com lamínulas tendo como meio de montagem o Permunt (Sigma).

Esta técnica possibilita a evidenciação da substância de Nissl, um material granular constituído por RNA ribossomal presente no interior de virtualmente todas as células nervosas (ONISHI, 1999).

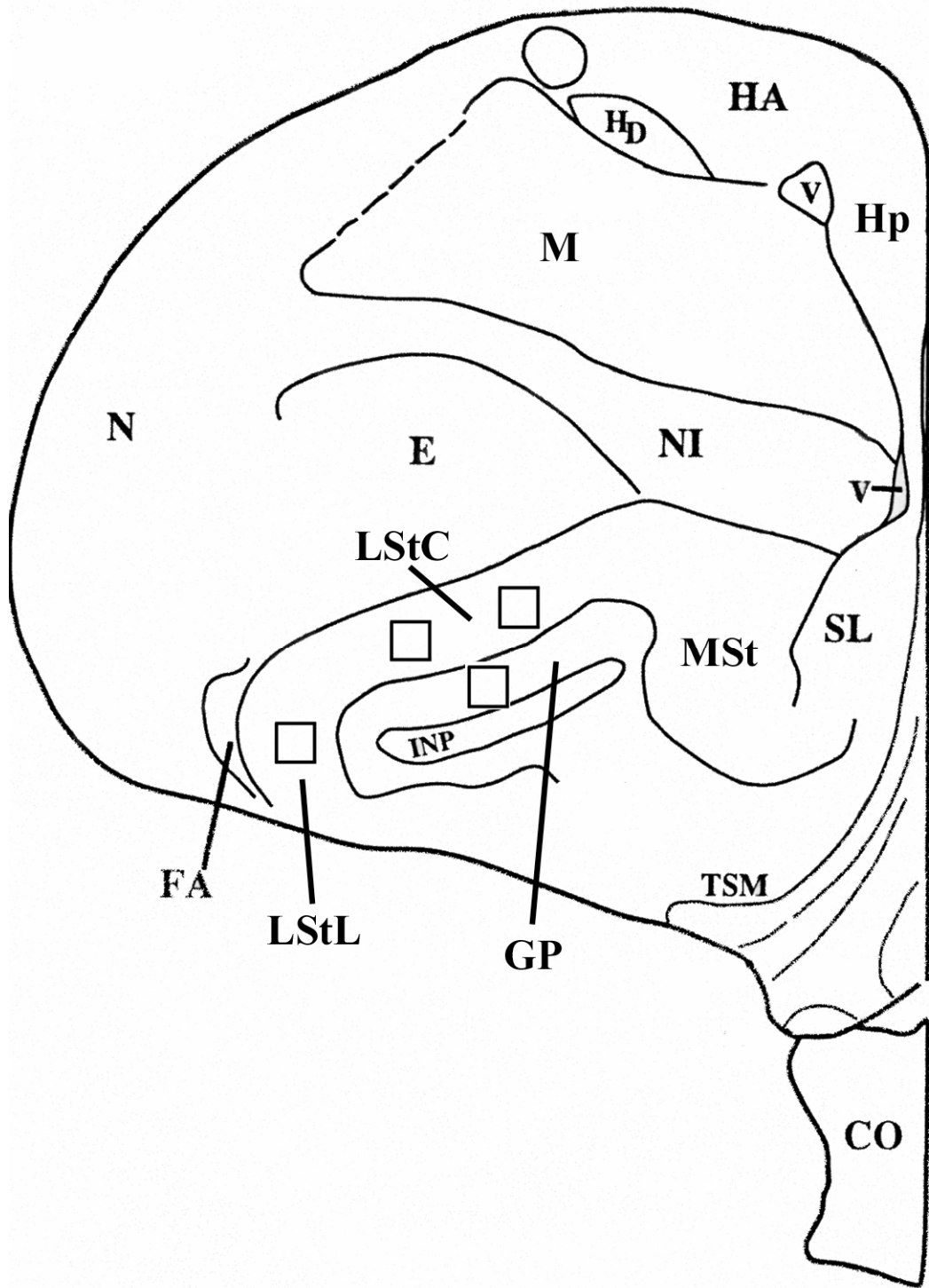
Análise Quantitativa

Todos os cortes representativos da região estudada tiveram suas imagens digitalizadas (programa Magnafire - Optronics) utilizando microscópio de luz NIKON Eclipse E800 acoplado a uma câmera digital. As imagens digitalizadas foram preparadas utilizando Adobe Photoshop (v 6.0).

Em todas imagens foi realizada a contagem do número de células utilizando-se um quadrado de $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$, constituindo um campo de $62.500\mu\text{m}^2$ (eventualmente foi utilizado um retângulo de área equivalente) em cada uma das três regiões de interesse no encéfalo de pombos: o centro do globo pálido e as regiões central e lateral do corpo estriado. Este quadrado foi construído a partir da digitalização de uma barra de escala com intervalos de $10\mu\text{m}$. Considerando-se que

o tamanho anatômico da região central do estriado é evidentemente maior que as demais regiões, foram contados dois campos enquanto que no globo pálido e região lateral do estriado apenas um, conforme esquematizado na figura 2.

Figura 2: Representação esquemática de corte histológico do encéfalo de pombo adaptado do atlas estereotático de pombos (KARTEN & HODOS,1967), considerando a nomenclatura revisada por REINER et al, 2004. Os quadrados presentes na região do estriado e do globo pálido representam aproximadamente a área de contagem celular. Abreviaturas. CO: quiasma óptico; E: entopálio; FA: tracto fronto-arcopallial; GP: globo pálido; HA: hiperpálio apical; HD: hiperpálio densocelular; Hp: hipocampo; INP: núcleo intrapeduncular; LStC: porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral; M: mesopálio; MSt: estriado medial; N: nidopálio; NI: nidopálio intermediário; V: ventrículo; TSM: tracto septopallio-mesencefálico.



Para efeito de cômputo, todos os neurônios com mais da metade de seu corpo celular no interior do quadrado eram considerados. O número de corpos celulares presentes dentro de uma área (no caso $62.500\mu\text{m}^2$) constitui a densidade celular daquela região. Após contagem da densidade celular de todas imagens digitalizadas em cada uma das três diferentes regiões de interesse, os resultados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão.

A contagem celular dos corpos imunorreativos às proteínas estudadas também foi expressa em porcentagem. A média da densidade celular nos cortes corados pela técnica de GIEMSA foi considerada 100% em cada uma das regiões nas diferentes idades. A média da densidade celular de células imunorreativas a cada uma das proteínas estudadas foi então comparada à média da densidade celular de células coradas pela técnica de GIEMSA (100%). Obteve-se assim, o valor porcentual de células imunorreativas às diferentes proteínas em cada uma das idades estudadas. Eventualmente o valor da densidade celular foi chamado de absoluto para diferenciar do valor em porcentagem (valor relativo).

IV. RESULTADOS

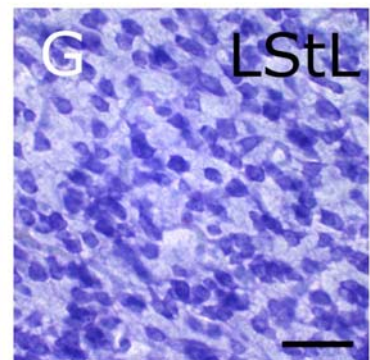
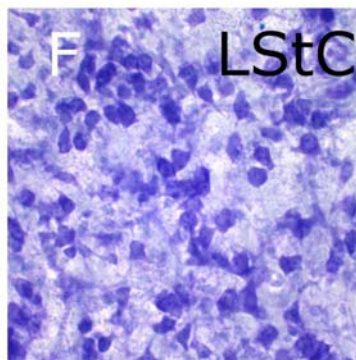
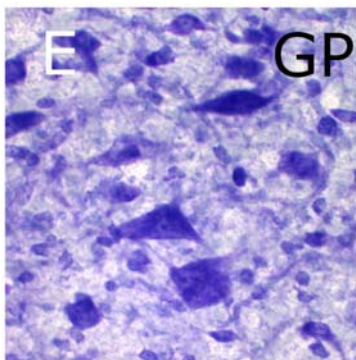
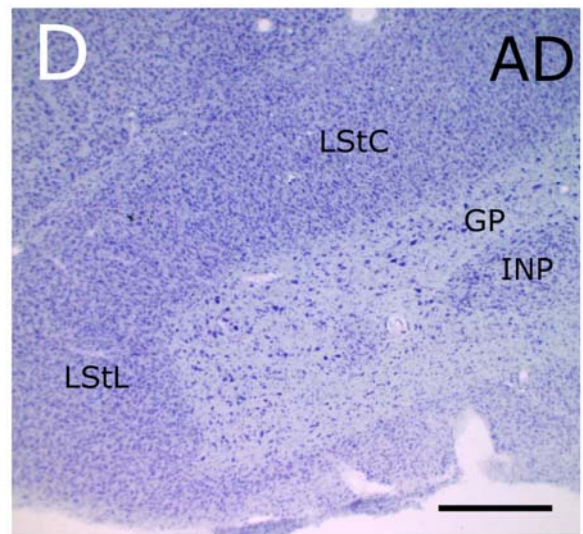
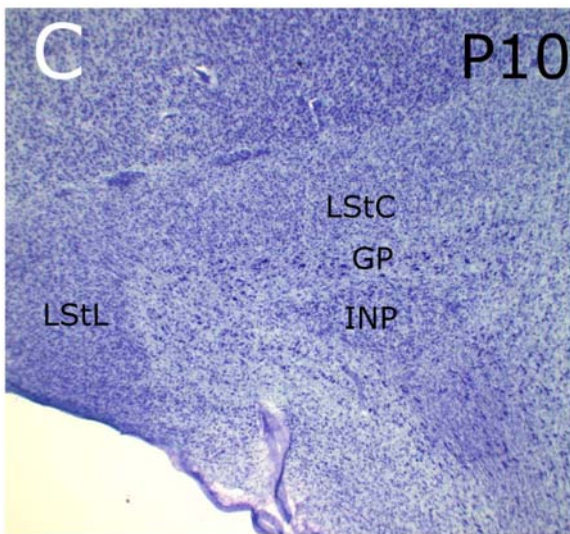
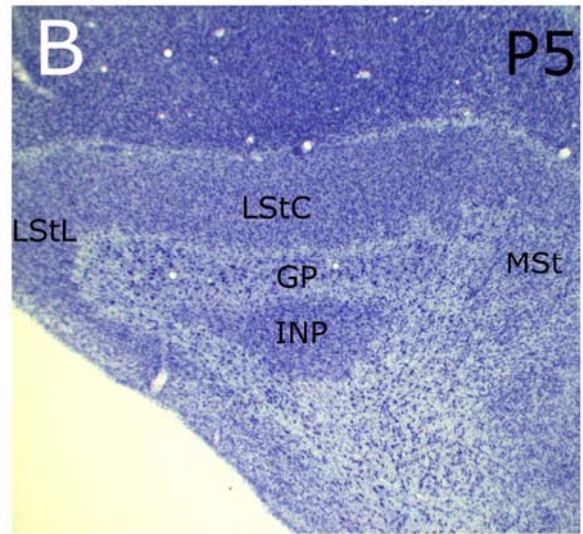
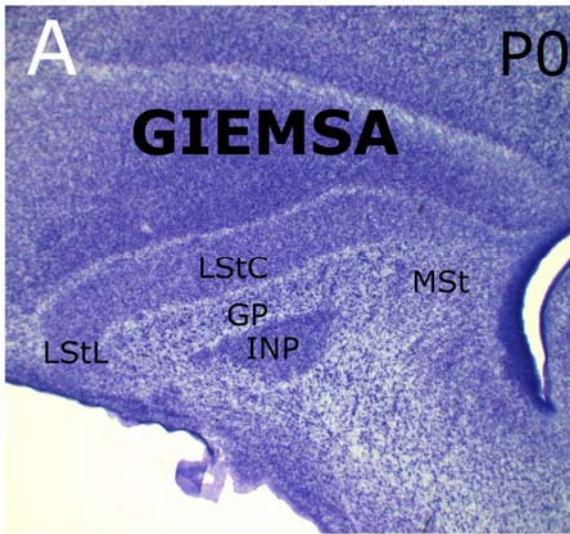
IV.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

IV.1.1. GIEMSA

O contingente principal dos núcleos da base de aves está presente na região ventral do telencéfalo. O esquema da Figura 2 indica a distribuição espacial do globo pálido, estriado lateral (corpo estriado), e das estruturas circunvizinhas. A coloração pelo método de GIEMSA permitiu identificar as áreas estudadas, sendo possível notar uma evidente diferença no padrão de distribuição celular entre o estriado lateral e o globo pálido em todas as idades (Figura 3). Em relação ao globo pálido, o estriado apresenta maior densidade celular, com corpos de diferentes formatos, mas, em geral, pouca variação de diâmetro celular (Figuras 3E - G). Uma pequena, mas visível diferença na concentração de corpos celulares pode ser observada entre a região central do estriado (LStC) e a região lateral do estriado (LStL) (Figuras 3F e 3G).

Aparentemente, a distribuição celular se tornou mais dispersa ao longo da idade (Figura 3A - D), assim como podemos notar a variação crescente no tamanho das estruturas observadas em mesma escala, em oposição ao índice de densidade celular, que apresentou grande declínio (ver detalhes na Figura 17).

Figura 3: Imagens digitalizadas dos núcleos da base de cortes frontais do encéfalo de pombos, em diferentes estágios de desenvolvimento, corados pela técnica de GIEMSA. Há uma tendência a maior dispersão entre as células ao longo dos dias de vida pós-natal (3A–D). Nos detalhes (3E–3G) de um animal P10, diferenças no tipo celular são observadas entre GP e LSt (3E-G). A densidade celular também é aparentemente diferente entre LStC e LStL (3F e 3G). Abreviaturas. GP: globo pálido; INP: núcleo intrapeduncular; LStC: porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral; MSt: estriado medial. Barra de escala= 225µm (A-D) e 45µm (E-F).



IV.1.2 RECEPTORES TIPO AMPA

GluR 1

A imunorreatividade à subunidade 1 do receptor de glutamato do tipo AMPA (GluR1) mostrou diferenças qualitativas entre o estriado o globo pálido (figura 4 A).

No estriado lateral (LStC e LStL) uma proeminente neurópila pode ser observada, contrastando com as regiões vizinhas globo pálido, entopálio e nidopálio. O núcleo intrapeduncular (INP) e o estriado medial (MSt) também apresentaram neurópila GluR1+ (figura 4A).

No GP, a escassa neurópila facilita a visualização de corpos celulares GluR1+ (Figura 4F - detalhe). Ao longo da maturação pós-natal inicial a presença de corpos celulares é crescente durante os três primeiros dias de vida, decrescendo em seguida. Em P3, especialmente, podemos notar a presença de processos celulares imunorreativos ao anticorpo contra a proteína GluR1. Após a idade P10, na qual a presença de corpos celulares GluR1+ no GP é rara, esta proteína pode ser novamente observada na idade adulta (Figura 4A- F).

Junto a intensa neurópila presente no estriado, é possível observar corpos celulares tanto no LStC quanto no LStL (figuras 5C – detalhe e 6D - detalhe).

Figura 4: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a GluR1 nos núcleos da base em cortes frontais do encéfalo de pombos, com enfoque no GP, em diferentes estágios de desenvolvimento. A imagem 4A mostra o padrão geral de marcação em pequeno aumento. A neurópila foi intensamente marcada no LStC, LStL, MSt e INP, porém pobre no GP. A variação etária na expressão de GluR1 por neurônios presentes no globo pálido pode ser observada nas imagens 4B – F, sendo o pico de expressão em P3 (4C) e o valor mais baixo em P10 (4E). Abreviaturas. GP: globo pálido; INP: núcleo intrapeduncular; LStC: porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral; MSt: estriado medial. Barra de escala = 225 μ m (A-F); no detalhe em 4F = 45 μ m.

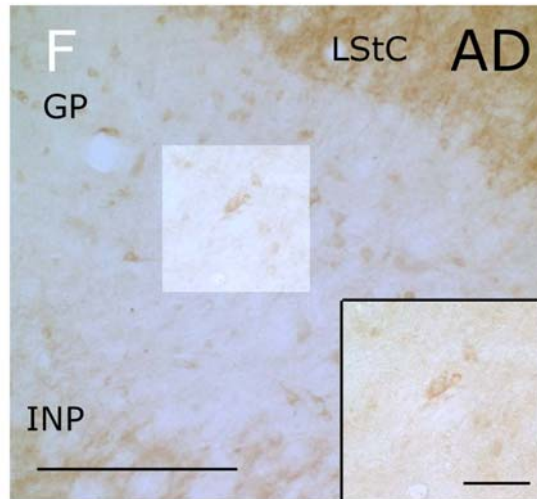
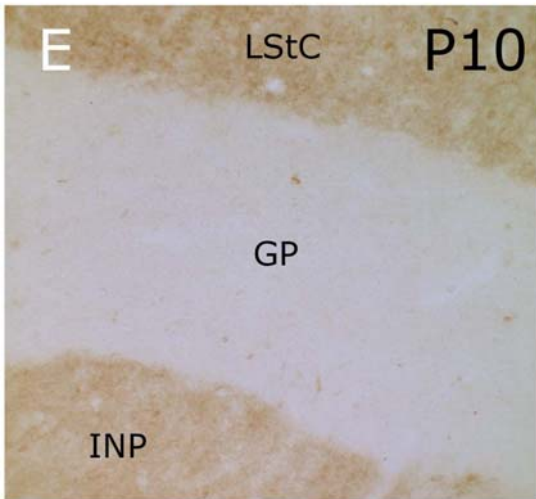
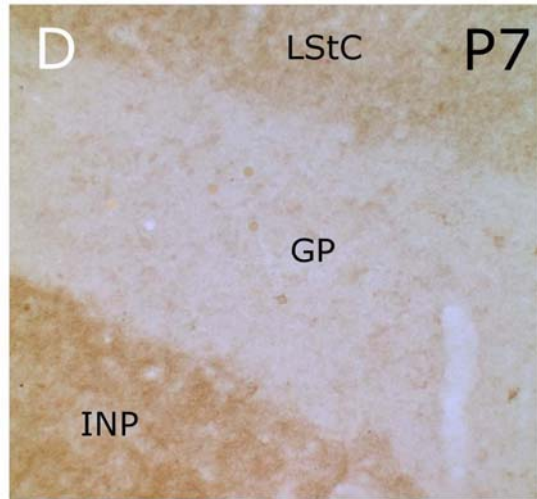
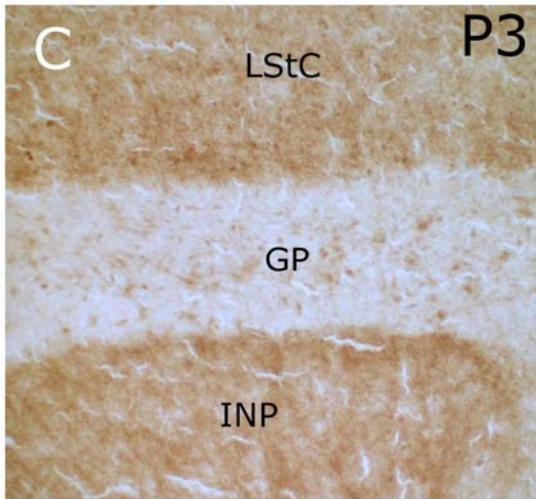
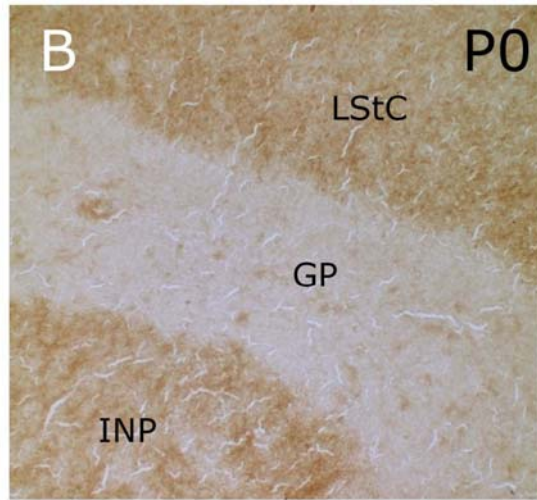
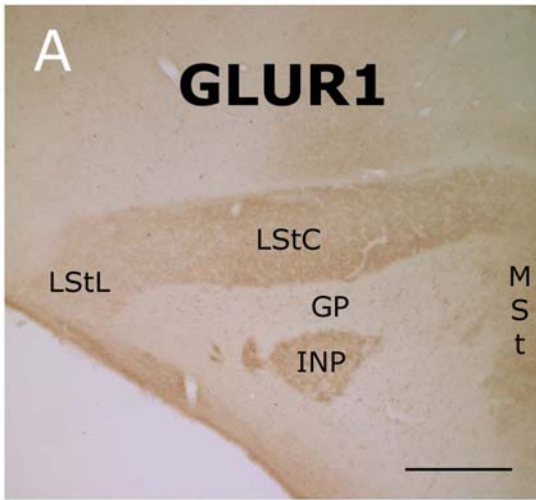


Figura 5: Imagens digitalizadas de cortes frontais do encéfalo de pombos mostrando a imunorreatividade a GluR1 nos núcleos da base, com enfoque no LStC, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão de expressão de GluR1 ao longo dos dias pode ser observado nas imagens 5A – D. Além da neurópila intensamente marcada é possível observar corpos celulares, como evidencia o detalhe em 5C. Abreviaturas. GP: globo pálido; LStC: porção central do estriado lateral. Barra de escala = 225 μ m (A-D) e 45 μ m no detalhe.

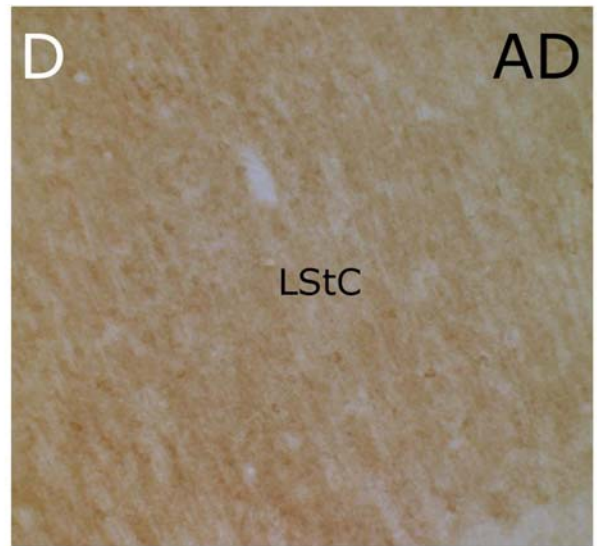
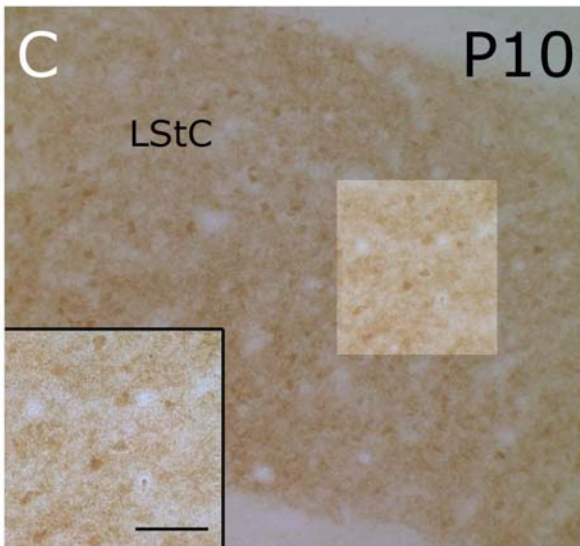
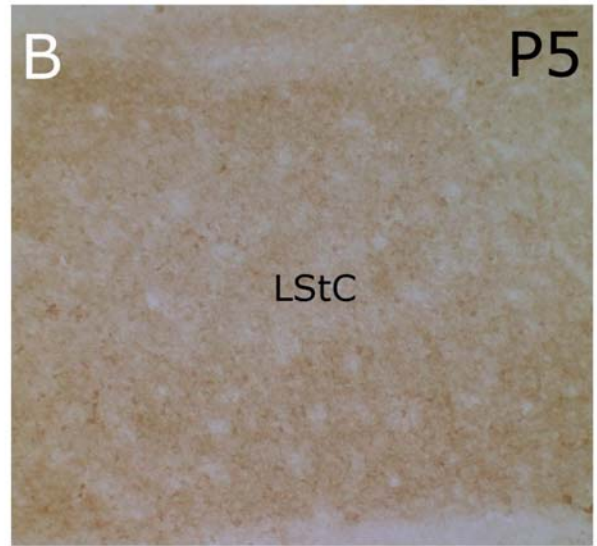
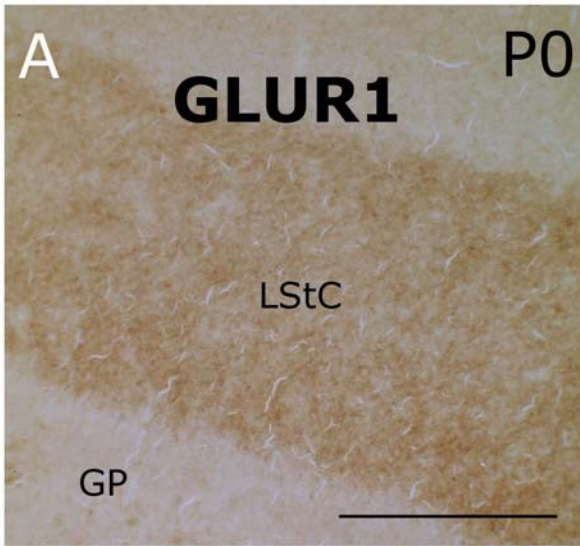
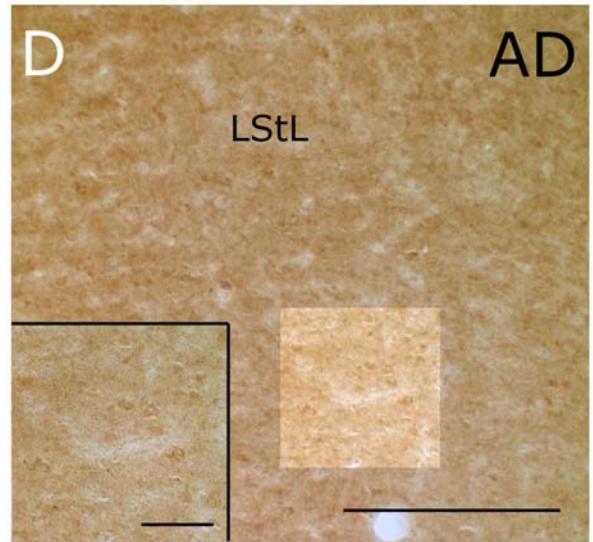
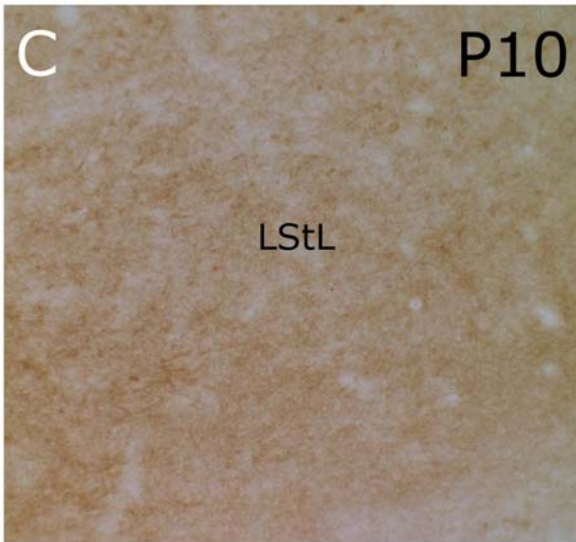
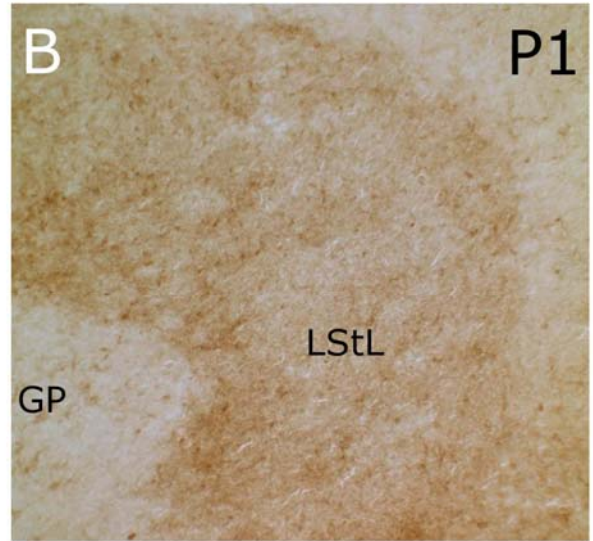
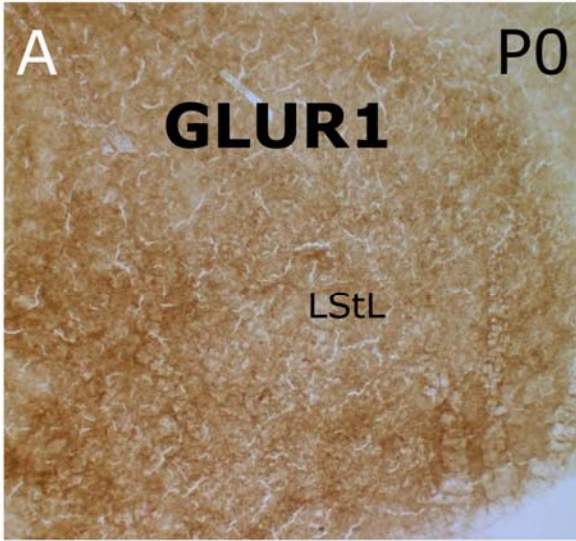


Figura 6: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a GluR1 em cortes frontais do encéfalo de pombos nos núcleos da base, com enfoque no LStL, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão de expressão de GluR1 ao longo dos dias pode ser observado nas imagens 6A – D. Além da neurópila intensamente marcada é possível observar corpos celulares, como evidencia o detalhe em 6D. Abreviaturas. GP: globo pálido; LStL: porção lateral do estriado lateral. Barra de escala = 225 μm (A-D) e 45 μm no detalhe.



GluR2/3

O padrão de marcação para imunorreatividade ao epítipo comum às subunidades GluR2 e GluR3 (GluR2/3+) foi bastante similar ao apresentado para GluR1 (Figuras 4A e 7A).

Podemos observar, no estriado lateral (LStC e LStL) uma proeminente neurópila, contrastando com as regiões vizinhas: globo pálido, entopálio e nidopálio. O núcleo intrapeduncular (INP) e o estriado medial (MSt), estão, assim como o estriado, intensamente marcados (figura 7A).

No GP, notamos fraca marcação em neurópila e presença corpos celulares GluR2/3+ (Figura 7B – D). Processos celulares são facilmente distinguíveis principalmente durante o desenvolvimento (Figura 7B). Entre P1 e P7 fica claro um aumento na presença de corpos celulares (Figura 7B e 7C).

No estriado, a neurópila fortemente marcada dificulta, mas não impede a visualização de corpos GluR2/3+ (Figuras 8 e 9). Porém, na região central do estriado lateral a neurópila parece ser mais intensamente marcada que a região lateral (Figuras 7A, 8A, e 9A).

Podemos notar, inclusive, uma visível diferença na densidade celular entre LStC e LStL, facilmente visualizadas nos primeiros dias de vida (Figuras 8 A e 9 A).

Figura 7: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a GluR2/3 em cortes frontais do encéfalo de pombos, na região dos núcleos da base, com enfoque no GP, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão geral de expressão (7A) revela neurópila intensamente marcada no LStC, LStL, MSt e INP, porém pobre em GP. A variação etária na expressão de GluR2/3 pelo globo pálido pode ser observada nas imagens 7B – D. Abreviaturas. GP: globo pálido; INP: núcleo intrapeduncular; LStC: porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral; MSt: estriado medial. Barra de escala = 225 μm (A-D) e 45 μm no detalhe.

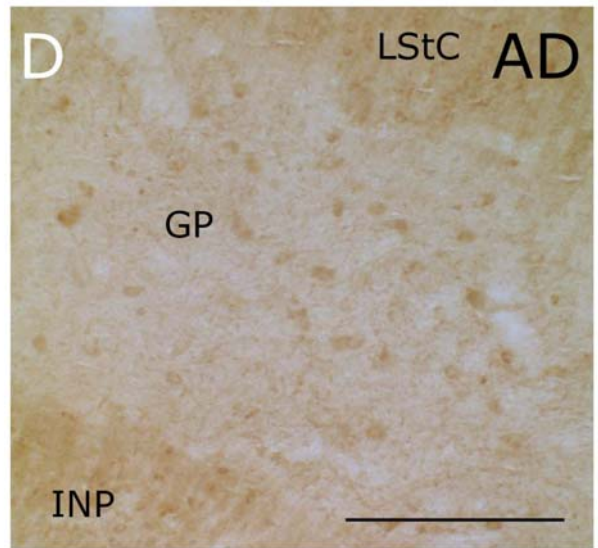
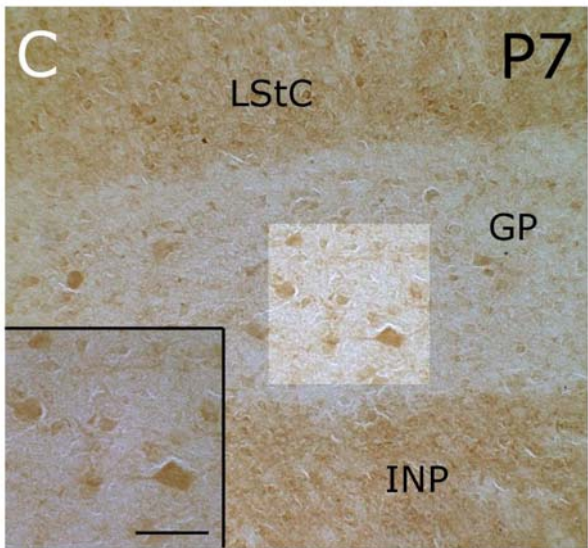
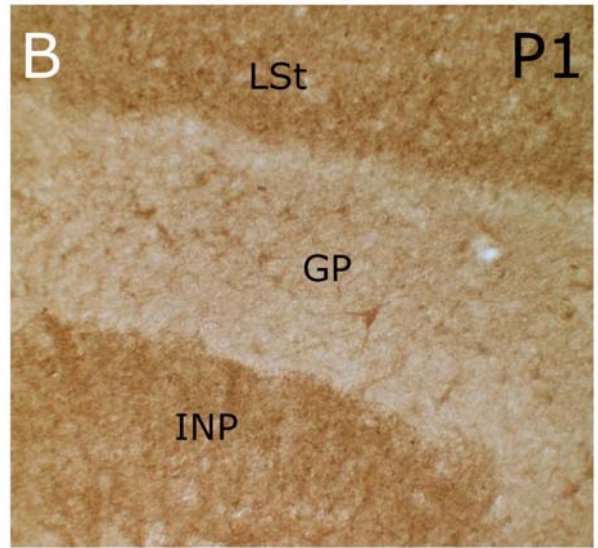
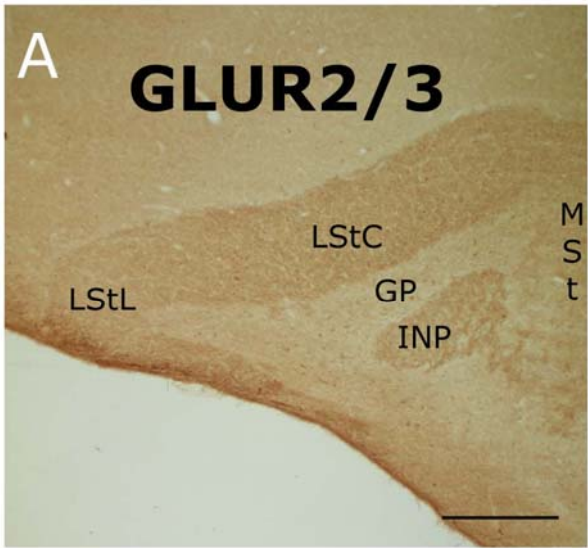


Figura 8: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a GluR2/3 em cortes frontais do encéfalo de pombos na área dos núcleos da base, com enfoque no LStC, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão de expressão de GluR2/3 ao longo dos dias pode ser observado nas imagens 8A – D. Além da neurópila intensamente marcada é possível observar corpos celulares, como evidencia o detalhe em 8C. Abreviaturas. LStC: porção central do estriado lateral. Barra de escala = 225 μm (A-D) e 45 μm no detalhe.

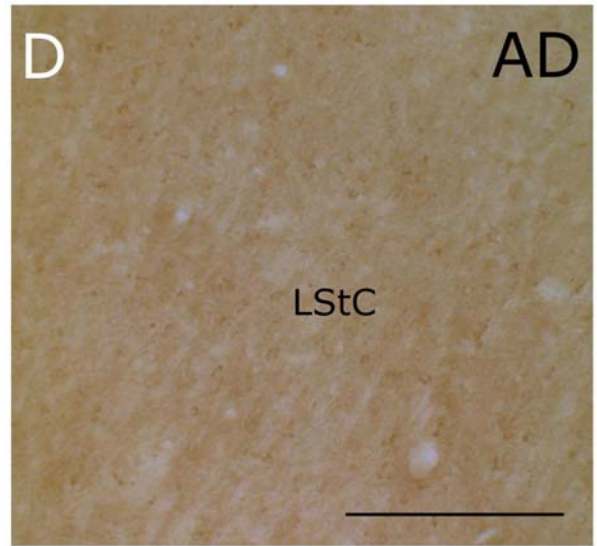
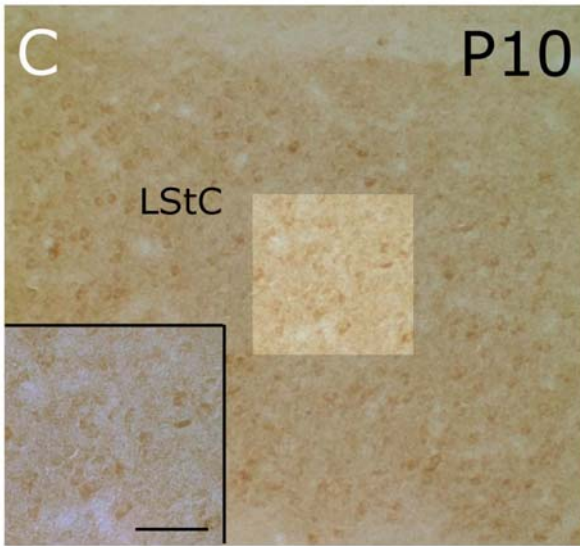
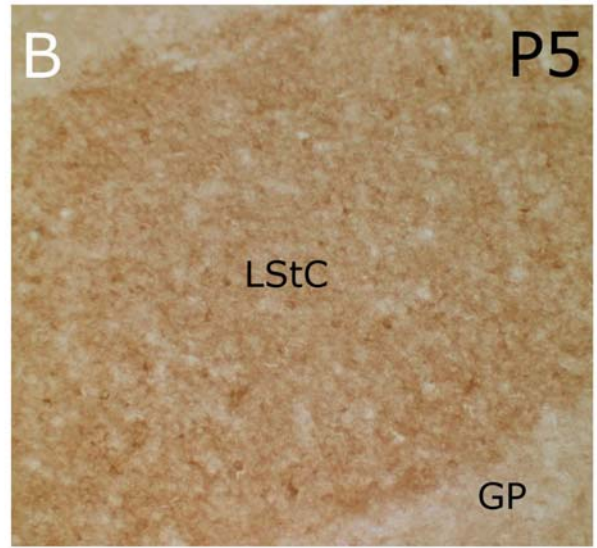
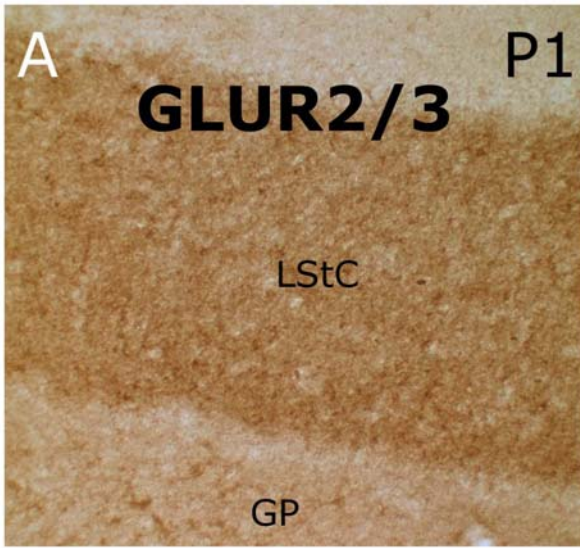
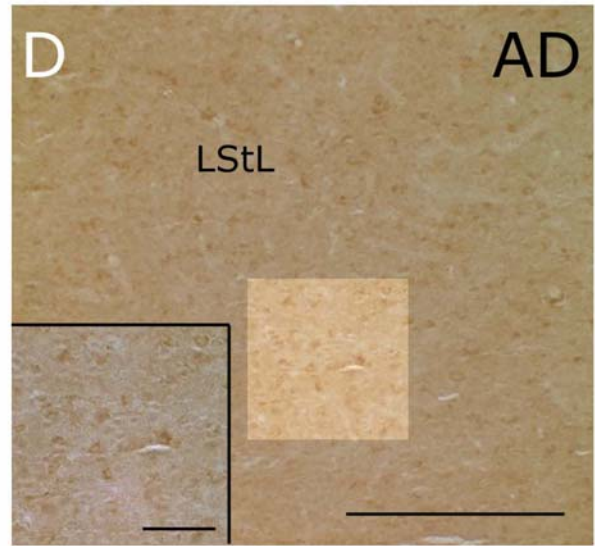
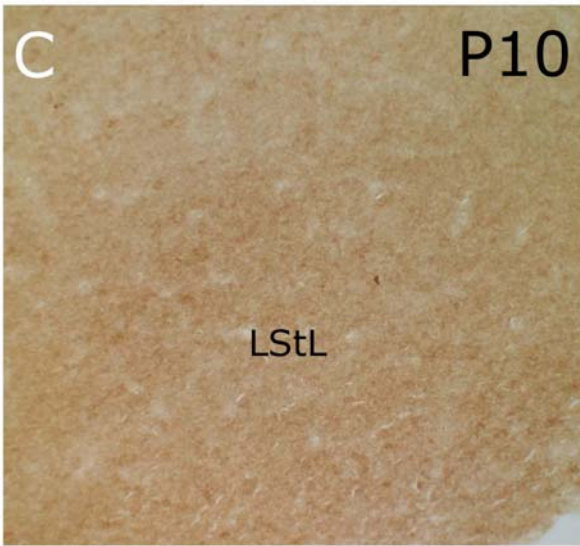
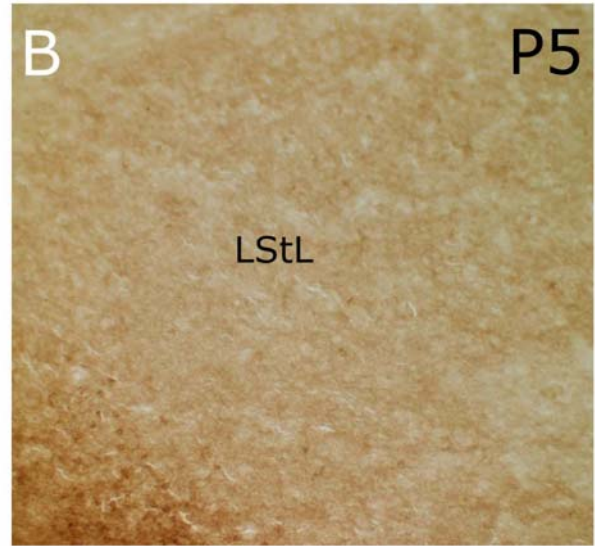


Figura 9: Imagens digitalizadas de cortes frontais do encéfalo de pombos mostrando a imunorreatividade a GluR2/3 nos núcleos da base, com enfoque no LStL, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão de expressão de GluR2/3 ao longo dos dias pode ser observado nas imagens 9A – D. Além da neurópila intensamente marcada é possível observar corpos celulares, como evidencia o detalhe em 9D. Abreviaturas. GP: globo pálido; LStL: porção lateral do estriado lateral. Barra = 225 μm (A-D), sendo no detalhe = 45 μm .



GluR 4

No globo pálido, estriado lateral e medial, o padrão de imunorreatividade ao anticorpo contra GluR4 apresenta uma diferença expressiva quando comparado com o padrão apresentado ao anticorpo contra GluR1 e GluR2/3 (figuras 4A, 7A e 10A).

Enquanto no estriado a neurópila é agora pobre em marcação; já no globo pálido, podemos facilmente visualizá-la e com grande quantidade de processos celulares.

No globo pálido, desde o nascimento, encontramos a presença destes processos celulares em grande quantidade. Ao passar dos dias, eles se tornam menos intensos (Figura 10B – D). Da mesma forma, os corpos celulares presentes parecem ficar mais dispersos (Figura 10B – D)

A neurópila no estriado lateral e medial, assim como no INP foram pobres em imunorreatividade para GluR4. Corpos celulares podem ser vistos na região do entopálio e nidopálio (Figura 10 A).

No estriado podemos facilmente notar uma expressão crescente de corpos celulares GluR4+ do nascimento (Figuras 11A e 11D) até o sétimo dia de vida (Figuras 11B e 11E). Porém, após esta data, a quantidade de corpos celulares imunorreativos ao anticorpo contra GluR4 decai (Figuras 11C e 11F).

Figura 10: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a GluR4 em cortes frontais do encéfalo de pombos na região dos núcleos da base, com enfoque no GP, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão geral de expressão de GluR4 (10A) revela fraca marcação em neurópila no LStC, LStL e GP, sendo presente grande quantidade de processos celulares neste último. A presença de corpos celulares é evidente tanto no estriado quanto no GP. A variação etária na expressão de GluR4 pelo globo pálido pode ser observada nas imagens 10B – D. Abreviaturas. GP: globo pálido; INP: núcleo intrapeduncular; LStC: porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral. Barra de escala = 225 μm (A-D) e 45 μm no detalhe em 9C.

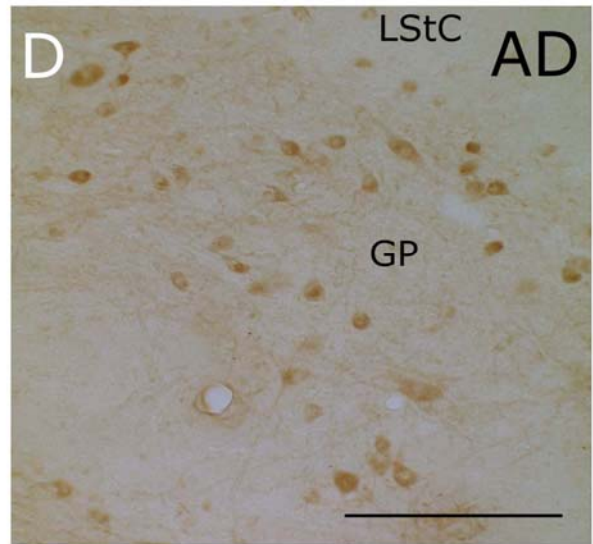
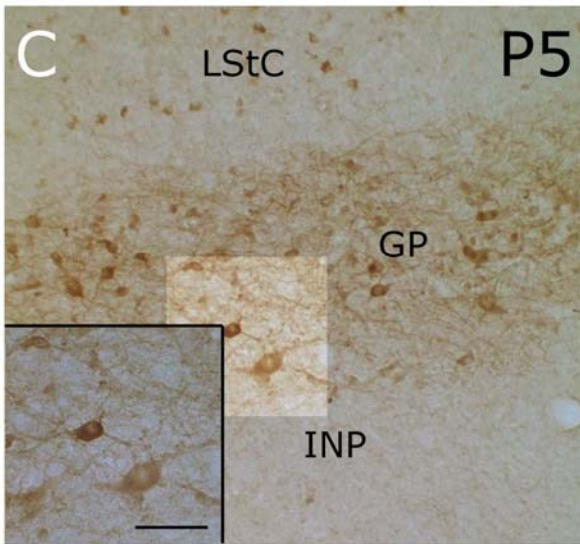
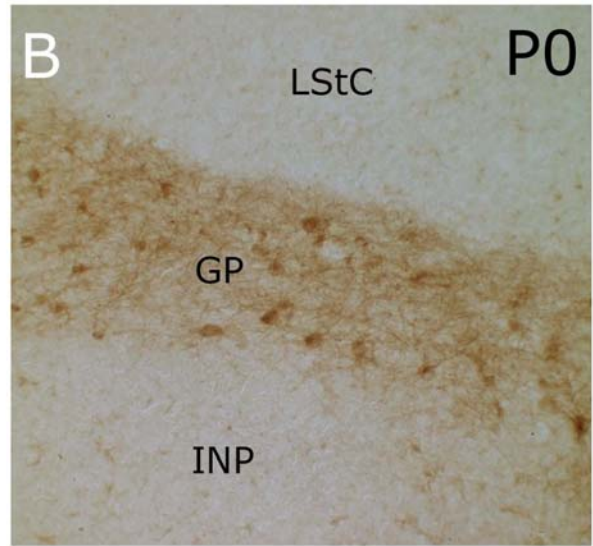
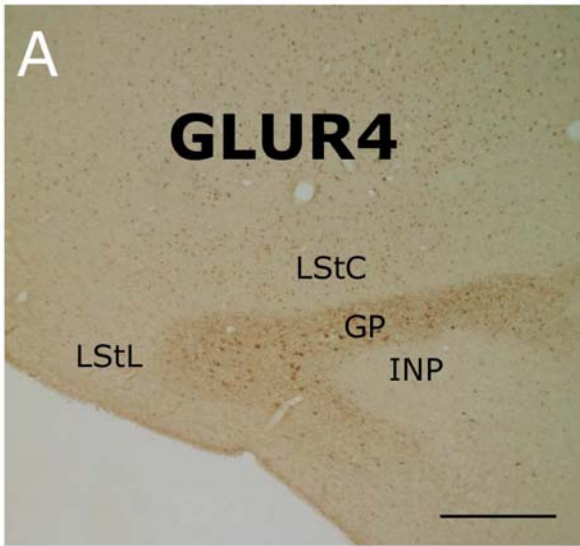
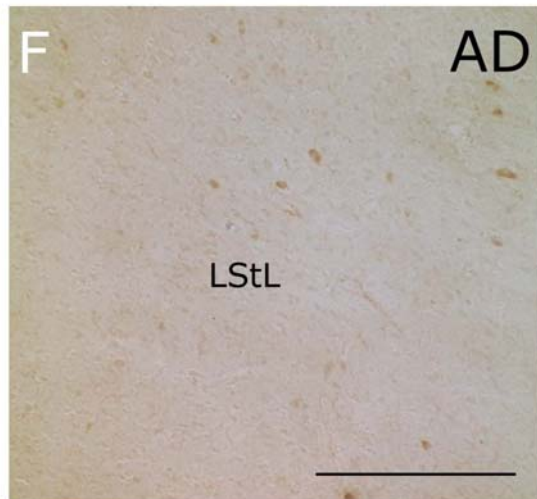
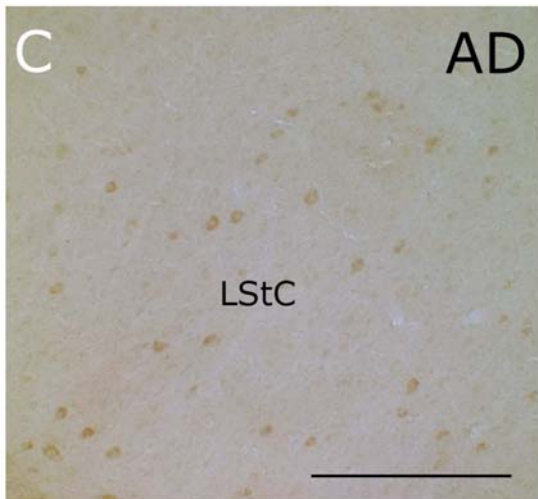
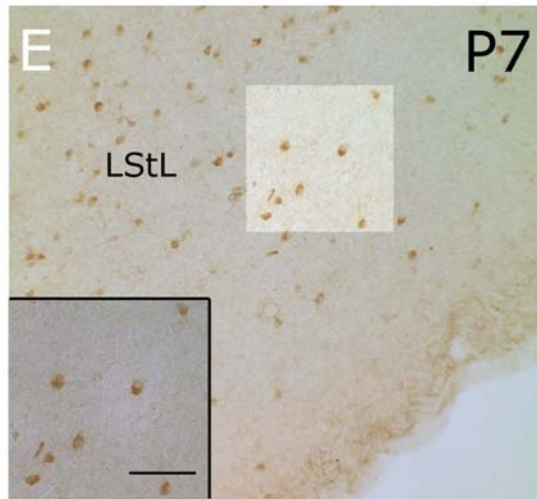
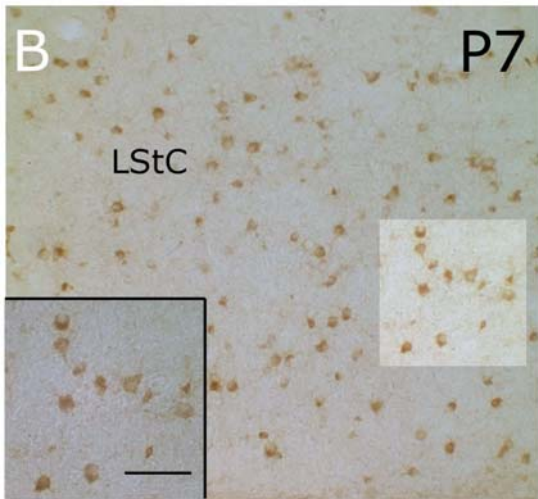
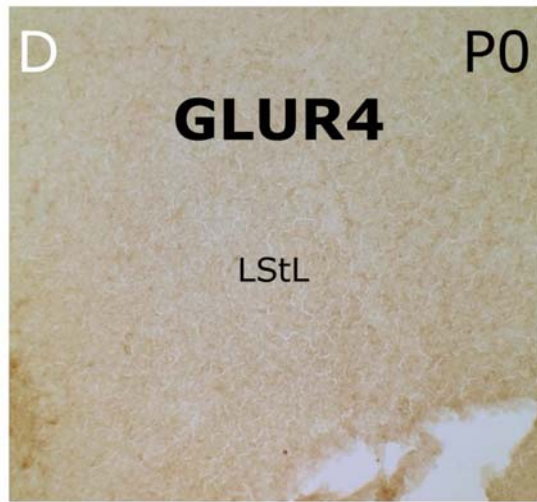
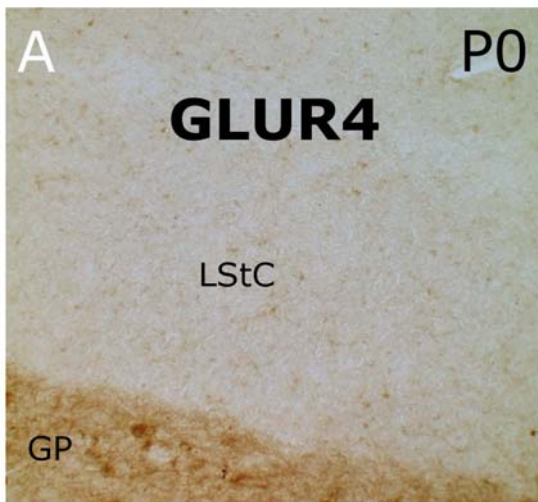


Figura 11: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a GluR4 em cortes frontais do encéfalo de pombos na área dos núcleos da base em diferentes estágios de desenvolvimento. Variações semelhantes no padrão de expressão de GluR4 ao longo dos dias podem ser observadas nas imagens 11A – C (LStC) e 11D - F (LStL). Detalhes nas figuras 11B e 11E evidenciam corpos celulares GluR4+. Abreviaturas. LStC: porção central do estriado lateral. Barra de escala = 225 μm (A-F), sendo de 45 μm nos detalhes de 11B e 11E.



PV

O padrão diferencial de expressão da imunorreatividade ao anticorpo contra a proteína parvalbumina foi o principal responsável pela observação segmentada entre o que consideramos região central e região lateral do estriado lateral (figura 12A).

A neurópila pode ser visualizada com expressão intensa na região central do estriado lateral (LStC), diferentemente da região lateral (LStL), onde está praticamente ausente. O nidopálio e o INP também são ricos em neurópila PV+; porém, o MSt apresentou fraca marcação. (figura 12A).

No GP podemos visualizar a presença de corpos celulares intensamente marcados, assim como neurópila e processos celulares (12B - D).

No LStC, a neurópila evidente não dificulta a visualização de corpos celulares PV+ que, aparentemente, se apresentam em número crescente ao decorrer do tempo de vida (Figura 13A – C). O LStL apresenta neurópila pobremente marcada, mas o padrão de marcação de corpos celulares, incluindo a variação ao longo do tempo foi semelhante ao LStC (Figuras 14B – D), exceto entre P0 e P1, quando aparentemente houve um decréscimo na quantidade de corpos celulares presentes (Figuras 14A e B).

Figura 12: Imagens digitalizadas de cortes frontais do encéfalo de pombos da imunorreatividade a PV nos núcleos da base, com enfoque no GP, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão geral de expressão (imagem 12A) revela imunorreatividade diferente entre LStC e LStL, assim como entre esses e GP. No LStC é possível observar neurópila intensamente marcada, enquanto que no LStL esta marcação é pobre, sendo mais evidente a marcação de corpos celulares. No GP ocorre uma marcação celular intensa (12C, detalhe), sendo visível a presença de processos celulares e de neurópila (12B-D). Abreviaturas. LStL: porção lateral do estriado lateral. GP: globo pálido; INP: núcleo intrapeduncular; LStC: porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral; MSt: estriado medial. Barra de escala = 225 μm (A-D), sendo no detalhe em 12C de 45 μm .

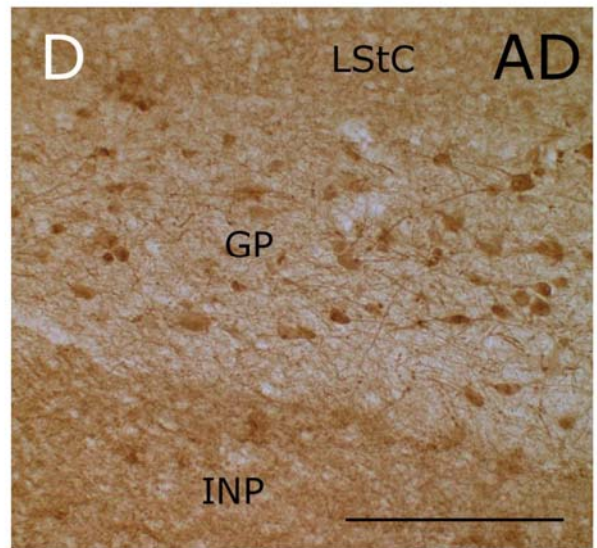
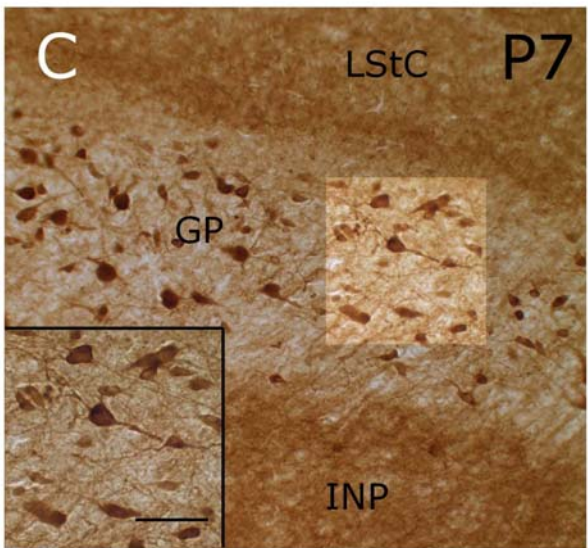
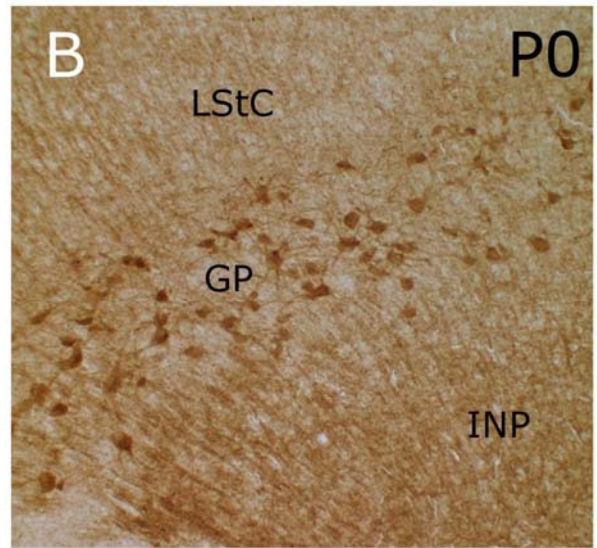
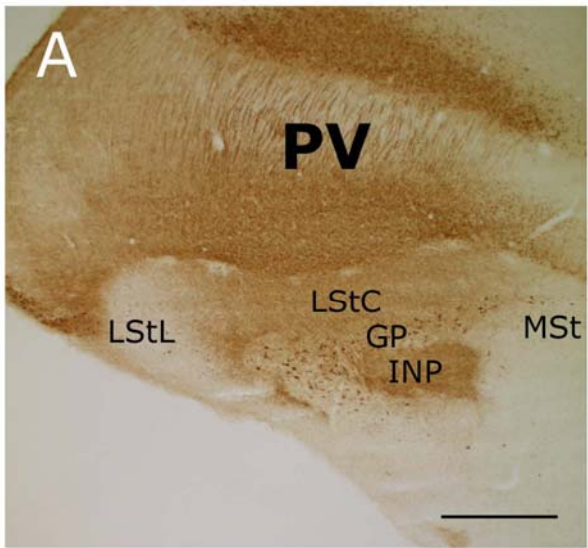


Figura 13: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a PV em cortes frontais do encéfalo de pombos, área dos núcleos da base, com enfoque no LStC, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão de expressão de PV ao longo dos dias pode ser observado nas imagens 13A – C. Além da neurópila marcada é possível observar presença crescente de corpos celulares. No detalhe em 13B notamos duas destas células. Abreviaturas. GP: globo pálido; LStC: porção central do estriado lateral. Barra de escala = 225 μm (A-C), de 90 μm no detalhe.

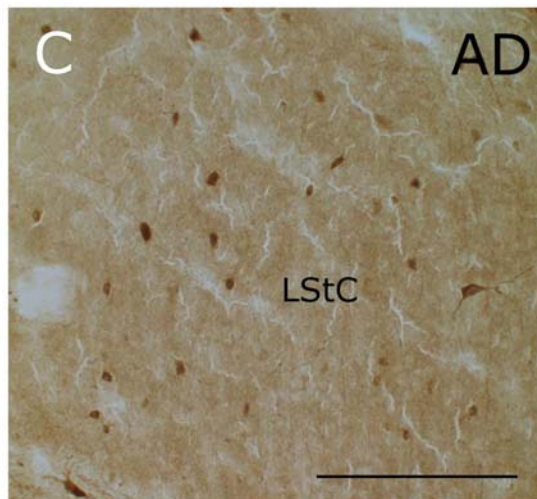
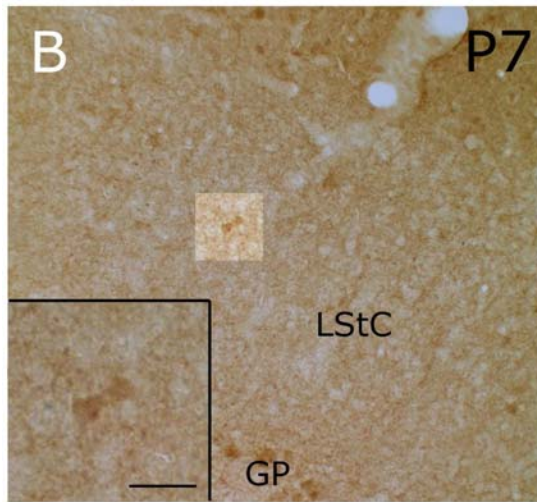
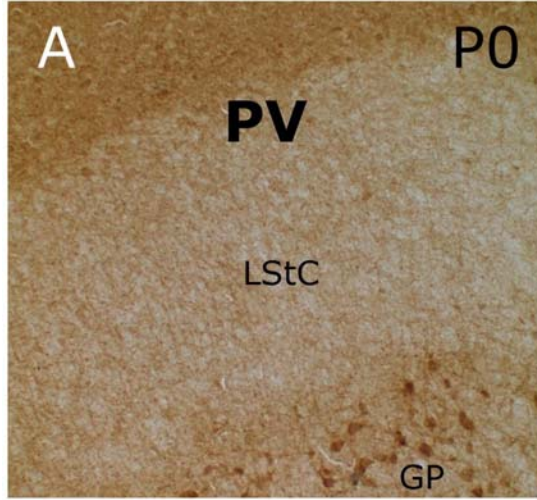
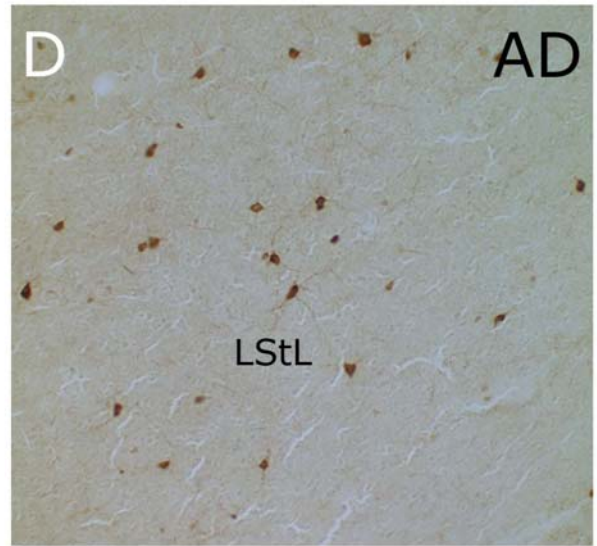
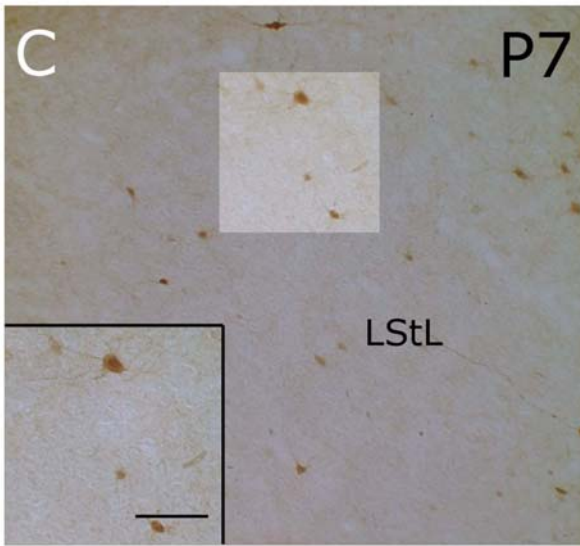
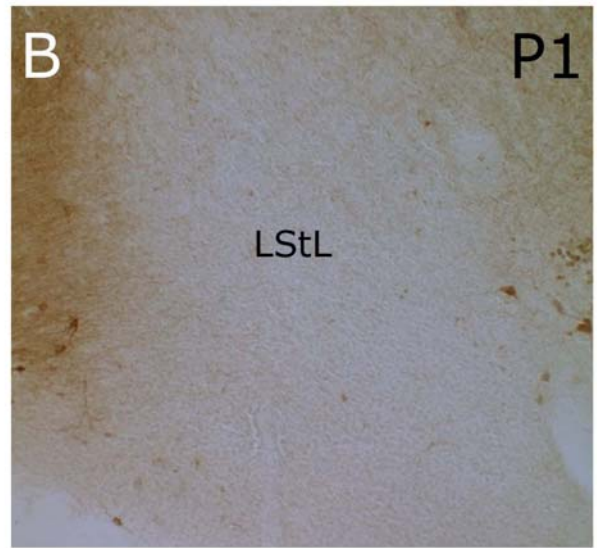
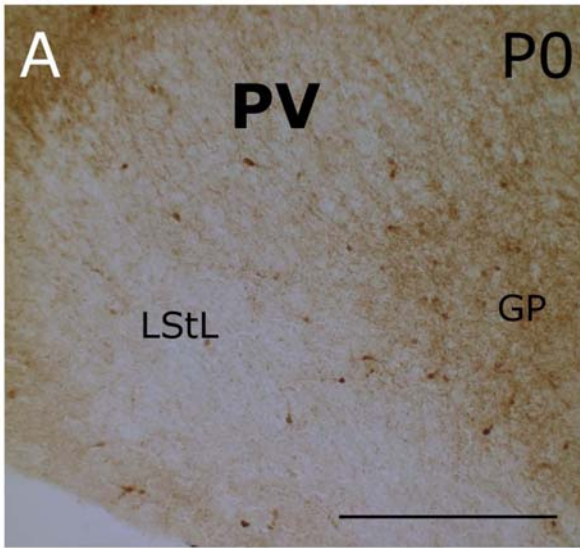


Figura 14: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a PV em cortes frontais do encéfalo de pombos na área dos núcleos da base, com enfoque no LStL, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão de expressão de PV ao longo dos dias pode ser observado nas imagens 14A – D, sendo a neurópila fraca e a presença de corpos celulares pode ser notada especialmente em P0 e na idade adulta. Abreviaturas. GP: globo pálido; LStL: Porção lateral do estriado lateral. Barra de escala = 225 μm (A-D), sendo no detalhe de 20C = 45 μm .



CB

A proteína ligante de cálcio CB apresentou, em geral, um padrão tardio de expressão no telencéfalo de aves. A imunorreatividade foi praticamente nula junto ao estriado e globo pálido, assim como nas regiões vizinhas, durante os dez primeiros dias de vida (Figura 15 A – C). Diferente de outras áreas, como a região hipocampal onde é possível observar células com intensa imunorreatividade para CB desde idades pós-natais iniciais (Figura 15D), a região dos núcleos da base de pombos somente apresenta neurônios CB+ muito próximo da etapa adulta.

Na fase adulta, é possível observar neurópila presente no estriado, sendo um pouco mais evidente no LStC (Figura 16 A). No GP, no entanto, a marcação em neurópila foi pobre. Apesar de não mostrado, o nidopálido, o entopálido e o estriado medial apresentaram, com poucas variações, neurópila pouco marcada. No INP é possível visualizar grande presença de corpos e processos celulares (figura 16 A), cujo padrão de marcação pode ser visto em detalhe na figura 16E.

Figura 15: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a CB em cortes frontais do encéfalo de pombos nos núcleos da base e região do hipocampo, em diferentes estágios de desenvolvimento. O padrão de expressão de CB foi nulo na região dos núcleos da base durante os primeiros dez dias de vida (15 A – C). A figura 15D ilustra o padrão de marcação para CB presente na região do hipocampo de um animal com 5 dias (P5). Abreviaturas. GP: globo pálido; Hp: hipocampo; INP: núcleo intrapeduncular; LStC: porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral; MSt: estriado medial. Barra de escala=225µm.

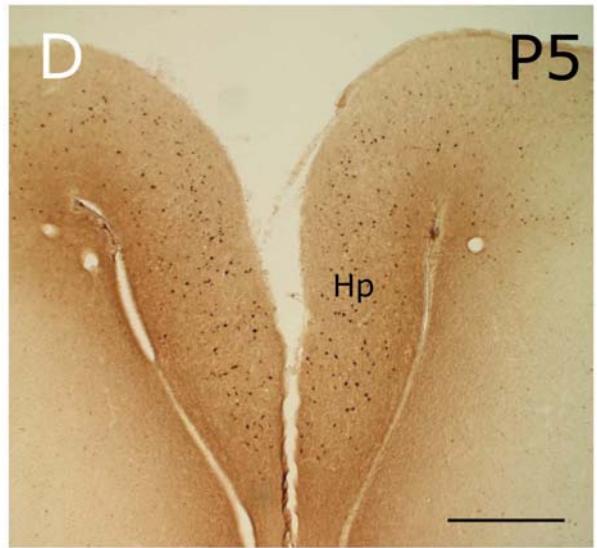
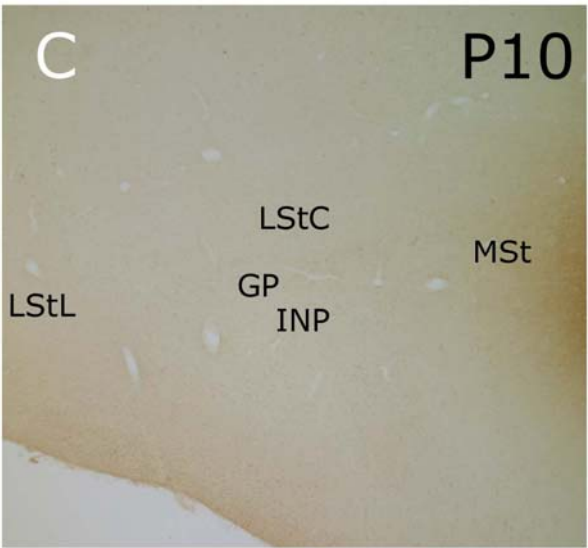
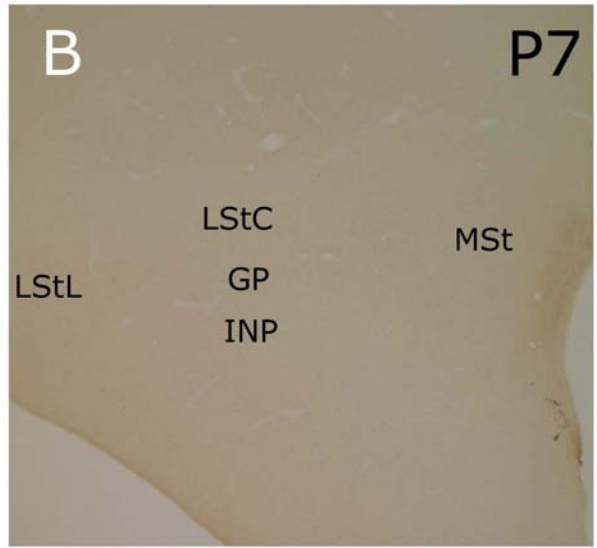
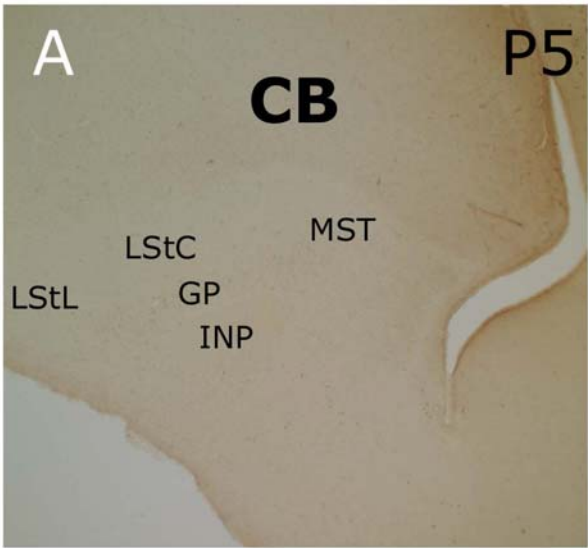
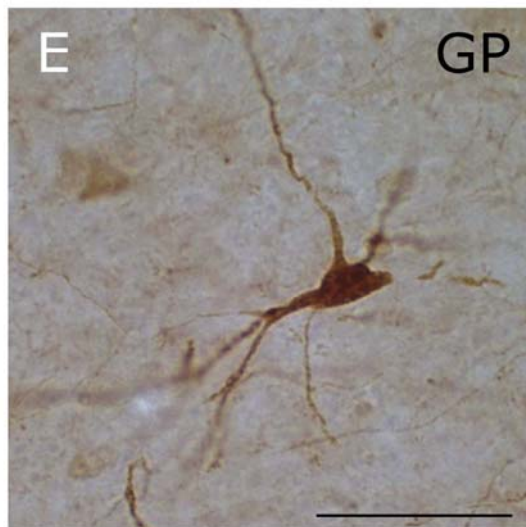
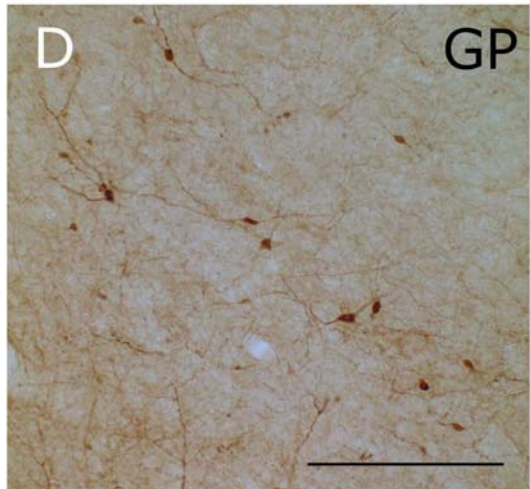
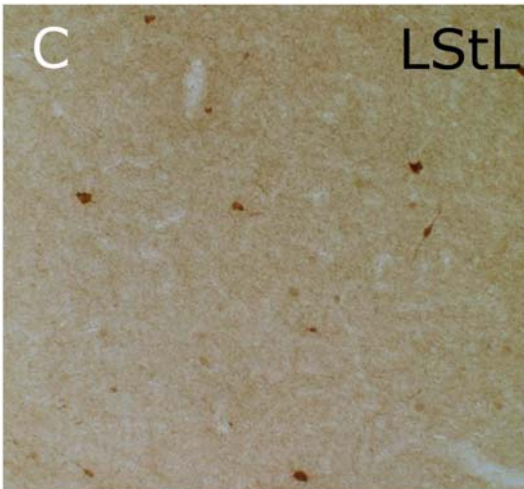
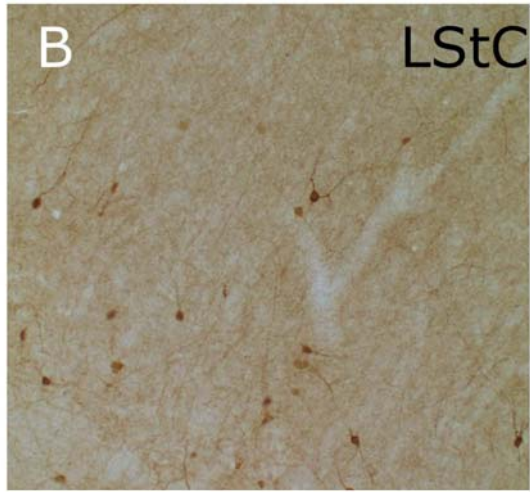
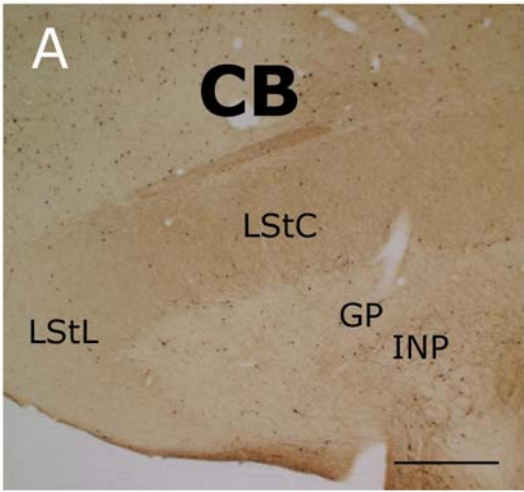


Figura 16: Imagens digitalizadas da imunorreatividade a CB em cortes frontais do encéfalo de pombos na área dos núcleos da base de um animal adulto. O padrão geral de expressão (16 A) mostra marcação pouco intensa de neurópila CB+ no LStC e LStL, e menos intensa ainda no GP. Nestas três regiões é possível observar corpos celulares intensamente marcados (16B – C). A figura 16E evidencia detalhes de uma célula do GP e seus bem delineados processos celulares. Abreviaturas. GP: globo pálido; INP: núcleo intrapeduncular; LStC: porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral. Barra de escala = 225 μm (A-D) e 50 μm em E.



IV.2. ASPECTOS QUANTITATIVOS

IV.2.1. GIEMSA

A aparente tendência à dispersão na distribuição celular ao longo da idade (Figura 3A - D) se tornou evidente com a contagem celular (Tabelas 1, 2 e 3; Figura 17). Os valores obtidos no GP variaram de cerca de 125 células no dia do nascimento atingindo 95 células em P10 e 34 células no animal adulto. No LStC cerca de 441 células estavam presentes ao nascimento, caindo para 187 células aos dez dias de vida e 182 na fase adulta. Já no LStL foram contadas cerca de 450 células em P0, 252 células em P10 e cerca de 225 na idade adulta. Os valores na íntegra estão descritos nas Tabelas 1, 2 e 3 e ilustrados na Figura 17.

O número de células coradas pela técnica de GIEMSA foi, na área estudada, progressivamente decrescente ao longo da idade tanto no GP, quanto no LStC e LStL. Esta redução foi bastante consistente, atingindo entre P0 e adulto um total de 72% no GP, 58% no LStC e quase 50% no LStL.

Em números absolutos, é possível notar que a concentração de células presente no GP foi drasticamente menor que da concentração de células no LSt. Dentro do próprio LSt, apesar das características celulares semelhantes, observamos diferenças nos valores da concentração celular, sendo sempre maiores no LStL, em todas idades.

Nossos dados indicaram uma queda, ao longo do tempo, na razão de células presentes na área de contagem (proporcional à $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$). Esta queda no número total de células apresentou comportamentos diferentes entre o LSt e GP. O

LSt apresentou desempenho semelhante entre as porções central (LStC) e lateral (LStL), mostrando um decréscimo gradual variando apenas na intensidade. Este decréscimo foi especialmente intenso entre P0 e P1, quando houve uma redução entre 24% (LStL) e 28% (LStC) na quantidade de células presentes. O número de células continuou decaindo durante os demais dias. Entre P3 e P10 a concentração de células no LStL caiu mais 24% sendo que no LStC a queda foi bem mais expressiva, atingindo mais 37% de perda. Na idade P10, a densidade de células presentes no LSt está bem próxima da fase adulta, especialmente no LStC, visto que decaiu menos que 3% entre estas duas idades, e cerca de 10% no LStL.

Já no GP, nos primeiros dez dias a queda no número de células foi relativamente mais sutil, decaindo apenas cerca de 24% entre P0 e P10. Porém, a queda na concentração celular foi bastante expressiva entre o 10º dia de vida e a fase adulta, o que correspondeu a mais de 63%.

A queda na concentração celular apresentou, portanto, comportamentos temporalmente diferentes entre GP e LSt. A redução no GP, que atingiu mais de 72% (P0 – adulto) no total de células, foi concentrada na fase entre P10 e a idade adulta. No entanto, a redução na concentração celular presente no LSt, que esteve ao redor de 50% a 58% (LStL e LStC, respectivamente) ocorreu predominantemente entre dos primeiros dez dias de vida.

Tabela 1: Densidade média de células presentes em 62,5 mm² do território correspondente ao globo pálido (GP) do encéfalo de pombos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal. Valores expressos em número absoluto (média ± desvio padrão) e porcentagem (o número de células coradas pela técnica de GIEMSA na respectiva idade foi considerado 100%). Área = 250µm X 250µm.

IDADE	TIPO DE MARCAÇÃO					
	GIEMSA	GLUR1	GLUR2/3	GLUR4	PV	CB
P0	125,28±13,80	38,28±11,00	18,15±6,08	14,81±4,25	32,00±7,63	0
	100%	30,55%	14,48%	11,81%	25,54%	
P1	125,85±16,27	51,47±7,69	19,22±5,12	20,31±5,09	31,76±5,44	0
	100%	40,89%	15,27%	16,13%	25,33%	
P3	112,42±7,85	56,52±13,59	20,14±5,95	22,00±4,10	25,84±6,14	0
	100%	50,27%	17,91%	19,56%	22,98%	
P5	105,90±9,04	22,43±5,32	15,53±5,17	21,52±6,52	24,33±6,56	0
	100%	21,18%	14,74%	20,32%	22,97%	
P7	110,28±15,75	7,71±4,14	13,50±1,29	22,44±6,35	22,05±6,36	0
	100%	17,56%	12,24%	20,34%	19,99%	
P10	95,42±28,97	1,81± 1,61	13,36± 1,8	19,10±4,77	16,10±4,25	0
	100%	1,89%	14,00%	20,01%	16,87%	
AD	34,76±10,86	12,60±4,53	11,95±2,19	14,30±3,37	16,61±4,59	4,33±1,76
	100%	36,24%	34,37%	41,39%	47,78%	12,85%

Tabela 2: Densidade média de células presentes em 62,5 mm² da porção central do estriado lateral (LStC) do encéfalo de pombos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal. Valores expressos em número absoluto (média ± desvio padrão) e porcentagem (o número de células coradas pela técnica de GIEMSA na respectiva idade foi considerado 100%). Área = 250µm X 250µm.

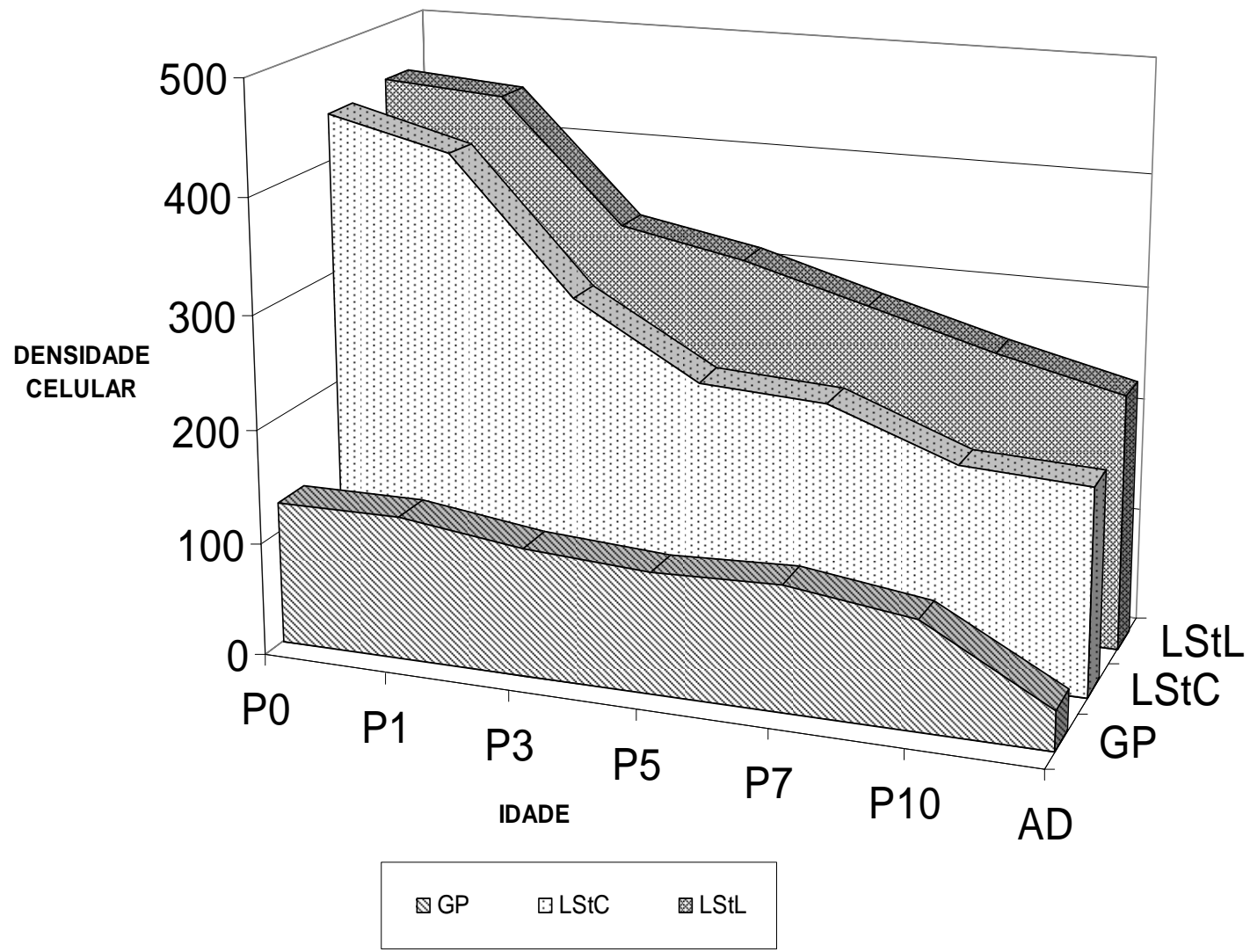
IDADE	TIPO DE MARCAÇÃO					
	GIEMSA	GLUR1	GLUR2/3	GLUR4	PV	CB
P0	441,00±29,25	38,00 ± 10,56	66,66±7,22	2,85± 3,10	1,00±0,81	0
	100%	8,61%	15,11%	0,64%	0,22%	0
P1	414,14±39,49	60,11 ± 8,68	75,12±15,95	2,96±3,99	1,16±1,64	0
	100%	14,51%	18,13%	0,71%	0,28%	0
P3	297,80±9,89	70,12 ± 13,44	94,05±18,85	5,00±3,68	1,4±1,27	0
	100%	23,54%	31,58%	1,67%	0,47%	0
P5	234,90±30,15	77,73 ± 23,32	97,1±13,09	20,04±5,43	1,73±1,48	0
	100%	33,09%	41,34%	8,53%	0,73%	0
P7	228,33±17,05	70,67 ± 28,87	101,42±13,56	20,90±8,61	2,45± 1,67	0
	100%	30,95%	44,41%	9,15%	1,07%	0
P10	187,47±19,98	64,30 ± 10,51	110,11±14,35	16,76±5,04	3,69±1,72	0
	100%	34,29%	58,73%	8,94%	1,96%	0
AD	182,23±17,06	64,61 ± 15,93	118,33±10,75	9,5±2,95	9,25±1,28	2,47±1,02
	100%	35,45%	64,93%	5,21%	5,21%	1,35%

Tabela 3: Densidade média de células presentes em 62,5 mm² da porção lateral do estriado lateral (LStL) do encéfalo de pombos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal. Valores expressos em número absoluto (média ± desvio padrão) e porcentagem (o número de células coradas pela técnica de GIEMSA na respectiva idade foi considerado 100%). Área = 250µm X 250µm.

IDADE	TIPO DE MARCAÇÃO					
	GIEMSA	GLUR1	GLUR2/3	GLUR4	PV	CB
P0	450,19±48,27	27,57±7,97	18,33±2,94	0,90±0,73	6,63±3,74	0
	100%	6,12%	4,07%	0,19%	1,47%	0
P1	441,19±51,93	14,60±4,03	17,50±6,13	0,46±0,66	1,61±1,26	0
	100%	3,30%	3,96%	0,10%	0,36%	0
P3	334,19±24,51	18,14±6,93	17,70±6,89	1,54±1,75	3,58±3,14	0
	100%	5,42%	5,29%	0,46%	1,30%	0
P5	313,57±24,51	22,90±4,06	17,57±5,71	6,11±2,57	4,89±2,30	0
	100%	7,30%	5,60%	1,94%	1,15%	0
P7	282±27,13	25,00±6,00	22,46±6,47	7,29±3,11	5,68±2,95	0
	100%	8,86%	7,96%	2,58%	1,71%	0
P10	252,15±25,62	27,00±6,15	27,44± 5,59	5,27±1,51	8,08±2,76	0
	100%	10,70%	10,88%	2,09%	3,00%	0
AD	225,61±31,16	77,78±18,54	43,25±7,69	2,28±0,99	11,72±4,47	3,18± 0,98
	100%	34,52%	17,12%	1,01%	5,19%	1,40%

Figura 17: Densidade celular média corada pelo método de GIEMSA nos núcleos da base de pombos durante o desenvolvimento pós-natal. Em LStC e LStL é possível notar um decréscimo gradual ao longo dos primeiros 10 dias de vida. No GP, o decréscimo é visível entre o 10^o dia e a idade adulta. GP: globo pálido; LStC; porção central do estriado lateral; LStL: porção lateral do estriado lateral. Área de contagem = 250µm X 250µm.

GIEMSA



IV.2.2. – RECEPTORES DO TIPO AMPA

A contagem dos corpos celulares imunorreativos aos anticorpos contra as subunidades do receptor de glutamato do tipo AMPA (GluR1, GluR2/3 e GluR4) e das proteínas ligantes de cálcio parvalbumina (PV) e calbindina (CB) evidenciou padrões diferentes de expressão etária. Os valores (média \pm desvio padrão) da contagem celular realizada no GP, LStC e LStL estão respectivamente descritos nas tabelas 1, 2 e 3.

A expressão de GluR1 na idade adulta obteve porcentagens semelhantes de expressão quando comparamos LSt e GP. Porém, variações muito diferentes entre estes dois núcleos foram encontradas ao longo do desenvolvimento pós-natal inicial. Diferenças etárias na curva de expressão desta subunidade também foram observadas entre a região central e lateral do estriado. A subunidade GluR2/3 também foi diferencialmente expressa no GP e estriado, sendo que no estriado central, sua expressão foi vastamente distribuída. Durante o desenvolvimento, a expressão de GluR2/3 no estriado foi crescente, enquanto que no GP, ocorreu um declínio gradual no número absoluto da densidade de células a partir de P3. Na idade adulta, GP apresentou, proporcionalmente ao LSt, grande expressão de células GluR4+ e PV+. Esta diferença esteve presente em todas as idades. Durante o desenvolvimento inicial, o número absoluto de corpos celulares GluR4+ foi crescente no início do desenvolvimento e decrescente após P7, tanto no LSt como no GP. A imunorreatividade a PV tendeu a crescer ao longo do desenvolvimento do estriado e decrescente no GP. A observação em particular das regiões central (LStC) e lateral (LStL) do LSt mostrou-se pertinente, uma vez que diferenças na

expressão tanto de receptores de glutamato quanto de PV foram evidentes. Em ambos os núcleos, a proteína CB esteve presente apenas na idade adulta.

GP

Durante os primeiros dias de vida podemos observar o predomínio de expressão da subunidade GluR1. Durante o início do desenvolvimento, um padrão específico na variabilidade pode ser notado para as diferentes proteínas, sendo que na fase adulta a densidade de células imunorreativas aos anticorpos contra às diferentes subunidades do receptor de glutamato é semelhante, sendo ligeiramente maior em GluR4.

A imunorreatividade ao anticorpo contra a subunidade GluR1 cresce de P0 (30%) à P3 (50%) e decai progressivamente até P10 (equivalente a menos de 2% do total de células). Interessantemente, na idade adulta podemos novamente notar a presença de corpos celulares GluR1+ (36%) (Tabela 1 e Figura 3).

O número total de células GluR2/3+ presentes no GP nos primeiros três dias de vida pouco variou, sendo observado apenas um pequeno aumento na porcentagem, que passou de 14% em P0 para quase 18% em P3. A partir desta idade, o número absoluto de células imunorreativas ao anticorpo contra GluR2/3 caiu progressivamente em P7 (10%), quando se tornou relativamente estável. Porém, devido a diminuição do número total de células (coloração GIEMSA) a partir de P10, os valores percentuais que chegaram a cerca de 12% (P7), passaram a subir atingindo 34% (Tabela 1, Figuras 18 e 19).

A quantidade absoluta de corpos celulares GluR4+ presentes no GP teve uma variação mais expressiva apenas ao redor do nascimento com cerca 15 células em P0 e cerca de 20 células em P1, permanecendo por volta deste valor até o 10^o dia de vida (Tabela 1 e Figuras 18 e 19). De P10 à idade adulta, no entanto, foi registrada uma queda no número absoluto, que retornaram a cerca de 14 células por área. Porém, considerando os valores percentuais, podemos observar um crescimento de P0 (12% aproximadamente) até P3 (19,5%), mantendo-se num patamar relativamente estável até P10. Na fase adulta, porém, a porcentagem de células GluR4+ chega a atingir 41% do total (Tabela 1, Figura 18 e 19).

A contagem celular evidenciou um número decrescente de corpos celulares PV+ no GP nos primeiros 10 dias de vida. De P0 a P10 os valores de densidade das células PV-imunorreativas no GP reduziram-se quase à metade com os valores em P10 bastante similares ao do adulto (Figura 18). Os valores percentuais (Figura 19) decrescem lentamente de P0 (cerca de 25% do total de células) até P10 (aproximadamente 17%), porém crescem muito no animal adulto. Esse dado deve ser analisado junto dos resultados de contagem geral, onde observamos a expressiva queda do número total de células neste núcleo na idade adulta (Tabela 1; Figura: 17).

A expressão de CB durante os primeiros dias de vida foi nula no GP. Uma quantidade pequena de células marcadas (4,33 por área), porém significativa do ponto de vista percentual (quase 13%) pode ser observada na idade adulta (Tabela 1, Figuras 18 e 19).

Figura 18: Densidade celular média da imunorreatividade aos anticorpos contra as subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 do receptor de glutamato do tipo AMPA e às proteínas ligantes de cálcio parvalbumina (PV) e calbindina (CB) no globo pálido (GP) de pombos durante o desenvolvimento pós-natal. A densidade celular GluR1+ cresce até P3, quando passa a decair intensamente até P10, retomando porte da expressão em P10. Um modesto decréscimo de corpos GluR2/3+ ocorre especialmente ao redor do 5º dia de vida. A densidade celular GluR4+ foi crescente no primeiro dia de vida, ficando relativamente estável até P7 quando decresce parcialmente. A expressão de células PV+ é alta em todas as idades, porém tende a decair com o tempo. Corpos celulares CB+ são observados somente na idade adulta. Área de contagem = 250µm X 250µm.

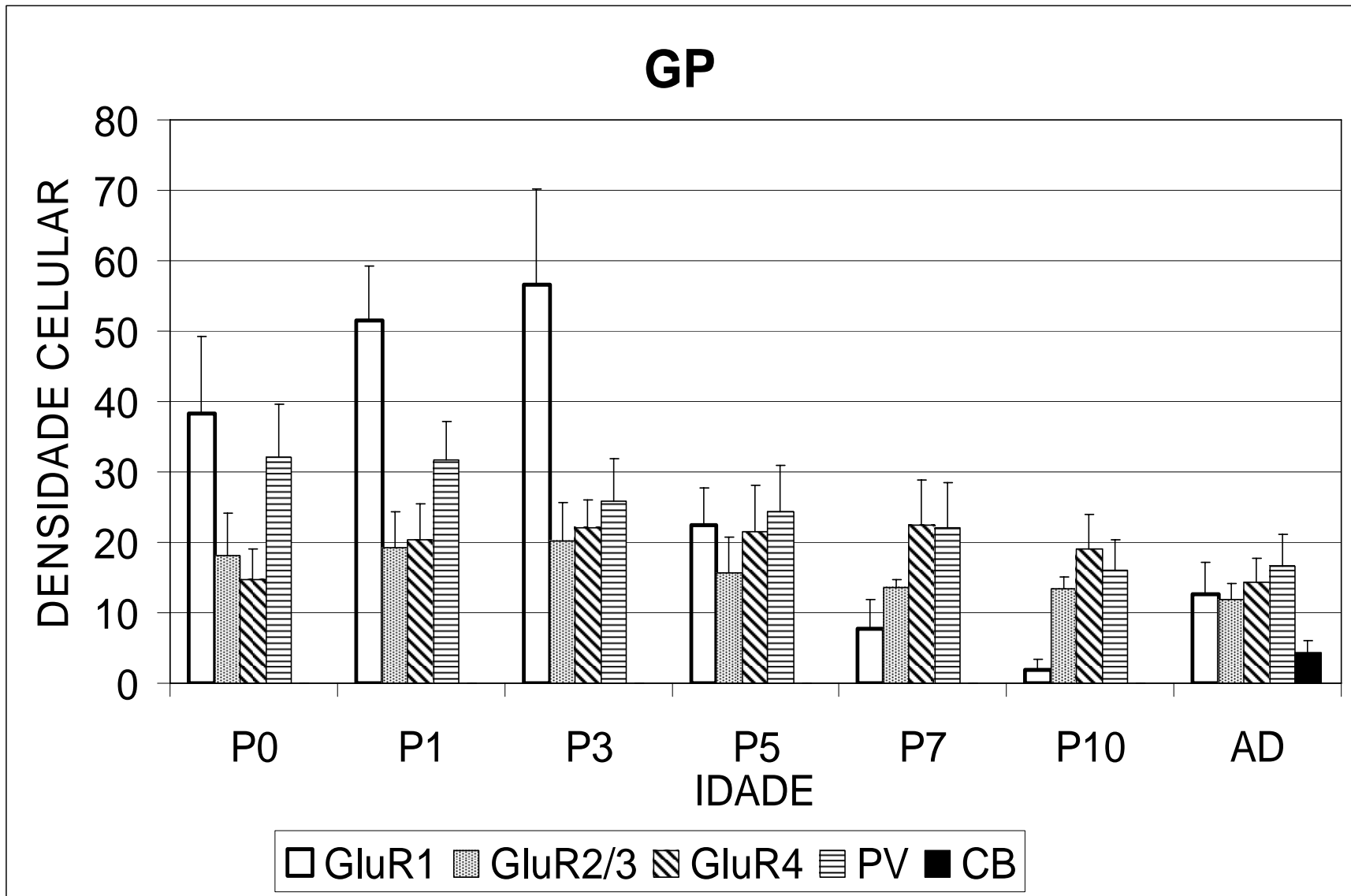
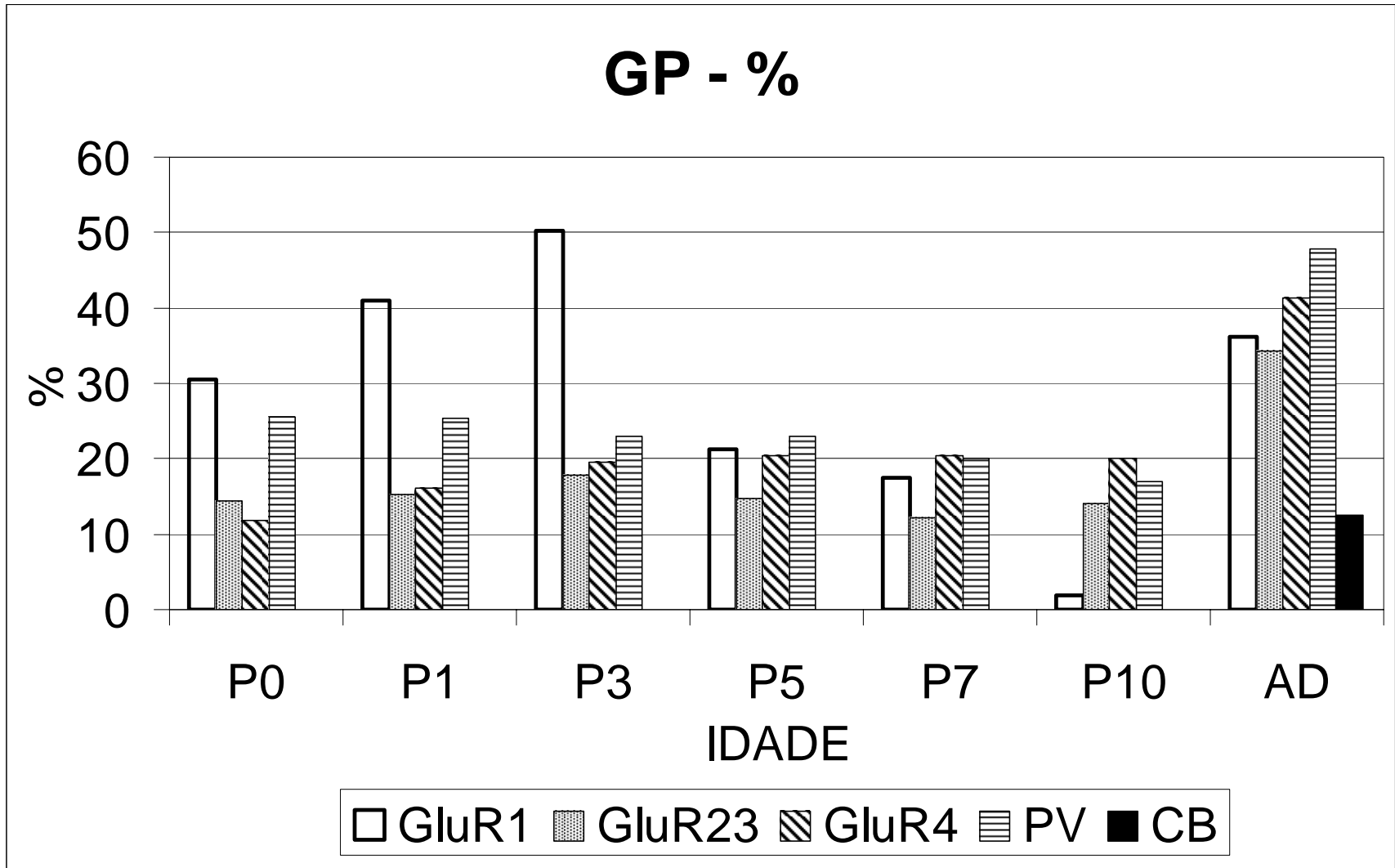


Figura 19: Porcentagem de células imunorreativas aos anticorpos contra as subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 do receptor de glutamato do tipo AMPA e às proteínas ligantes de cálcio parvalbumina (PV) e calbindina (CB) no globo pálido (GP) de pombos durante o desenvolvimento pós-natal. No GP, a expressão inicialmente crescente de GluR1 decai progressivamente após P3 e somente na idade adulta é novamente expressa. Para GluR2/3, a expressão pouco varia nos primeiros 10 dias de vida, sendo mais intensa em P5, porém, na idade adulta um pico importante pode ser observado. A expressão de células GluR4+ é presente desde o nascimento, tem um grande acréscimo entre P10 e a idade adulta. PV é bastante expressa no GP, porém tende a decair com o tempo exceto na idade adulta, quando a porcentagem aumenta bastante. Neurônios contendo CB podem ser observados apenas na fase adulta. Área de contagem = 250µm X 250µm.



LStC

Na região central do estriado lateral a contagem celular revelou a vasta prevalência das subunidades GluR1 e, principalmente GluR2/3, em relação à GluR4. A presença de proteínas ligantes de cálcio foi bem menos expressiva que no GP.

No LStC uma média de 38 corpos celulares GluR1+ foram contados no dia do nascimento, crescendo rapidamente para cerca de 60 em P1, atingindo em pico de expressão em P5 com cerca de 77 corpos e decrescendo até P10 (64 corpos GluR1+), quando são encontrados valores semelhantes ao do adulto (Tabela 2 e Figura 20). Os valores percentuais de células GluR1+, foram crescentes ao longo de praticamente todas as idades estudadas, partindo de cerca de 8% ao nascimento, atingindo 33% em P5, tendo uma leve queda em P7 (aproximadamente 31%) e retornando a crescer em seguida chegando a 35% na idade adulta (Tabela 2 e Figura 21).

A marcação para GluR2/3 mostrou um crescimento regular no número de células imunorreativas ao longo do desenvolvimento, tanto em valores absolutos quanto em porcentagem. Em P0 cerca de 66 células foram imunopositivas, o que equivale a 15% do valor total de células desta idade, já a idade adulta atingiu 118 células (64%). Assim, é possível notar que quase dobrou o número absoluto de células e mais que quadruplicou o valor percentual (Tabela 2, figuras 20 e 21).

O LStC apresentou uma expressão crescente de corpos celulares GluR4+ do nascimento (cerca de 3 células por área ou pouco mais que 0,5 % do total) até o

sétimo dia de vida (cerca de 21 células por área ou pouco mais de 9%). Após esta data, o número de células GluR4+ decaiu para 9 células por área (5% do total) na fase adulta (Tabela 2, Figuras 20 e 21). Apesar de crescente, são poucas as células PV+ que foram observadas no LStC, variando de cerca de uma célula (0,22%) em um único animal em P0 até cerca de 3,5 células (menos que 2%) em P10 e crescendo um pouco mais expressivamente até a fase adulta (pouco mais que 9 células ou 5% do total) (Tabela 2; Figuras 20, 21). Assim como no GP uma pequena quantidade de células pode ser observada no LStC somente na idade adulta. O número de células por área foi de cerca de 2,5 células, porém é menos expressivo do ponto de vista porcentual (1,35%) (Tabela 2, Figuras 20 e 21).

Figura 20: Densidade celular média da imunorreatividade aos anticorpos contra as subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 do receptor de glutamato do tipo AMPA e às proteínas ligantes de cálcio parvalbumina (PV) e calbindina (CB) Na região central do estriado lateral (LStC) de pombos durante o desenvolvimento pós-natal. A densidade celular GluR1+ expressão é crescente até P5, quando passa a cair, estabilizando em P10. A expressão de GluR2/3 é crescente do nascimento até a idade adulta. Corpos celulares GluR4+ são expressos principalmente entre P5 e a idade adulta, mas menos intensamente que as demais subunidades. Proteínas ligantes de cálcio são pouco expressas no LstC, principalmente durante o desenvolvimento inicial. Área de contagem = 250 μ m X 250 μ m.

LStC

DENSIDADE CELULAR

140
120
100
80
60
40
20
0

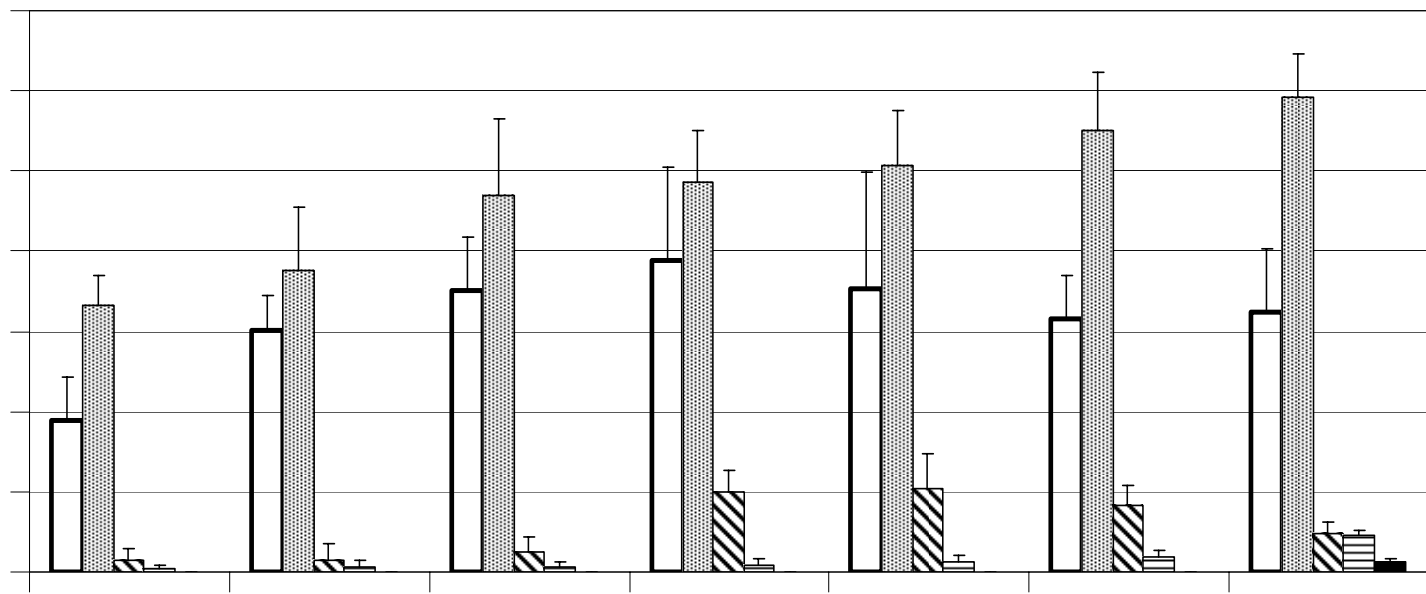
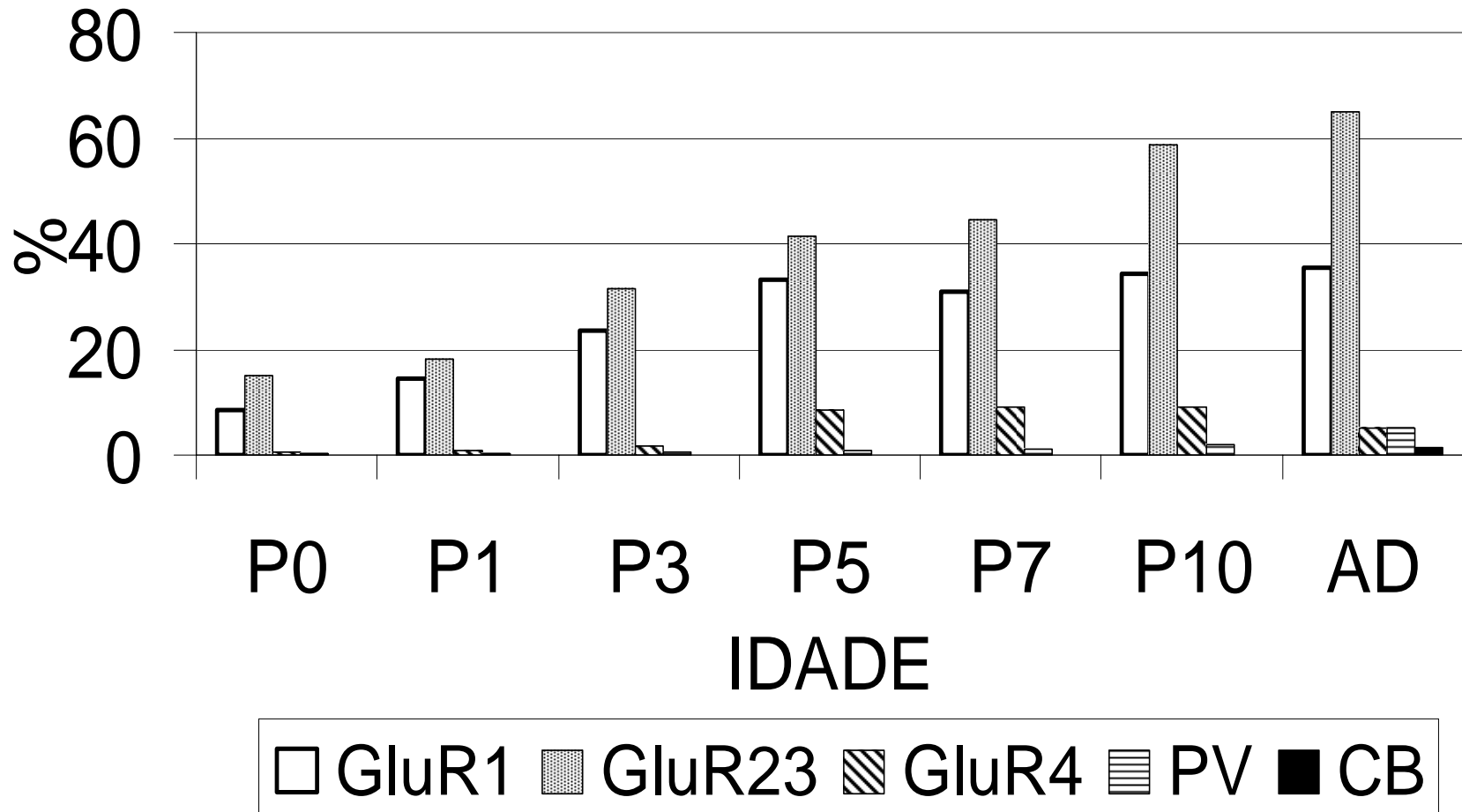


Figura 21: Porcentagem de células imunorreativas aos anticorpos contra as subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 do receptor de glutamato do tipo AMPA e às proteínas ligantes de cálcio parvalbumina (PV) e calbindina (CB) na região central do estriado lateral (LStC) de pombos durante o desenvolvimento pós-natal. A expressão de corpos GluR1+ é crescente durante os cinco primeiros dias de vida, estabilizando em seguida. GluR2/3, no entanto é crescente durante todo o desenvolvimento. GluR4 apesar de pouco expressa está presente principalmente entre P5 e a fase adulta. Proteínas ligantes de cálcio são pouco expressas, sendo PV graficamente visível somente na fase adulta. Área de contagem = 250µm X 250µm.

LStC - %



LStL

O LStL apresenta, de forma similar ao LStC, predomínio de expressão para as proteínas GluR1 e GluR2/3, mas em menor magnitude. Porém, GluR1, que durante os primeiros dez dias de vida era quantitativamente expresso de forma similar à GluR2/3, na fase adulta se sobressai, atingindo porcentagem semelhante à encontrada no LStC (Figuras 22 e 23).

GluR1 apresentou logo após o nascimento uma queda de cerca de 50% (em relação ao próprio valor absoluto) no número de células imunorreativas, tendo P0 aproximadamente 27 (6%) células imunorreativas e em P1 apenas 14 (3%) células. A partir de então, o número e a porcentagem de células cresceu progressivamente até P10 (27 células ou 10%), atingindo cerca de 77 células na idade adulta (34%) (Tabela 3 e Figuras 22 e 23).

O número absoluto e a porcentagem de células GluR2/3+ mantiveram-se relativamente estáveis do nascimento até P5, variando em torno de 17 células (4 a 5 % do total). Entre P5 e P7 começa a crescer o número de células, atingindo cerca de 43 células na idade adulta (19%) (Tabela 3, figuras 22 e 23).

A densidade celular GluR4+ na região lateral do estriado apresentou comportamento semelhante à região central, variando apenas em magnitude. Em P0, na média de menos que 1 (uma) célula era observada por área (representando 0,19%), chegando a mais de 7 células em P7 (2,5%) e decaindo para aproximadamente 2 células na fase adulta (1%) (Tabela 3, Figuras 22 e 23).

Uma queda expressiva na quantidade de células PV+ ocorre ao redor do primeiro dia de vida. Em P0, cerca de 6,5 (cerca de 1,5%) células PV+ estão presentes enquanto que em P1 este número decai para 1,5 células (0,36%). A partir de P1, passa a crescer tanto o número absoluto quanto a porcentagem de células presentes no LStL, atingindo quase 12 células (5%) na idade adulta (Tabela 3, Figuras 22 e 23).

Assim como no LStC, poucas células CB+ podem ser observadas nos no LStL, somente na idade adulta. O número de células por áreas foi de pouco mais de 3, o que equivale a cerca de 1,4% (Tabela 3, Figuras 22 e 23).

Figura 22: Densidade celular média da imunorreatividade aos anticorpos contra as subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 do receptor de glutamato do tipo AMPA e às proteínas ligantes de cálcio parvalbumina (PV) e calbindina (CB) Na região lateral do estriado lateral (LStL) de pombos durante o desenvolvimento pós-natal. É possível notar um decréscimo na expressão de corpos GluR1+ em P1, seguido de um aumento lento e gradual até P10 e intenso entre P10 e adulto. GluR2/3 é expressa de forma crescente após P5. A densidade celular GluR4+ cresce lentamente até P7 quando passa a decrescer parcialmente. Exceto entre P0 e P1, quando ocorre uma queda de expressão de células, a imunorreatividade a PV foi crescente até a idade adulta. Podemos notar uma pequena expressão da proteína CB na fase adulta. Área de contagem = 250µm X 250µm.

LStL

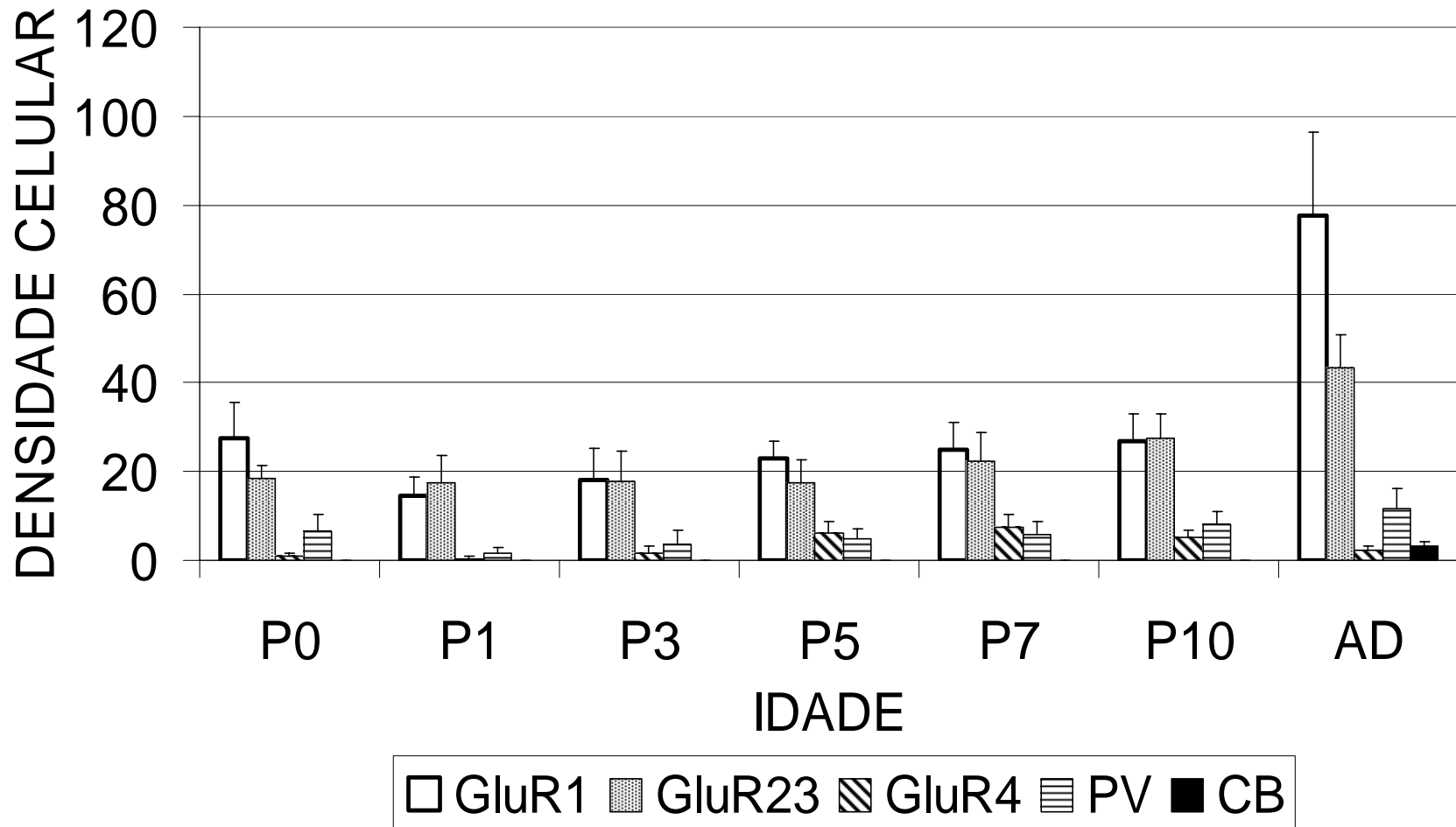
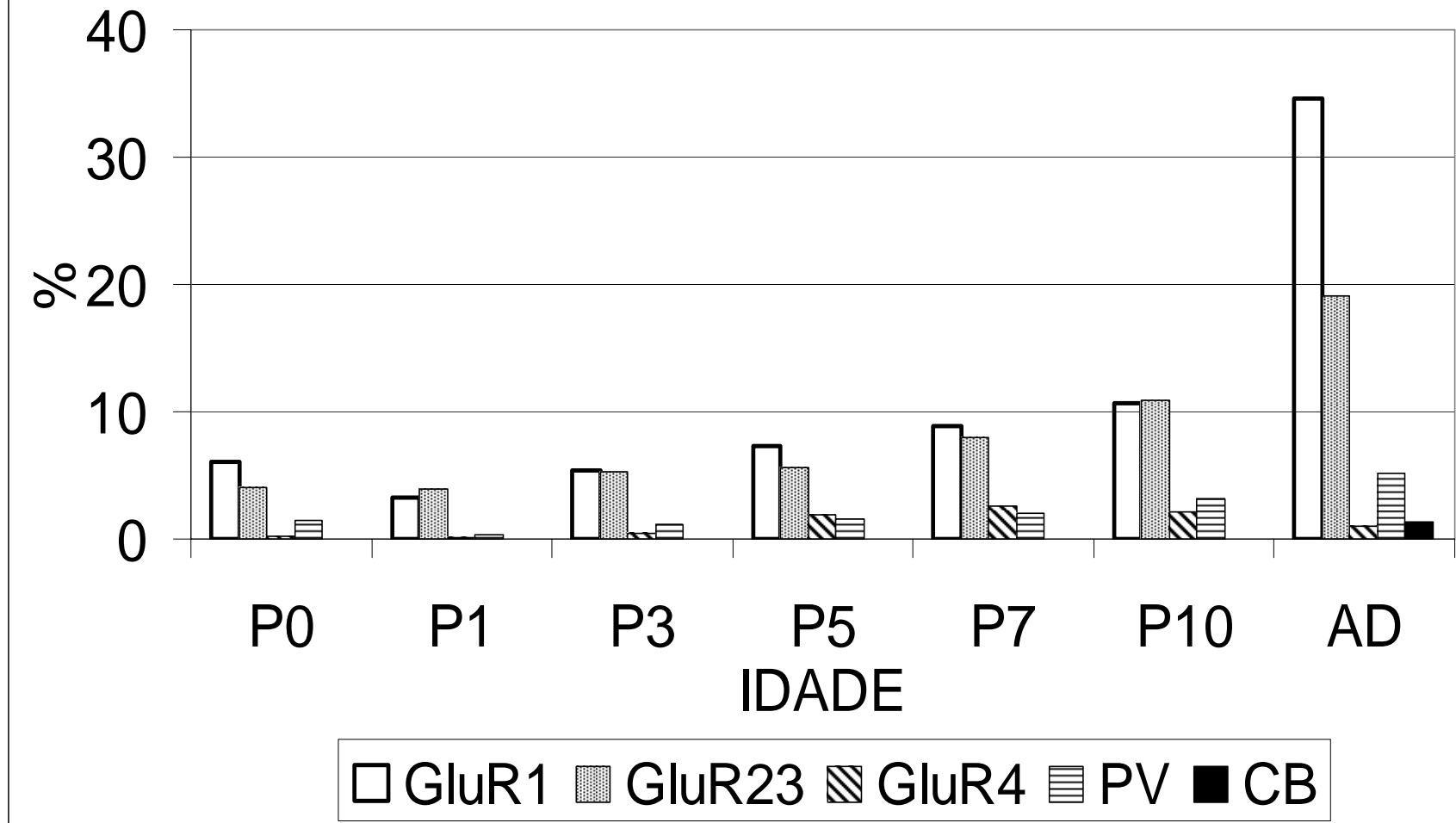


Figura 23: Porcentagem de células imunorreativas aos anticorpos contra as subunidades GluR1, GluR2/3 e GluR4 do receptor de glutamato do tipo AMPA e às proteínas ligantes de cálcio parvalbumina (PV) e calbindina (CB) na região lateral do estriado lateral (LStL) de pombos durante o desenvolvimento pós-natal. É possível notar um decréscimo na expressão de corpos GluR1+ em P1, seguido de um aumento lento e gradual até P10 e intenso entre P10 e adulto. GluR2/3 é expressa de forma crescente durante o desenvolvimento. A densidade celular GluR4+ flutua suavemente com pequenos picos entre P5 e P10. Embora pouco expressiva (abaixo de 10%), a imunorreatividade a PV foi crescente até a idade adulta. Podemos notar na fase adulta uma pequena expressão da proteína CB. Área de contagem = 250µm X 250µm.

LStL - %



V. DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento pós-natal de pombos, nossos experimentos revelaram uma tendência a queda na densidade celular na região dos núcleos da base. No estriado lateral encontramos que o maior decréscimo ocorre durante os dez primeiros dias de vida, enquanto que no globo pálido ocorre entre P10 e a fase adulta.

O globo pálido (GP) apresentou maior dispersão celular que o LSt. Neste núcleo (GP) LAVERGHETA *et al.* (2005) identificaram corpos celulares cujo tamanho variou de médio a grande. A presença de células com grande diâmetro é bem evidente, também servindo como característica diferencial entre este e LSt.

É importante ressaltar que em nossos dados relacionados à concentração celular, a observação foi baseada em uma área restrita. Apesar de esta ser representativa e indicar uma redução na densidade de corpos celulares, pode não necessariamente indicar um decréscimo do número total de células presentes nos núcleos, uma vez que considerando o ganho de peso do animal, é possível ter ocorrido apenas uma dispersão decorrente do aumento de volume das estruturas.

Porém, dois fatos associados, o primeiro de que o GP e o LSt apresentaram quedas de densidade em períodos diferentes entre si e, o segundo de que as fases importantes no ganho de peso (e conseqüentemente de volume) do animal não ocorreram na mesma época que as principais variações de concentração celular, nos levam a crer na possibilidade de que esta redução no número de células presentes na área de contagem guarde relação com um processo de morte celular programada,

como descrito por LOPEZ-ROMAN & ARMENGOL (1996). De fato, podemos afirmar apenas que a variação da concentração celular no LSt e GP diferiu temporalmente. Esta discrepância poderia refletir diferentes períodos de maturação funcional, mesmo em estruturas tão intimamente ligadas.

Durante o desenvolvimento é comum ocorrer uma redução na quantidade de neurônios, pois aqueles que não estabelecem conexões sinápticas funcionais são eliminados (LOPEZ-ROMAN & ARMENGOL, 1996). Uma robusta fase de morte neuronal programada durante o desenvolvimento pós-natal acontece nos gânglios da base (JANEC & BURKE, 1993). Nossos dados concordam com este fato, pois a redução na densidade celular do número total de células pode fazer parte deste processo. Experimentos utilizando marcadores de apoptose durante a vida pós-natal de pombos seriam bastante interessantes elucidar esta hipótese.

RECEPTORES DE GLUTAMATO E TIPOS CELULARES

Na fase adulta, o padrão de marcação e a porcentagem de células GluRs+ e PV+ de nossos resultados são bastante semelhante aos dados encontrados por LAVERGHETTA *et al.* (2005), também em pombos. A distribuição regional dos receptores de glutamato do tipo AMPA nos núcleos da base de pombos reforça os paralelos entre mamíferos, aves e répteis (KARTEN & DUBBELDAM, 1973; KITT & BRAUTH, 1982; REINER *et al.*, 1983; MEDINA *et al.*, 1995; VEENMAN *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1996, 1998; BERNARD *et al.*, 1997; MEDINA & REINER, 1997; REINER *et al.*, 1998; FOWLER *et al.*, 1999; JIAO *et al.*, 2000; REINER *et al.*, 2001; REINER, 2002).

Utilizando-se de diferentes combinações de dupla-marcação, hibridização *in situ* e microscopia eletrônica, LAVERGHETTA *et al.* (2005) mostraram que a maioria dos neurônios GluR1+ no estriado de pombos são neurônios de projeção médio-espinhais GABAérgicos contendo SP ou ENK. Estes dados são consistentes com os dados apresentados em ratos (CHEN *et al.*, 1998). Células GluR1+ também estão presentes em interneurônios (CHEN *et al.*, 1998).

Experimentos mostram que a maioria dos neurônios de projeção médio-espinhais (SP+ ou ENK+) apresenta GluR2/3, corroborando com nossos dados quantitativos (CHEN *et al.*, 1998; LAVERGHETTA *et al.*, 2005). A subunidade GluR2 parece ser a mais abundante e vastamente distribuída, o que corresponde a implicações funcionais específicas na permeabilidade iônica (HOLLMANN, *et al.*, 1991; GÖTZ *et al.*, 1997; BORGES e DINGLEDINE, 1998; OZAWA *et al.*, 1998; STEFANI *et al.*, 1998; LANCELOT & BEAL, 1998; KEW & KEMP, 2005). O RNAm da subunidade GluR3 parece ser preferencialmente expresso em um grupo de neurônios de projeção que co-expressam SP e ENK (CHEN *et al.*, 1998).

Nossos dados mostraram a presença de intensa neurópila GluR1+ e GluR2/3+ presente no estriado. Estudos ultraestruturais mostraram que a neurópila imunorreativa a estas duas subunidades do receptor de glutamato tipo AMPA representa em pombos, assim como em ratos, dendritos ou espinhas dendríticas de neurônios de projeção, ou seja, dos neurônios médio-espinhais (CHEN *et al.*, 1998; LAVERGUETTA *et al.*, 2005). A expressão de receptores de glutamato no estriado corrobora com o fato de suas principais fontes de projeção (córtex e tálamo) serem glutamatérgicas (KARTEN, H.; DUBBELDAN, 1973; VEENMAN,

et al 1995; KWOK *et al.*, 1997; CHEN, *et al.*, 1998; 1998KITT & BRAUTH, 1998; REINER *et al.*, 1998; REINER, 2002; LAVERGUETTA *et al.*, 2005).

Estudos utilizando RT-PCR de célula única mostram que a vasta maioria dos corpos celulares de neurônios estriatais de projeção expressam a subunidade GluR2 (CHEN *et al.*, 1998). Este dado é, em nosso caso, particularmente verdadeiro em relação ao LStC, pois no LStL não chega a ultrapassar 20% do total de corpos celulares presentes nesta região no animal adulto.

GluR4, no entanto, mostrou-se pobre na neurópila estriatal. Como previamente demonstrado, esta subunidade colocaliza com parvalbumina e calretinina no LSt (KONDO *et al.*, 1997; CICCHETTI, *et al.*, 1999; BENNETT & BOLAM, 1994). Estes dados, em conjunto, sugerem a escassa prevalência desta subunidade em neurônios de projeção e sua presença em interneurônios que contém proteínas ligantes de cálcio. Esta característica se repete em diferentes espécies de mamíferos, répteis e aves (CHEN *et al.*, 1998; REINER *et al.*, 1998; REINER, 2002; LAVERGUETTA *et al.*, 2005). Assim, parece bastante natural que as projeções glutamatérgicas córtico-estriatais e tálamo-estriatais tenham como um de seus possíveis alvos dendritos ou espinhas dendríticas presentes em neurônios médio-espinhais através de receptores de glutamato tipo AMPA compostos por subunidades GluR1 e/ou GluR2/3.

Além dos receptores de glutamato do tipo AMPA, também estão presentes do estriado receptores tipo NMDA e cainato (REINER *et al.*, 1998; REINER, 2002). Estudos de “voltage-clamp” em célula inteira têm demonstrado que os receptores não-NMDA realmente funcionais presentes no soma e dendritos

proximais dos neurônios médio-espinhais são quase que exclusivamente do tipo AMPA, apesar da vasta presença de receptores tipo KA. (STEFANI *et al.*, 1998).

Interneurônios estriatais também recebem aferências glutamatérgicas. Neurônios PV+ são, no LSt, interneurônios que em geral são ricos em GluR1, além de apresentar GluR2 e possivelmente GluR3, em menor intensidade. Já os interneurônios imunorreativos ao anticorpo contra somatostatina (SS+) não expressam GluR1, GluR2 nem GluR4 sendo, portanto, pobres em receptores do tipo AMPA. A outra classe de interneurônios estriatais, os colinérgicos, parecem apresentar GluR1, GluR2 e GluR4 em baixos níveis. (CHEN *et al.*, 1996, LAVERGUETTA *et al.*, 2005).

No GP, experimentos imunohistoquímicos de dupla-marcação revelaram que os neurônios PV+, que neste núcleo são neurônios de projeção, são ricos em GluR1, GluR2, GluR2/3 e GluR4. Os neurônios colinérgicos do GP apresentam moderados níveis de GluR2 e possivelmente GluR1 e GluR4 (LAVERGUETTA *et al.*, 2005). Essas diferenças apresentadas na expressão de subunidades do receptor de glutamato do tipo AMPA nos tipos específicos de neurônios estriatais e palidais podem representar especificidades de resposta na informação sináptica que trafega por esse circuito.

ASPECTOS FUNCIONAIS DO RECEPTOR

Durante a maturação, GluR1 e GluR2/3 apresentam a disposição das curvas e valores de contagem celular bastante diferentes entre LSt e GP. GluR4 apesar de apresentar o desenho da curva semelhante e proporcional, é numericamente

diferente. Na fase adulta, apesar de GluR1 atingir valores semelhantes nas duas regiões (LSt e GP), GluR2/3 e GluR4 permanecem proporcionalmente diferentes.

A composição das subunidades presentes no canal formado pelo receptor ionotrópico de glutamato reflete particularidades funcionais (GÖTZ *et al.*, 1997; OZAWA *et al.*, 1998; STEFANI *et al.*, 1998). Receptores do tipo AMPA e NMDA têm diferentes propriedades do canal atribuídas aos resíduos de aminoácidos presentes em uma das alças transmembrânicas formadoras do canal, conhecida como M2. Nas subunidades que constituem o receptor do tipo AMPA, durante a edição do RNAm que constituirá a subunidade GluR2, um códon para glutamina é substituído por um códon para arginina. Esta troca exerce importante papel fisiológico, pois a arginina carregada positivamente oferece repulsão elétrica ao Ca^{2+} dificultando sua passagem (OZAWA, *et al.*, 1998). Estabelecer a composição das subunidades presentes no receptor de glutamato e, conseqüentemente considerações quanto à cinética do canal e fluxo iônico, pode ser fundamental no entendimento dos mecanismos funcionais e patológicos (CHEN, *et al.*, 1996; GÖTZ *et al.*, 1997; OZAWA *et al.*, 1998; STEFANI *et al.*, 1998). Assim, a composição tetramérica estabelece características distintas nos diferentes tipos neuronais do globo pálido e estriado, como, por exemplo, o fluxo de cálcio.

O íon cálcio atua muitas vezes como um segundo mensageiro, regulando diversas funções neuronais. Dentre elas, algumas estão ligadas ao processo maturacional, como crescimento do soma, neuritos e botões terminais; atuando de forma plástica na constituição celular (BLAUSTEIN, 1988). As funções mediadas pelo Ca^{2+} requerem concentrações citosólicas estáveis deste íon no repouso. Diversos mecanismos estão envolvidos nesta homeostase. As proteínas PV e CB

pertencem à família das proteínas ligantes de cálcio, um destes mecanismos de homeostase. Enquanto no GP, células com alta frequência de potenciais de ação são PV⁺, no estriado, células com estas características não expressam nenhuma das principais proteínas ligantes de cálcio (PV, CB ou CR) (GÖTZ *et al.*, 1997).

Neurônios médio-espinhais estriatais são na maioria ricos em GluR1 e GluR2/3, mas não GluR4, sendo, graças à presença da subunidade GluR2, provavelmente impermeáveis ao Ca²⁺ e de cinética lenta. Neurônios colinérgicos estriatais, no entanto, apresentam valores indetectáveis de GluR2/3 e alta expressão de GluR4, com cinética de alta velocidade. Neurônios do globo pálido são ricos em GluR1 e GluR4, portanto, altamente permeáveis ao Ca²⁺ (GÖTZ *et al.*, 1997). Em geral, neurônios que expressam receptores de glutamato do tipo AMPA permeáveis ao Ca²⁺ parecem estar presentes em diversas classes de neurônios que contém diferentes neurotransmissores (acetilcolina, GABA e glutamato). Neurônios médio-espinhais podem apresentar influxo de Ca²⁺ através receptores NMDA, mas não de AMPA; enquanto nos demais tipos neuronais estriatais pode ocorrer influxo de Ca²⁺ pelos dois tipos de subunidades (GÖTZ *et al.*, 1997).

A plasticidade sináptica e os mecanismos envolvidos na maturação parecem depender das propriedades do receptor de glutamato (COLWEL *et al.*, 1998; JAKOWEC *et al.*, 1998; SADIKOY *et al.*, 1998; TEPPER *et al.*, 1998; NANSEN *et al.*, 2000; RITTER *et al.*, 2001; LUK *et al.*, 2003, LUCK & SADIKOT, 2004). Em geral, receptores de glutamato do tipo NMDA são muito mais lentos que receptores tipo AMPA (GÖTZ *et al.*, 1997) e nossos dados sugerem que os receptores do tipo AMPA variam em composição ou expressão ao longo do desenvolvimento,

significando que mudanças transientes na condutividade iônica são necessárias para a formação ou consolidação dos circuitos palidais e estriatais.

VARIAÇÕES ETÁRIAS

Receptores de Glutamato

Diferentemente da tendência de decréscimo constante da concentração celular total, demonstrado através da técnica de Giemsa, o número de células imunorreativas aos anticorpos contra as subunidades que compõem os receptores de glutamato do tipo AMPA apresentaram, quantitativamente, variações etárias específicas. GP e LSt apresentam, em nossos dados, diferenças importantes na proporção de expressão das subunidades do receptor de glutamato tipo AMPA e da proteína ligante de cálcio PV durante o desenvolvimento pós-natal.

É possível que, assim como no desenvolvimento do sistema visual, receptores glutamatérgicos possam contribuir para o estabelecimento da conectividade sináptica, através do reforço de neuroconexões funcionais ou eliminando neurônios excedentes via processos controlados de neurotoxicidade (CLINE & CONSTANTINE-PATON, 1990; DEBSKI, *et al.*, 1990).

Receptores de glutamato podem ser importantes durante o processo de desenvolvimento de células nervosas tanto durante o período embrionário quanto pós-natal (JAKOWEC *et al.*, 1995, 1997; MENG, *et al.*, 1997; SHETH *et al.*, 1997; COLWELL, *et al.*, 1998; SADIKOT, *et al.*, 1998; NANSEN, *et al.*, 2000; RITTER *et al.*, 2001; BATISTA *et al.*, 2002; LUK & SADIKOT, 2004)

Nossos dados mostraram um crescimento no número de células que expressam as subunidades GluR1 e GluR2/3 no estriado ao longo do desenvolvimento. Em todas as subunidades estudadas no GP, assim como GluR4 no estriado, foi observada uma curva ascendente no início e descendente no final, cujo ápice e dispersão variaram conforme o núcleo ou região estudada.

JACKOWEC *et al.* (1998) também estudaram o desenvolvimento de receptores de glutamato tipo AMPA durante o desenvolvimento pós-natal de ratos, porém os resultados encontrados foram diferentes dos nossos. Seus dados mostram um decréscimo na expressão de RNAm de GluR1 e GluR2 no estriado durante os primeiros 28 dias de vida, sendo mais intensa entre P7 e P14 para GluR1 e entre P2 e P7 para GluR2. Segundo referências citadas por JACKOWEC *et al.* (1998), entre P7 e P14 ocorrem as fases de podamento sináptico e apoptose nos núcleos da base de ratos. Isto reforçaria a suposição que diferentes composições do receptor de glutamato poderiam disparar o processo de morte celular através de processos excitotóxicos ou promover o reforço de contatos sinápticos influenciando o estabelecimento do padrão adulto de conectividade (CLINE & CONSTANTINE-PATON, 1990; DEBSKI, *et al.*, 1990).

Neste mesmo estudo, JACKOWEC *et al.* (1998) mostraram que os RNAm de GluR3 e GluR4 estão presentes no estriado em menor quantidade, mas de maneira estável durante o desenvolvimento. Segundo o autor, o GP apresentou apenas leve expressão de GluR1, que tendeu a indetectável ao redor do dia P21. Interessantemente, os experimentos de imuno-histoquímica apresentados no mesmo trabalho, mas com menor ênfase, indicam que imunorreatividade ao anticorpo contra a subunidade GluR2/3 mostram padrão de expressão semelhante ao

apresentado para a subunidade GluR1, com presença em neurópila e corpos celulares. Estes resultados consideram o padrão geral de marcação e, apesar de terem sido feitas inferências com relação a quantidade de células, não foi realizado nenhum tipo de contagem celular. Um dado a ser ressaltado é que expressão de RNAm GluR3 no estriado é baixa e estável durante o desenvolvimento, portanto as possíveis variações encontradas para a proteína GluR2/3 são quase que exclusivamente relacionadas a subunidade GluR2.

A utilização de um anticorpo específico para a subunidade GluR2 e a utilização da técnica de hibridização *in situ* com sondas marcadas para a visualização do RNAm das subunidades do receptor de glutamato poderia melhor delinear inferências quanto as propriedades do canal e as variações das isoformas *fip* a *flop* durante o desenvolvimento de pombos.

JACKOWEC *et al.* (1998) também mostraram que tanto o RNAm quanto a proteína GluR4 expressa foram pouco evidentes no estriado e não expressas no GP em todas idades estudadas. Nossos dados, apesar de diferentes dos encontrados por este autor, concordam com de LAVERGUETTA *et al.*, (2005) que mostram a presença GluR4 no GP.

Outros autores mostram variações durante o desenvolvimento pós-natal do estriado COLWEL *et al.*, 1998; JAKOWEC *et al.*, 1998; SADIKOY *et al.*, 1998; SHET, *et al.*, 1998; TEPPER *et al.*, 1998; NANSEN *et al.*, 2000; RITTER *et al.*, 2001; LUK *et al.*, 2003, LUCK & SADIKOT, 2004). Neurônios médio-espinhais são morfológicamente imaturos durante os primeiros dias de vida em diversas espécies de mamíferos, com aumento progressivo da densidade de espinhas

dendríticas. Em ratos, somente durante a terceira semana de vida é que é formada a maioria dos contatos sinápticos (SHET, *et al.*, 1998).

Receptores de glutamato também parecem estar envolvidos em processos relacionados ao desenvolvimento e maturação neural (COLWEL *et al.*, 1998; JAKOWEC *et al.*, 1998; SADIKOY *et al.*, 1998; TEPPER *et al.*, 1998; NANSEN *et al.*, 2000; RITTER *et al.*, 2001; LUK *et al.*, 2003, LUCK & SADIKOT, 2004). A proliferação celular de neuroblastos telencefálicos é fortemente inibida por bloqueadores de receptores de glutamato. Culturas corticais foram sensíveis a bloqueadores de receptor do tipo AMPA/KA e culturas estriatais foram sensíveis a bloqueadores do tipo NMDA (LUCK & SADIKOT, 2004). SADIKOF *et al.*, (1998) mostraram que imediatamente após a fase proliferativa, a administração de antagonistas NMDA não surtiu efeito na quantidade de neurônios presentes, evidenciando um papel deste receptor no mecanismo de proliferação.

Durante o período pós-natal, alterações estruturais e funcionais ocorrem no estriado. SHETH *et al.* (1998) mostraram que, em ratos, a arborização terminal das projeções cortico-estriatais são se expandem entre P2 e P7. A maturidade eletrofisiológica de neurônios estriatais de roedores parece ser adquirida somente entre a segunda e quinta semana de vida pós-natal (TEPPER & TRENT, 1993).

Estudos eletrofisiológicos e ultraestruturais poderiam revelar peculiaridades funcionais do desenvolvimento estriatal e palidal de pombos, assim como similaridades ou diferenças entre aves e mamíferos.

O fato dos receptores de glutamato apresentar cinética e localização ultraestrutural diferentes poderia sugerir que participam de atividades específicas diversas durante o processo maturacional. A presença de GluR1 no globo pálido, parece não guardar nenhum tipo de relação direta com o número total de células, de forma que sua expressão está vinculada ou mediando algum processo que ocorre durante os três primeiros dias de vida. Ou talvez a sua ausência seja necessária para permitir ou inibir determinados processos ao redor do décimo dia de vida.

Diametralmente oposto ao GluR1 no GP é o comportamento da expressão de GluR2/3 no LStC, que parece ser proporcional, porém de forma inversa, ao número total de células. Este fato poderia guardar relação a algum tipo de proteção celular ao processo de morte neuronal.

Mais uma vez, os resultados apontam para a hipótese de que as variações da composição do receptor de glutamato podem refletir mudanças nas características funcionais e de permeabilidade. Por exemplo, enquanto GluR1 parece ser expresso no GP em momentos de expressão pico, GluR2/3 no LStC talvez possa parecer exercer um papel mais relacionado a estabilização das conexões sinápticas.

Proteínas ligantes de cálcio

Analisando nossos dados, as proteínas ligantes de cálcio mostraram comportamentos bastante específicos. A proteína ligante de cálcio PV apresenta, durante o desenvolvimento, curva de variação e valores de expressão diferentes quando comparamos LStC e LStL. Porém, na fase adulta, a quantidade de células PV+ é semelhante, lembrando que a marcação na neurópila é bastante diferente.

Calbindina, cujo padrão de marcação nos núcleos da base de pombos foi nulo durante a maturação inicial, não mostrou diferenças notáveis entre a duas regiões do estriado.

O íon cálcio participa de eventos críticos de neurônios maduros e imaturos (BLAUSTEIN, 1988; KHACHATURIAN, 1991; GARERI, *et al.*, 1995). Nos neurônios imaturos, o Ca^{2+} está envolvido em processos como proliferação celular, migração, crescimento axonal e diferenciação celular (BLAUSTEIN, 1988; KATER *et al.*, 1989; MATTSON, 1992; LIU & GRAYBIEL, 1992; CATSICAS *et al.*, 2001). A regulação dos níveis de cálcio são essenciais para o funcionamento do sistema nervoso, uma vez que aumento agudo ou crônico do nível citoplasmático deste íon pode levar a morte celular (BLAUSTEIN, 1988; KHACHATURIAN, 1991; GARERI, *et al.*, 1995). Ao que parece, a maturação das classes de interneurônios estriatais são reguladas diferencialmente durante o desenvolvimento (SCHLOSSER, e cols, 1999). Nossos resultados também sugerem isso mostrando características diferentes da expressão destas duas proteínas em relação a fase do crescimento.

CB apresentou expressão tardia nos núcleos da base, não sendo observada imunorreatividade até o 10º dia de vida. Esse fato não parece ser devido à algum artefato de técnica, visto que em outras áreas em que ela é precocemente expressa, como o hipocampo, a marcação pode ser observada. A proteína ligante de cálcio CB é preferencialmente detectada em neurônios médio-espinhais presentes na matrix estriatal de ratos (GABRIEL & RAGSDALE, 1983; GERFEN, 1985).

LETNIC & KOSTOVIC (1998) observaram que no encéfalo de humanos as proteínas ligantes de cálcio também sofrem variações durante o desenvolvimento pós-natal. CB foi altamente expressa no córtex visual neonatal e decaiu durante as semanas seguintes chegando a desaparecer em algumas camadas. PV, no entanto, apresenta um pico de expressão ao redor dos dois meses. As fases de intensa mudança encontradas pelos autores co-ocorrem temporal e espacialmente com o curso da sinaptogênese cortical. Mudanças semelhantes foram também encontradas no encéfalo de macacos, considerando-se as diferenças no tempo de duração da maturação de cada espécie.

Durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal do cerebelo de pintinhos, SECCHMAN *et al.*, (1994) utilizaram Northern blot e RNA slot blot para identificar tanto a proteína CB quanto seu RNAm. Seus dados mostraram uma expressão crescente do RNAm até o primeiro dia de vida, que perdurou relativamente estável até P7. A proteína CB também apresentou elevação em seus níveis durante a fase embrionária, mas foi entre E20 e P7 que sua curva de expressão teve a maior inflexão.

Em ratos, KORUBE *et al.*, (1992) também observaram expressão crescente da proteína CB durante as cinco primeiras semanas da vida pós-natal, sendo que, durante a primeira semana a expressão é muito baixa. Após algumas variações individuais para cada tecido, os níveis de expressão semelhantes ao adulto foram atingidos somente ao redor do 4º mês de vida.

No estriado, no entanto, ocorre uma redução na expressão de CB do nascimento até P15. Esta redução foi supostamente correlacionada com a migração

de células CB+ através do estriado em direção ao neocórtex de ratos (KORUBE *et al.*, 1992). REBLET *et al.* (2005) também relatam a presença de CB em prováveis neuroblastos migratórios.

Nossos dados mostram que a expressão da proteína CB apresenta um padrão tardio durante o desenvolvimento do encéfalo de pombos, sendo expressa apenas em poucos locais logo após nascimento.

Talvez a CB realmente exerça um papel neuroprotetor como sugerido por IACOPINO & CHRITAKOS (1990), agindo como sistema auxiliar de tamponamento do cálcio intracelular (BAIMBRIDGE & MILLER, 1982). Este fato parece ser verdade no estriado, uma vez que interneurônios ricos em parvalbumina ou neurônios de projeção ricos em calbindina são relativamente resistentes ao efeito excitotóxico mediado pelo Ca^{2+} na presença de um agonista NMDA seletivo (ácido quinolínico) (FIGUEREDO-CARDENAS, *et al.*, 1998).

O fato de sua expressão ser crescente durante o desenvolvimento poderia refletir uma forma de postergar a proteção celular, uma vez que durante a maturação inicial se faz necessária a morte neuronal parcial. De qualquer forma, a presença de CB não representa uma importante fonte de proteção celular contra excitotoxicidade, ao menos no estriado, onde sua expressão é consideravelmente baixa. No GP, no entanto, onde sua expressão chega a mais de 10% dos corpos celulares presentes na idade adulta, é possível que esta proteína possa exercer um papel mais expressivo.

PV no estriado, apesar de algumas pequenas diferenças entre as regiões central e lateral, foi expressa desde o nascimento de maneira crescente (exceto P0-P1 no LStL), mas atingindo no máximo cerca de 5%. Porém, no GP observamos uma queda regular no número absoluto de células durante os primeiros dez dias de vida, quando valores semelhantes ao adulto são atingidos. Experimentos utilizando microscopia eletrônica no encéfalo de ratos revelaram que cerca de dois terços dos neurônios presentes no GP são PV+, apresentando em geral corpo celulares maiores que os PV - (KITA, 1994). Em ratos, células PV+ apareceram no estriado apenas em P9, crescendo numericamente durante as semanas 2 e 3 (SCHLOSSER *et al.*, 1999), diferindo do que encontramos em pombos.

VI. CONCLUSÕES

Nossos dados indicam que a densidade dos neurônios estriatais e palidais diminui logo após o nascimento e essa redução apresenta diferenças temporais e espaciais.

No estriado, a intensidade da queda ocorreu prioritariamente durante os dez primeiros dias de vida, enquanto que no globo pálido, ocorreu principalmente entre P10 e a idade adulta.

Subunidades dos receptores de glutamato do tipo AMPA e parvalbumina estão presentes no estriado e globo pálido desde o início da vida pós-natal, porém são expressos em número diferente dos encontrados na fase adulta, apresentando flutuações temporais.

Neurônios estriatais e palidais de pombos somente expressam calbindina após o décimo dia pós-natal.

No conjunto, nossos dados sugerem que as variações no padrão de expressão observadas podem indicar diferenças funcionais em períodos distintos do desenvolvimento telencefálico, refletindo papéis específicos de cada subunidade no processo de maturação das regiões central e lateral do estriado lateral e do globo pálido de aves.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADINOLFI, A.M.. The Postnatal of the Caudate nucleus: a Golgi and Electron Microscopic Study of Kittens. **Brain Res.**, **133**: 251-266. 1977.
- ANDRESSEN, C.: BLUNCKE, I. & CELIO, M. R. Calcium-Binding Proteins: Selective Markers of Nerve Cells. **Cell Tissue Res.**, **271**: 181-208, 1993.
- ANDERSON, K.D.; REINER, A. Extensive Co-occurrence of Substance-P and Dynorphin in Striatal Projection Neurons: an Evolutionarily Conserved Feature of Basal Organization. **J. Comp. Neurol.**, **295**: 339-369. 1990a.
- ANDERSON, K.D.; REINER, A. Distribution and Relative Abundance of Neurons in the Pigeon Forebrain Containing Somatostatin, Neuropeptide Y, or Both. **J. Comp. Neurol.**, **299**: 261-282. 1990b.
- ANDERSON, K.D.; REINER, A. Striatonigral Projections Neurons: a Retrograde Labeling of the Percentages that Contain Substance P or Enkephalin in Pigeons. **J. Comp. Neurol.**, **303** (4): 658-73. 1991.
- BAIMBRIDGE, K. G.; CELIO, M. R. & ROGERS, J. H. Calcium-Binding Proteins in the Nervous System. **Trends Neurosci.**, **15**: 303-308, 1992.
- BATISTA, S. S.; PIRES, R. S.; BRITO, L. R. G. Differential expression of APMA-type glutamate receptors subunits during development of the chick optic tectum. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **35**: 973-978. 2002.
- BENNETT, B. D.; BOLAM, J. P. Synaptic Input and Output of Parvalbumin-Immunoreactive Neurons in the Neostriatum of the Rat. **Neuroscience** **62** (3): 707-719. 1994.

- BENZONANA, G.; WNUK, W.; COX, J. A. & GABBIANI, G. Cellular Distribution of Sarcoplasmic Calcium-Binding Proteins by Immunofluorescence. **Histochemistry**, **51**: 335-341, 1977.
- BERENDSE, H.W.; GROENEWEGEN, W.J.; LOHMAN, A.H. Compartmental Distribution of Ventral Striatal Neurons Projecting to the Mesencephalon in Rat. **J. Neurosci.** **12** (6): 2079-103. 1992.
- BLAUSTEIN, M. P. Calcium Transport and Buffering in Neurons. **TINS**, **11** (10): 438-443, 1988.
- BLAUSTEIN, M. P. & RASGADO-FLORES, H. The Control of Cytoplasmic Free Calcium in Presynaptic Nerve Terminals in: **Calcium and Phosphate Transport across Biomembranes**. Eds. F. Bronner and M. Peterlik. Academic Press, New York. 1981.
- BORGES, K.; DINGLEDINE, R. AMPA Receptors: Molecular and Functional Diversity. *in*: The Glutamate Synapse as a Therapeutic Target: Molecular Organization and Pathology of the Glutamate Synapse. **Progress in Brain Research**, vol **116**: 153-170. Elsevier, Amsterdam. 1998.
- BRITTO, L.R.G.; GOBEEERSZTEJN, F.; KARTEN, H.; COX, K. Depleção and Recovery of the Calcium – Binding Proteins Calbindin and Parvalbumin in the Pigeon Optic Tectum Following Retinal Lesions. **Brain Res.**, **661**: 289-292. 1994.
- BUTLER, A.B.; HODOS, W. **Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation**. Wileys-Lis, Inc, New York. 1996.

- CATSICAS, M.; ALLCORN, S.; MOBBIS, P. early activation of Ca²⁺ - permeable AMPA receptors reduces neurite outgrowth in embryonic chick retinal neurons. **J. Neurobiol.** **49** (3): 200-11. 2001
- CELIO, M. R. Calcium Binding Proteins in the Brain. **Arch. Ital. Anat. Embryol.**, **94**: 227-236, 1989.
- CELIO, M. R. & HEIZMANN, C. W. Calcium Binding Protein Parvalbumin as a Neuronal Marker. **Nature**, **293**: 300-302, 1981.
- CHEN, Q.; VEENMAN, L.; KNOPP, K.; YAN, Z.; MEDINA, L.; SONG, W.-J.; SURMEIER, D.J.; REINER, A. Evidence for the Preferential Localization of Glutamate Receptor-1 Subunits of AMPA Receptors to the Dendritic Spines of Medium Spiny Neurons in Rat Striatum. **Neuroscience**, **83** (3): 749-761. 1998.
- CHEN, Q. REINER, A. Cellular Distribution of the NMDA Receptor NR2A/2B Subunits in the Rat Striatum. **Brain Res.**, **743**: 715-731. 1996.
- CICHETTI, F.; VINET, J.; BEACH, T.G.; PARENT, A. Differential Expression of α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionate Neurons in the Human Striatum. **Neuroscience**, **93** (1): 89-97. 1999.
- CLINE, H. T.; CONSTANTINE-PATON, M. NMDA Receptor Agonist and Antagonist alter retinal Ganglion Cell arbor Structure in the Developing frog retinotectal projection. **J. Neurosci.** **10** (4): 1197-216. 1990.
- COLWELL, C.S.; CEPEDA, C.; CRAWFORD, C. LEVINE, M.S. Postnatal Development of Glutamate Receptor-Mediated Responses in the Neostriatum. **Dev. Neurosci.**, **20** (2-3): 154-163. 1998.

- DEBSKI, E. A.; CLINE, H. T.; CONSTANTINE-PATON, M. Activity-Dependent Tuning and the NMDA Receptor. **J. Neurosci.** **21** (1): 18-32.
- DiFIGLIA, M.; PASIK, P.; PASIK, T. Early Postnatal Development of the Monkey Neostriatum: a Golgi and Ultrastructural study. **J. Comp. Neurol.**, **190**: 303-331. 1980.
- ECKERT, A.; HARTMANN, H.; FÖRSTL, H., MÜLLER, W. E. Alterations of Intracellular Calcium Regulation During Aging and Alzheimer's Disease in Noneuronal Cells. **Life Sciences**, **55** (25-26): 2019-2029. 1994
- ERRO, E.; GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. El Núcleo Tegmental Pedunculo pontino. Anatomía, Consideraciones Funcionales e Implicaciones fisiopatológicas. **An. Sist. Sanit Navar.**, **22** (2): 189-201. 1999.
- ERRO, E.; LANCIEGO, J.L.; GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. Relationships Between Thalamostriatal Neurons and pedunculo pontine Projections to the Thalamus: a Neuroanatomical Tract-Tracing Study in the Rat. **Exp. Brain Res.**, **127** (2): 162-70. 1999
- FALLON, J. H.; MOORE, R.Y. Catecholamine Innervation of the Basal Forebrain IV. Topography of the Dopamine Projection to the Basal Forebrain and neostriatum. **J. Comp. Neurol.**, **180** (3): 545-80. 1978.
- GARERI, P.; MATTACE, R.; NAVA, F.; SARRO, G. Role of Calcium in Brain Aging. **Gen. Pharmac.** **26** (8): 1651-1657. 1995.
- GHEZ, C. The Control of Movement. In: KANDEL, E. J.; SCHARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**. Third Ed. 1991.

- GOODMAN, M.; PECHÈRE, J.-F.; HAIECH, J & DEMAILE, J. G. Evolutionary Diversification of Structure and Function in the Family of Intracellular Calcium-Binding Proteins. **J. Molec. Evol.**, **13**: 331-352. 1979.
- GÖTZ, T.; KRAUSHAAR, U.; GEIGER, J.; LÜBKE, J.; BERGER, T.; JONAS, P. Functional Properties of AMPA and NMDA Receptor Expressed in Identified Types of Basal Ganglia Neurons. **J. Neurosci.**, **17** (1): 204-215. 2005.
- HEIZMANN, C. W. Parvalbumin, an Intracellular Calcium-Binding Protein; Distribution, Properties and Possible Roles in Mammalian Cells. **Experientia**, **40**, 910-921. 1984.
- HEIZMANN, C. W. & KÄGI, U. Structure and Function of Parvalbumin. In: **Calcium Protein Signaling**. Ed. H. Hidaka. Plenum Press, New York. 1989.
- HOLLMANN, H.; HARTLEY, M.; HEINEMANN, S. Ca²⁺ Permeability of KA-AMPA-gated Glutamate Receptor Channel Depends on Subunit Composition. **Science**, **252**: 851-853. 1991.
- IACOPINO, A. M. & CHRISTAKOS, S. Specific Reduction of Calcium-Binding Protein (28-kilodalton Calbindin-D) Gene Expression in Aging and Neurodegenerative Diseases. **Proc. Nat Acad. Sci.**, **87**, 4078-4082, 1990.
- JACOWEK, M. W., FOX, A. J.; MARTIN, L. J.; KALB, R. G. Quantitative and Qualitative Changes in AMPA Receptor Expression During Spinal Cord Development. **Neuroscience** **67** (4): 893-907. 1995.

- JAKOWEC, M. W. JACKSON-LEWIS, V.; CHEN, X.; LANSTON, J. W.; PRZEDBORDKI, S. The Postnatal Developmental of AMPA Receptors Subunits in the Basal Ganglia of the Rat. **Dev. Neurosci.** **20**: 19-33. 1998.
- JAKOWEC, M.W.; JACKSON-LEWIS, V.; CHEN,X.; LANGSTON, J. W.; PRZEDBORSKI, S. The Postnatal Development of AMPA Receptor Subunits in the Basal Ganglia of the Rat. **Dev. Neurosci.**, **20**: 19-33. 1998.
- JARVIS, E.D.; GUNTURKUN, O.; BRUCE, L.; CSILLAG, A.; KARTEN, H.; KUENZEL, W.; MEDINA, L.; PAXIONS, G.; PERKEL, D.J.; SHIMIZU, T.; STRIEDTER, G.; WILD, J.M.; BALL, G.F.; DUGAS-FORD, J. DURAND, S.E; HOUGH, G.E.; HUSBAND, S.; KUBIKOYA, L.; LEE,D.W.; MELLO,C.V.; POWERS,A.; SIANG, C.; SMULDERS, T.V.; WADA, K. WHITE, S.A.; YAMAMOTO, K.; YU,J.; REINER, A.; BUTLER, A.B.; AVIAN BRAIN NOMENCLATURE CONSORTIUM. Avian Brains and a New Understanding of vertebrate brain evolution. **Nat. Rev. Neurosci.**, **6**: 151-9. 2005.
- JIAO, Y; MEDINA, L; VEENMAN, C.L.; TOLEDO, C.; PUELLES, L. REINER, A. Identification of the Anterior Nucleus of the Ansa Lenticularis in Birds as the Homolog of the Mammalian Subthalamic Nucleus. **J. Neurosci.**, **20** (18): 6998-7010. 2000.
- KELLY, P. T. Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. Multifunctional Roles in Neuronal Differentiation and Synaptic Plasticity. **Molec. Neurobiol.**, **5**, 153-177, 1991.

- KARTEN, H.; DUBBELDAN, J. The Organization and Projections of Paleostriatal Complex in the Pigeon (*Columba livia*). **J. Comp. Neurol.**, **148**: 61-90. 1973.
- KHACHATURIAN, Z. S. Calcium and the Aging Brain: Upsetting a Delicate Balance? **Geriatrics**, **11** (46): 78-83, 1981.
- KINGSLEY, R. E. Sistemas Motores III: Os gânglios da Base. *In: Manual de Neurociência*. Editora Guanabara Koogan S.A. 2001.
- KISHIMOTO, J.; TSUCHIYA, T.; COX, H.; EMSON, P.C.; NAKAYAMA, Y. Age-Related Changes of Calbindin-D28k, Calretinin and Parvalbumin mRNAs in the Hamster. **Brain.Neurobiol. Aging**, **19** (1): 77-82.
- KITT, C.A.; BRAUTH, S.E. A Paleostriatal-Thalamic-Telencephalic Path in Pigeons. **Neuroscience**, **7** (11): 2735-2751. 1982.
- KONDO, M. SUMINO, R. OKADO, H.; Combinations of AMPA Receptor Subunit Expression in Individual Cortical Neurons Correlate with Expression of Specific Calcium-Binding Proteins. **J. Neurosci.** **17** (5): 1570-1581. 1997.
- KUMAR, S.S.; BACCI, A.; KHARAZIA, V.; HUGUENARD, J. R. A Developmental Switch of AMPA Receptor Subunits in Neocortical Pyramidal Neurons. **J. Neurosci.**, **22** (8): 3005-3015. 2002.
- KUROBE, N.; INAGUMA, Y.; SHINOHARA, H.; SEMBA, R.; INAGAKI, T.; KATO, K. Developmental and Age-Dependent Changes of 28-kDa Calbindin-D in the Central Nervous Tissue Determined with a Sensitive Immunoassay Method. **Journal of Neurochemistry**, **58**(1): 128-134. 1992.

- KVAMME, E. Synthesis of Glutamate and its regulation *in*: The Glutamate Synapse as a Therapeutical Target: Molecular Organization and Pathology of the Glutamate Synapse. **Progress in Brain Research**, **116**, 73-85. Elsevier, Amisterdã. 1998.
- KWOK, K. H. H.; TSE, Y. C.; WONG, R. N. S.; TUNG, K. K. L. Cellular Localization of GluR1, GluR2/3 and GluR4 Glutamate Receptor Subunits in Neurons of the Rat Neostriatum. **Brain Reseach** **778**: 43-55. 1997.
- LANCELOT, E. BEAL, M. F. Glutamate Toxicit in Chonic Neurodegenerative Disease. *in*: The Glutamate Synapse as a Therapeutical Target: Molecular Organization and Pathology of the Glutamate Synapse. **Progress in Brain Research**, vol **116**, 331-347. Elsevier, Amisterdã. 1998.
- LAVERGHETTA, A.V.; TOLEDO, C.; VEENMAN, C.L.; YAMAMOTO, K; WANG, H.; REINER, A. Cellular Localization of AMPA Type Glutamate Receptors Subunits in Basal Ganglia of Pigeons (*Columba livia*). Submitted to **Brain Behav. Evol.**
- LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociências**, Atheneu, 2001.
- LEVINE, M.S.; FISHER, R.S.; HULL, C.D.; CUCHWALD. N.A. Postnatal Devolopment of Identified Medium-Size Caudate Spiny Neurons in the Cat. **Dev. Brain Res.**, **24**: 47-62. 1986.
- LETNIC, K.; KOSTOVIC, I. Postnatal Development of Calcium-Binding Proteins Calbindin and Parvalbumin in Human Visual Cortex. **Cerebral Cortex**, **8**: 660-669. 1998.

- LOPEZ-ROMAN, A. & ARMENGOL, J. A. Naturally occurring neuronal death during the development of inferior olive in the chick. **Neurosci Res.** **26** (2): 171-9. 1996.
- LUK, K. C.; SADIKOT, A. F. Glutamate and Regulation of Proliferation in the Developing Mammalian Telencephalon. **Dev. Neurosci.** **26**: 218-228. 2004
- LUK, K. C.; KENNEDY, T. E.; SADIKOT, A. F. Glutamate Promotes Proliferation of Striatal Neuroal Progenitors by an NMDA Receptor-Mediated Mechanism. **J. Neurosci.** **23** (6): 2239-2250.
- MATTSON, M. P. Calcium as sculptor and destroyer of neural circuitry. **Exp gerontol.** **27** (1): 29-49. 1992.
- McBURNEY, R. N. & NEERING, I. R. Neuronal Calcium Homeostasis. **Trends Neurosci.**, **10**, 164-169, 1987.
- McDONALD J.W. SILVERSTEIN, F.S., JOHNSTON, M.V. Neurotoxicity of N-Methyl-D-Aspartate is Markedly Enhanced in Developing Rat Central Nervous System. **Brain Res.**, **459** (1):200-3. 1988.
- McDONALD J.W. TRESCHER, W.H., JOHNSTON, M.V. The Selective Ionotropic-Type Quisqualate Receptor Agonist AMPA is a Potent Neurotoxin in Immature Rat Brain. **Brain Res.**, **526** (1): 165-8. 1990.
- McDONALD J.W. TRESCHER, W.H., JOHNSTON, M.V. Susceptibility of Brain to AMPA Induced Excitotoxicity Transiently Peaks During Early Postnatal Development. **Brain Res.**, **583** (1-2): 54-70. 1992.
- McGEORGE, A.J.; FALL, R.L.M. The Organization of the Projection from the Cerebral Cortex to the Striatum in the Rat. **Neuroscience**, **29**: 503-537. 1989.

- MEDINA, L.; REINER, A. Neurotransmitter Organization and Conectivity of the Basal Ganglia in Vertebrates: Implications for the Evolution of Basal Ganglia. **Brain Behav. Evol.** **46**: 235-258. 1995.
- MEDINA, L.; REINER, A. The Efferent Projectinos of the Dorsal and Ventral Pallidal Parts of the Pigeon Basal Ganglia, Studied With Biotiylated Dextran Amine. **Neuroscience**, **81** (3): 773-802, 1997.
- MENG. S. Z.; OBONAI, T.; ISUMI, H.; TAKASHIMA, S. A Developmental Expression Expression of AMPA-Seletive Glutamate Receptor Subunits in Human Basal Ganglia. **Brain Dev.** **19** (6): 388-92. 1997.
- NANSEN, E. A.; JOKEL, E. S.; LOBO,M. K.; MICEVYCH, P. E.; ARIANO, M. A.; LEVINE, M. S.; Striatal Ionotropic Glutamate Receptor Ontogeny in the Rat. **Dev.Neurosci.** **22**: 329-340. 2000.
- NICHOLLS, D. G. **Proteins, Transmitters and Synapses**. Blackwell, Oxford. 1994.
- ONISHI, B. K. A. Coloração de Nissil por Violeta Crescila. *In*: XAVIER, G. F. (org). **Técnicas para o Estudo do Sistema Nervoso**. Ed. Plêiade. São Paulo. 1999.
- OTTIGER, HANS-PETER, GERFIN-MSER, A.; PRINCIPE, F. D.; DUTLY, F; STREIT, P. Molecular Cloning and Differential Expression Patterns of Avian Glutamate Receptors mRNAs. **J Neurochem.**, **64** (6): 2413-2426, 1995.
- PAPERNA, T.; LAMED, Y.; TEICHBERG, V. I. CDNA Cloning of Chick Brain α -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazolepropionic Acid Receptors Reveals

- Conservation of Structure, Function and Post-Transcriptional Process With Mammalian Receptors. **Mol. Brain Res**, **36**: 101-113. 1996.
- PERSECHINI, A.; MONCRIEF, N. D. & KRETSINGER, R. H. The EF-Hand Family of Calcium Modulated Proteins. **Tins**, **12**: 462-467, 1989.
- PIRES, R.S.; REBOUÇAS, N.A.; DUCOISIN, R.M.; BRITTO, L.R.G. Retinal Lesions Induce Differential Changes in the Expression of *flip* and *flop* Isoforms of the Glutamate Receptor Subunit GluR1 in the Chick Optic Tectum. **Molecular Brain Research**, **76**: 341-346. 2000.
- PIRES, R.S.; FERRO, E.S.; BRITTO, L.R.G. Expression of the APMA-type Glutamate Receptors Subunits in the Chick Optic Tectum Changes Biphaseically Afterretinal Deafferentation. **Brain Reserch**, **810**: 283-287. 1998.
- PLENZ, D.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; KITAY, S.T. Morfological Organization of the Globus Pallidus-Subthalamic Nucleus System Studied in Organotypic Cultures. **J. Comp. Neurol.**, **397**: 437-457. 1998.
- PUELLES, L. KUWANA, E.; PUELLES, E.; BULFONE, A.; SHIMAMURA, K.; KELEHER, J.; SMIGA, S.; RUBENSTEIN, J.L. Pallial and Subpallial Derivates in the Embryonic Chick and Mouse Telencephalon, Traced by the Expression of the Genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. **J. Comp. Neurol.**, **424** (2): 409-38. 2000.
- PUELLES, L. KUWANA, E.; PUELLES, E.; RUBENSTEIN, J.L. Comparison of Mammalian and Telencephalon from the Perspective of Gene Expression Data. **Eur. J. Morphol.** **37** (2-3): 139-50.
- PURVES, D. et al. **Neurociências**, 2ª ed, Artmed. Porto Alegre, 2005.

- RASMUSSEN, H. Calcium and c-AMP in Stimulus-Response Coupling. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **356**, 346-352, 1980.
- RAVIND RANATHAN, A.; PARKS, T.; RAO, M. S. *Flip* and *Flop* Isoforms of Chich Brain AMPA Receptor Subunits: Cloning and ANalys of Expression Patterns. **NeuroReport** **7** (15-17): 2707-2711, 1996.
- REBELT,C.; ALEJO, A.; FUENTES, T.; PRO-SISTIAGA, P.; MENDIZABAL-ZUBIAGA,J.; BUENO-LOPEZ, J.L. Expression of calcium-binding proteins in the proliferative zones around the corticostriatal junction of rabbits during pre and postnatal development. **Brain Res Bull.** **66** (4-6): 461-4. 2005.
- REINER, A. Funcional Circuitry of the Avian Basal Ganglia: Implications for Basal Ganglia Organization in Stem Amniotes. **Brain Res. Bull.**, **57**: 513-28. 2002.
- REINER, A; ANDERSON, K.D. Co-Ocorence of Gamma-Amiobutyric Acid, Parvalbumin and the Neurotensin-Related Neuropeptide LANT6 in Pallial, Nigral and Striatal Neurons in Pigeons and Monkeys. **Brain Res.** **624** (1-2): 317-25. 1993.
- REINER, A.; MEDINA, L.; VEENMAN, C.L. Structural and Funcional Evolution of the Basal Ganglia in Vertebrates. **Brain Reseach Reviews**, **28**: 235-285. 1998.
- REINER, A.; BRECHA, N.; KARTEN, H. Basal Ganglia Pathways to the Tectum: The Aferent and Eferent Conections of the Lateral Spiriform Nucleus of Pigeon. **J. Comp. Neurol.**, **208**: 16-36. 1982a.

- REINER, A.; KARTEN, H.; BRECHA, N. Enkephalin-Mediated Basal Ganglia Influences Over the optic Tectum: Immunohistochemistry of the Tectum and the Lateral Spinal Nucleus in Pigeon. **J. Comp. Neurol.**, **208**: 37-53. 1982b.
- REINER, A.; PERKEL, D.J.; BRUCE, L.; BUTLER, A.B.; CSILLAG, A.; KUENZEL, W.; MEDINA, L.; PAXSONS, G.; SHIMIZU, T.; STRIEDTER, G.; WILD, J.M.; BALL, G.F.; DURAND, S.E.; GUNTURKUN, O.; LEE, D.W.; MELLO, C.V.; POWERS, A.; WHITE, S.A.; HOUGH, G.E.; KUBIKOYA, L.; SMULDERS, T.V.; WADA, K.; DUGAS-FORD, J.; HUSBAND, S.; YAMAMOTO, K.; YU, J.; SIANG, C.; KARTEN, H.; JARVIS, E.D. Revised Nomenclature for Avian Telencephalon and Some Related Brainstem Nuclei. **J. Comp. Neurol.**, **473**: 377-414. 2004.
- RENG, D.; HACK, I.; MÜLLER, M.; SMOLDERS, J.W.T. AMPA-type Glutamate Receptor Subunits Are Expressed in the Avian Cochlear Hair Cells and Ganglion Cells. **NeuroReport** **10** (10-13): 2137-2141. 1999.
- RITTER, L. M.; UNIS, A. S.; MEADOR-WOODRUFF, J. H.; Ontogeny of Ionotropic Glutamate Receptor Expression in Human Fetal. **Dev. Brain Res.** **127**: 123-133. 2001.
- RUBENSTEIN, J.; RUBENSTEIN, L.R.; MARINEZ, S.; SHIMAMURA, K.; PUELLES, L.; The Embryonic Vertebrate Forebrain: the Prosomeric Model. **Science**, **266**: 578-580.
- SADIKOT, A. F.; BURHAN, A. M.; BELANGER, M.C.; SASSEVILLE, R. NMDA Receptor Antagonists Influence Early Development of GABAergic

- Interneurons in the Mammalian Striatum. **Brain Res. Dev. Brain Res.** **105** (1): 35-42. 1998.
- SANTANA, R.F.; REINER, A.; BRITTO, L.R.G. TOLEDO, C.A. Differential Effects of Aging on the Distribution of Calcium-Binding Proteins in a Pretectal Nucleus of the Chicken Brain. **J Chem Neuroanat.**, **26** (3):195-208. 2003.
- SHETH, A., N.; MCKEE, M. L.; BHIDE, P. G. The sSequence of Formation and Development of Corticostriate Connections in Mice. **Dev. Neurosci.** **20**: 98-112. 1998.
- SCHLOSSER, B.; KLAUSA, G.; PRIME, G.; TEN BRUGGENCATE, G. Postnatal Development of Calretinin- and Parvalbumin-Positive Interneurons in the Rat Neostriatum: an Immunohistochemical Study. **J. Comp. Neurol.** **405** (2): 185-98. 1999.
- SHAPE, N.A., TEPPER, JM..Postnatal Development of Excitatory Synaptic Input to the Rat Neostriatum: an Electron Microscopic Study. **Neuroscience.**, **84** (4):1163-75. 1998.
- SMEETS, W.J. Comparative Aspects of the Distribution of Substance P and Dopamine Immunoreactivity in the Substantia Nigra of Amniotes. **Brain Behav Evol.**, **37** (3): 179-88. 1991.
- STEFANI, A.; CHEN, Q.; FLORES-HERNADES, J.; JIAO, Y. REINER,A.; SURMEIER, D.J. Physiological and Molecular Properties of AMPA/Kainate Receptors Expressed by Striatal Medium Spiny Neurons. **Dev. Neurosci.** **20** (2-3): 242-252. 1998.

- TAKUMI, Y.; BERGERSEN, L.; LANDSEND, A. S.; RINVIK, E.; OTTERSEN, O. Synaptic Arrangement of Glutamate Receptors. *in: The Glutamate Synapse as a Therapeutical Target: Molecular Organization and Pathology of the Glutamate Synapse. **Progress in Brain Research**, vol 116, 105-121. Elsevier, Amsterdam. 1998.*
- TANAKA D Jr. Development of Spiny and Aspiny Neurons in the Caudate Nucleus of the Dog During the First Postnatal Month. **J Comp Neurol.**, **192** (2):247-63. 1980.
- TEPPER, J.M.; SHARPE, N.A.; KOÓS, T.Z.; TRRENT; F. Postnatal Development of the Rat Neostriatum: Electrophysiological, Light- and Electron-Microscopic Studies. **Dev. Neurosci.** **20**: 125-145. 1998.
- TESTA, C.M.; STANDAERT, D.G.; YOUNG, A.B.; PENNEY Jr., J.B. Metabotropic Glutamate Receptor mRNA Expression in the Basal Ganglia of the Rat. **J. Neurosci.**, **14** (5): 3005-3018. 1994.
- TOLEDO, C. A. B.; CANTERAS. N. S. & BRITO, L. R. G. Calcium – Binding Proteins in the Chick Accessory Optic Nucleus. **Society for Neuroscience Abstracts**, **21**: 653, 1995.
- ULFIG, N. Calcium- Binding Proteins in the Human Development Brain. **Adv. Anat. Embryol. Cell**, **165**: III-IV,1-92. 2002.
- VEENMAN, C.L.; CHEN, Q.; REINER, A. Glutamate Receptor (GluR) subunit localization in pigeon Telencephalon. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **20**: 996. 1994.
- VEENMAN, C.L.; REINER, A. The distribution of GABA-containing perikarya, fibres, and terminal in the forebrain and midbrain of Pigeons, with particula

reference to basal ganglia and its projection targets. **J. Comp. Neurol.**, **399**: 209-250. 1994.

VEENMAN, C.L.; WILD, M; REINER, A. Organization of the Avian “Corticostriatal” Projection System: A Retrograde and Anterograde Pathway Tracing Study in Pigeons. **J. Comp. Neurol.** **354**: 87-126. 1995.

WENTHOLD, R.; ROCHE, K. The Organization and Regulation of Non- NMDA Receptors in Neurons. *in*: The Glutamate Synapse as a Therapeutic Target: Molecular Organization and Pathology of the Glutamate Synapse. **Progress in Brain Research**, vol **116**, 133-152. Elsevier, Amsterdam. 1998.

WILD, J.M. Thalamic Projections of the Paleostriatum and Neostriatum in Pigeons (*Columba livia*). **Neuroscience**, **20**: 305-327.1987.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 759-2, sobre "DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO NO SISTEMA NERVOSO DE VERTEBRADOS" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo / Renato Figueiredo de Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 752-9 entitled "IONOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR DISTRIBUTION IN THE VERTEBRATE NERVOUS SYSTEM", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 17, 2005.

Campinas, 17 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP