



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ESTUDO DAS PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA VISUAL

Aluna: Camila Salum de Oliveira

Orientador: Dr. Rodrigo Bainy Leal

Co-orientador: Dr. Francesco Mattia Rossi

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ESTUDO DAS PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA VISUAL

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito parcial para obtenção do título
de **Mestre em Neurociências**

Aluna: Camila Salum de Oliveira

Orientador: Dr. Rodrigo Bainy Leal

Co-orientador: Dr. Francesco Mattia Rossi

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2008

“ESTUDO DAS PROTEÍNAS CINASES ATIVIDADES POR MITÓGENOS NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA VISUAL”.

CAMILA SALUM DE OLIVEIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

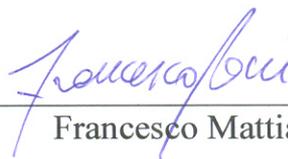
na área de Neurobiologia Celular e Molecular Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientador



Rodrigo Bainy Leal

Co-Orientador



Francesco Mattia Rossi

Coordenador do Curso



Adair Roberto Soares dos Santos

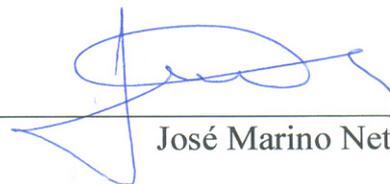
Banca Examinadora



Rodrigo Bainy Leal (Presidente)



Carlos Alberto Saraiva Gonçalves



José Marino Neto

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus orientadores, por serem os maiores responsáveis por essa conquista.

Ao Professor Rodrigo, pela amizade, orientação, incentivo e grande ajuda desde a iniciação científica.

Ao Francesco, por aceitar o desafio de me orientar, por todos os ensinamentos, científicos ou não, pela amizade e paciência em todas as etapas do trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação em Neurociências, pelos ensinamentos, por toda a ajuda, pelas importantes dicas no decorrer do curso, pelo empréstimo de materiais e pela disponibilidade constante.

Aos colegas, pelas risadas nos intervalos da aula, ou pelos cafezinhos e conversas pelos corredores, afinal, a vida necessita de pausas.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-graduação em Neurociências, pela sua dedicação, sempre resolvendo nossos problemas.

Aos colegas do laboratório, que logo se tornaram grandes amigos, e fizeram os dias passarem da forma mais agradável possível.

Ana Rigon, minha companheira desde a preparação para a prova de mestrado, por fazer tudo se tornar mais fácil.

Thaís e Jefferson, pelas muitas risadas, músicas e festas. Por serem sempre tão presentes, mesmo quando ausentes.

Aninha, a IC dedicada e grande amiga. Obrigada pela amizade, e pela leitura final da dissertação.

Dai, Ilza e Carol, pela amizade, companhia e por toda a ajuda no laboratório.

Aos meus amigos “leigos”, por não entenderem nada do que eu faço, e mesmo assim me ouvirem com toda paciência do mundo. E por serem sempre minha válvula de escape.

De modo muito especial, à minha família, principalmente meus pais, pelo incentivo, suporte e compreensão em todos os momentos da minha vida.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. O SISTEMA VISUAL.....	11
1.2. DESENVOLVIMENTO E PLASTICIDADE DO SISTEMA VISUAL	14
1.3. PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS	19
1.4. PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO ELEMENTO RESPONSIVO AO AMPc (CREB).....	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. ANIMAIS	27
4.2. MATERIAIS.....	27
4.3. WESTERN BLOTTING	28
4.3.1. <i>Extração de Proteínas</i>	28
4.3.2. <i>Dosagem de Proteínas</i>	29
4.3.3. <i>Separação de proteínas</i>	29
4.3.4. <i>Eletrotransferência</i>	30
4.3.5. <i>Imunodeteção</i>	31
4.3.6. <i>Quantificação</i>	33
4.4. IMUNOISTOQUÍMICA	34
4.5. TRAÇADO NEURONAL.....	36
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5. RESULTADOS	38

5.1.	CARACTERIZAÇÃO DA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE ERK1/2 E P38 ^{MAPK} NO SISTEMA VISUAL (CÓRTEX VISUAL, COLÍCULO SUPERIOR, E RETINA) DURANTE O DESENVOLVIMENTO POR WESTERN BLOT.....	38
5.1.1.	<i>Retina</i>	39
5.1.2.	<i>Colículo Superior</i>	41
5.1.3.	<i>Córtex Visual</i>	43
5.2.	CARACTERIZAÇÃO DA MODULAÇÃO DE CREB E FOSFO-CREB NO COLÍCULO SUPERIOR DURANTE O DESENVOLVIMENTO, POR WESTERN BLOT.....	45
5.3.	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA PARA CARACTERIZAR A LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS MAPKS E DE CREB EM DIFERENTES REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.	48
5.3.1.	<i>Detecção de fosfo-ERK1/2 por imunistoquímica</i>	48
5.3.2.	<i>Detecção de fosfo-p38^{MAPK} por imunistoquímica</i>	52
5.3.3.	<i>Detecção de CREB e fosfo-CREB por imunistoquímica</i>	54
5.4.	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE TRAÇADO NEURONAL PARA O ESTUDO DA PLASTICIDADE DAS PROJEÇÕES RETINO-TALÂMICAS E RETINO-COLICULARES.	58
6.	DISCUSSÃO	60
7.	CONCLUSÕES	71
8.	PERSPECTIVAS	72
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das vias visuais centrais.	12
Figura 2 – As projeções provenientes de cada olho ocupam territórios específicos em cada um dos alvos das vias visuais.	14
Figura 3 – A segregação das fibras provenientes de cada olho no córtex visual ocorre em um período específico do desenvolvimento.	16
Figura 4 – Modificação das colunas de dominância ocular após deprivação monocular.	17
Figura 5 – Cascatas de Sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs)	20
Figura 6 – Eletrotransferência.	31
Figura 7 – Esquema representativo da imunodeteção por quimioluminescência.	33
Figura 8 – Esquema representativo do método de imunistoquímica.	35
Figura 9 – Modulação da atividade de p38 ^{MAPK} e ERK1/2 na retina de rato durante o desenvolvimento.	40
Figura 10 – Modulação da atividade de p38 ^{MAPK} e ERK1/2 no colículo superior de rato durante o desenvolvimento.	42
Figura 11 – Modulação da atividade de p38 ^{MAPK} e ERK1/2 no córtex visual de rato durante o desenvolvimento.	44
Figura 12 – Modulação de CREB e fosfo-CREB no colículo superior de rato durante o desenvolvimento.	47

Figura 13 – Detecção de fosfo-ERK no córtex e hipocampo de rato por imunoistoquímica.....	49
Figura 14 – Análise de fosfo-ERK na retina de rato por imunoistoquímica.....	51
Figura 15 – Detecção de fosfo-p38 ^{MAPK} no cérebro de rato por imunoistoquímica.....	53
Figura 16 – Detecção de fosfo-CREB e CREB no cérebro de rato por imunoistoquímica.....	55
Figura 17 – Detecção de CREB no colículo superior de rato por imunoistoquímica.....	57
Figura 18 – Marcação por HRP das projeções retino-coliculares e retino-talâmicas.....	59
Figura 19 – A ativação de ERK1/2 e p38 ^{MAPK} é dinamicamente regulada no desenvolvimento do sistema visual de rato.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC - Complexo avidina-biotina-peroxidase
- AMPC – Monofosfato de adenosina cíclico
- BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BSA – Albumina Sérica Bovina
- CGR – Células Ganglionares da Retina
- CRE - Elemento Responsivo ao AMPC
- CREB - Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo ao AMPC
- CV1 – Córtex Visual Primário
- DAB - Diaminobenzidina
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EDTA – Ácido etileno-dinitro-tetra-acético
- ERK - Cinase regulada por sinal extracelular
- HRP – Peroxidase de Rabanete Silvestre
- INT DO – Densidade óptica integrada
- JNK – Proteína cinase c-Jun-N-terminal
- LTD – Depressão de longa duração
- LTP – Potenciação de longa duração
- MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno
- NGF – Fator de Crescimento do Nervo
- NGL – Núcleo Geniculado Lateral
- P(0-45) – Dia pós-natal (0-45)

p38^{MAPK} – Proteína cinase ativada por mitógeno de 38kDa

PBS – Tampão fosfato-salina

RPM – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida contendo SDS

SNC – Sistema Nervoso Central

TBS – Tampão Tris-salina

TBS-T – Tampão Tris-salina com Tween-20

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

TMB - Tetrametilbenzidina

RESUMO

O Sistema Visual representa um excelente modelo para o estudo dos processos plásticos e de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Muitos fatores têm sido implicados na maturação do sistema visual, mas as vias de sinalização intracelular envolvidas ainda não são bem conhecidas. De particular interesse são as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), uma família de serina/treonina cinases que possuem um importante papel na transdução de sinal da superfície celular para o núcleo. Estas enzimas são importantes mediadores intracelulares de eventos que ocorrem durante o desenvolvimento e recentemente têm sido implicadas no controle da plasticidade sináptica. Nos mamíferos, os membros desta família são cinases reguladas por sinal extracelular $\frac{1}{2}$ (ERK1/2), cinase c-Jun amino-terminal (JNK) e p38^{MAPK}. No sistema visual, foi demonstrado que a via de ERK regula processos de plasticidade durante o desenvolvimento em níveis retino-talâmicos e retino-corticais e que p38^{MAPK} controla uma forma peculiar de depressão de longo prazo no córtex visual. Neste trabalho, para entender melhor o papel de duas MAPKs – ERK1/2 e p38^{MAPK} – na maturação do sistema visual, foi caracterizado por *western blot* a regulação da fosforilação/ativação dessas enzimas na retina, colículo superior e córtex visual de rato durante o desenvolvimento pós-natal, do nascimento (P0) à idade adulta (P45). Os resultados demonstram que (i) na retina, a ativação de p38^{MAPK} tem um pico em P4, e entre P15 e P45, tanto a fosforilação de ERK1/2 quanto de p38^{MAPK} aumentam; (ii) no colículo superior, a fosforilação das duas MAPKs aumenta entre P4 e P15; (iii) no córtex visual, a fosforilação de ERK1/2 aumenta de P15 a P45 enquanto a fosforilação de p38^{MAPK} aumenta a partir de P4. Os dados apresentados demonstram uma regulação distinta da ativação de ERK1/2 e p38^{MAPK} nas três áreas visuais analisadas, que ocorrem em correlação temporal com eventos críticos da maturação do sistema visual. Estes resultados sugerem um importante papel de ERK1/2 e p38^{MAPK} no desenvolvimento pós-natal do sistema visual de ratos. Porém, mudanças duradouras na circuitaria neuronal requerem expressão gênica e síntese protéica. Portanto, o padrão de ativação de cinases precisa ser traduzido num padrão de expressão gênica, provavelmente através da ativação de fatores de transcrição. Uma via nuclear que pode ser crítica no controle da plasticidade neural do cérebro de mamíferos é a via de CREB. O envolvimento deste fator de transcrição na plasticidade cortical e no refinamento das projeções retino-talâmicas já foi demonstrado, mas não se sabe se CREB teria um papel na plasticidade retino-colicular. Neste trabalho, nós analisamos a expressão da forma ativada e total de CREB no colículo superior de rato durante o desenvolvimento. Os resultados mostram que tanto a forma total quanto a fosforilada de CREB aumentam entre P4 e P9, em coincidência com o aumento da ativação das MAPKs e com o período crítico da plasticidade colicular. Estes resultados demonstram que CREB também tem sua expressão altamente regulada durante um período de refinamento das conexões coliculares, podendo ter um papel também na maturação do colículo superior.

ABSTRACT

The visual system represents an excellent model for studying developmental and plastic processes in the Central Nervous System (CNS). Many factors have been shown to participate in visual system maturation, but the intracellular signaling pathways involved are still relatively unknown. Of particular interest are Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), a family of kinases implicated in various cellular functions. MAPKs are serine/threonine kinases that play an instrumental role in signal transduction from the cell surface to the nucleus. These enzymes are major intracellular mediators of developmental events and recently have been shown to control also synaptic plasticity processes. Mammalian members of this family are extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2), c-Jun amino-terminal kinases or stress-activated protein kinases (JNK/SAPKs) and p38^{MAPK}. At the level of the visual system, it has been demonstrated that the ERK pathway regulates developmental plastic processes at both retino-thalamic and thalamo-cortical level and that p38^{MAPK} controls a peculiar form of long-term depression in the visual cortex. Here, as a first approach to gain more insight on the role of two MAPKs - ERK1/2 and p38^{MAPK} - in visual system maturation, we characterized by western blot the regulation of their phosphorylation/activation in rat retina, superior colliculus and visual cortex, during postnatal development from birth (P0) to adult age (P45). Our main results show that: (i) in the retina p38^{MAPK} activation peaks at P4, and then, from P15 to P45, both ERK1/2 and p38^{MAPK} phosphorylation increases; (ii) in the superior colliculus phosphorylation of both MAPKs increases between P4 and P15; (iii) in the visual cortex ERK1/2 phosphorylation increases from P15 to P45, while phosphorylation of p38^{MAPK} increases starting from P4. The present data demonstrate a distinct regulation of the activation of ERK1/2 and p38^{MAPK} in the three visual areas analyzed which occurs in temporal correlation with critical events for visual system maturation. These results suggest an important role for ERK1/2 and p38^{MAPK} in the postnatal development of the rat visual system. Long-lasting changes in neuronal circuitry require gene expression and protein synthesis. Thus, the pattern of kinase activation has to be translated into a pattern of gene expression, probably through the activation of transcription factors. A candidate nuclear pathway that might be critical in the developmental control of neural plasticity in the mammalian brain is the CREB transcriptional pathway. The involvement of this transcription factor in cortical plasticity and in the refinement of retino-geniculate projections has already been demonstrated, but the role of CREB in the retino-collicular plasticity remains unclear. Here, we analyze the expression of the activated and the total form of CREB in the rat superior colliculus during development. The results show that both phosphorylated and total form of CREB increase between P4 and P9, in coincidence with the increase of the MAPKs activation and the critical period for collicular plasticity. These results show that CREB is highly regulated during a period of refinement of collicular connections and could also be involved in the maturation of the superior colliculus.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Sistema Visual

A formação do cérebro adulto se dá através de processos complexos que podem ser simplificados em três fases principais: gênese de neurônios, formação de conexões e por fim, eliminação de células e refinamento das sinapses. Nesta última fase, ocorre uma remodelagem gradual que envolve eliminação de projeções inapropriadas e crescimento seletivo de projeções corretas (Bear *et al.*, 2001). Este processo tem sido muito estudado no sistema visual, devido ao fato deste possuir padrões anatômicos e funcionais bem definidos e poder ser manipulado de uma maneira relativamente fácil durante o desenvolvimento (Hubel e Wiesel, 1998; Bence e Levelt, 2005).

O sistema visual é formado por três áreas principais: a retina, o núcleo talâmico geniculado lateral dorsal (NGL) e o córtex visual primário (CV1). Parte dos neurônios de projeção da retina (células ganglionares, CGR) enviam seus axônios para o NGL, que é a principal estrutura que transfere informação visual para o córtex cerebral; por sua vez, os neurônios do NGL enviam suas projeções até a camada IV do CV1. Este sistema retino-talâmico-cortical é responsável pelo processamento da visão. Além disso, uma parte das células ganglionares da retina envia projeções para um outro núcleo: o colículo superior, localizado no mesencéfalo (Figura 1). As CGR projetam-se diretamente para as camadas superficiais (visuais) e formam um mapa topográfico do campo visual contralateral. O colículo superior também recebe projeções de muitas outras regiões, sendo responsável pela integração de estímulos visuais, auditivos e

somatossensórios, auxiliando na orientação dos olhos e da cabeça na direção destes estímulos (Kandel et al., 2001).

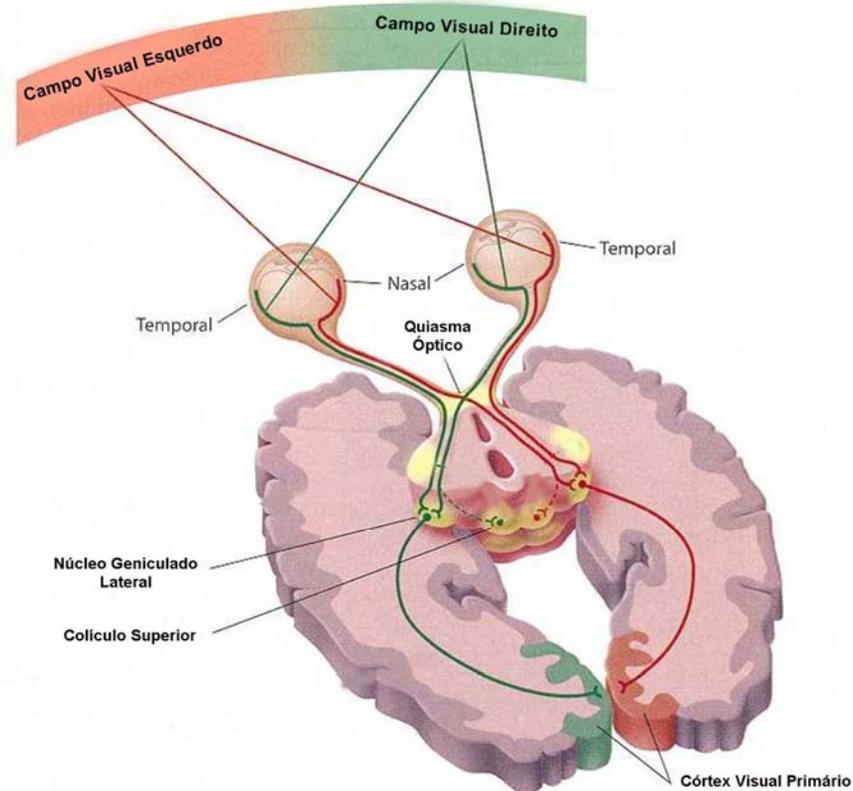


Figura 1 – Representação esquemática das vias visuais centrais. As células ganglionares da retina enviam suas projeções para o núcleo geniculado lateral no tálamo. Por sua vez, os neurônios de projeção do NGL enviam aferências para o córtex visual primário. Além disso, algumas células da retina enviam suas projeções para outro núcleo localizado no mesencéfalo: o colículo superior (adaptado de <http://www.doc.gold.ac.uk/~fll/MS101/Vision/VisionTop.html> Acesso em: 23/jan/2008).

Uma das peculiaridades do sistema visual de mamíferos é que ele preserva um alto nível de especificidade espacial e funcional. As projeções provenientes dos dois olhos permanecem separadas até a camada IV do CV1. As

CGR enviam a maioria dos seus axônios ao lado contralateral do cérebro, enquanto uma pequena parte inerva os alvos do lado ipsilateral. Desta forma, cada alvo recebe aferentes de ambos os olhos. No entanto, axônios provenientes de cada olho terminam em territórios distintos do mesmo alvo (Bear et al., 2001).

O núcleo geniculado lateral, por exemplo, é constituído de camadas que recebem aferentes exclusivamente do olho contralateral, alternadas com camadas que recebem aferentes apenas do olho ipsilateral. Da mesma forma, os neurônios do NGL enviam seus axônios para a camada IV do CV1, onde eles terminam em uma série de bandas alternadas exclusivas para cada olho, chamadas colunas de dominância ocular (Figura 2). No colículo superior, as projeções da retina alcançam as camadas superficiais (chamadas de camadas visuais), sendo que os axônios provenientes do olho contralateral encontram-se dispersos, enquanto as projeções ipsilaterais apresentam uma distribuição em forma de pequenos pontos, que varia ao longo do eixo rostro-caudal (Godement et al., 1984; Katz e Crowley, 2002; Fox e Wong, 2005; Hensch, 2005).

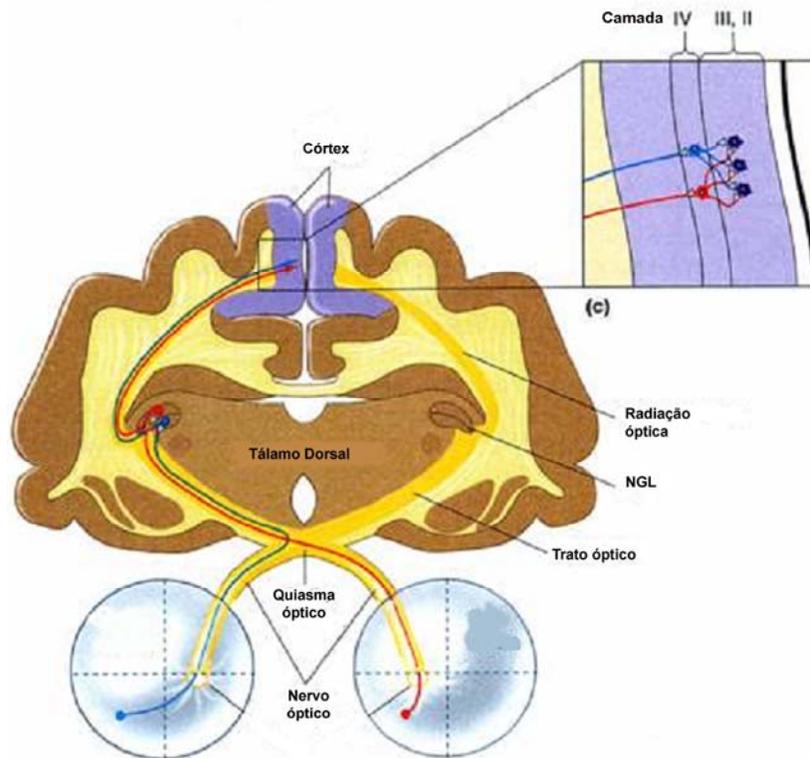


Figura 2 – As projeções provenientes de cada olho ocupam territórios específicos em cada um dos alvos das vias visuais. O NGL é constituído de camadas correspondentes ao olho contralateral, alternadas com camadas que recebem aferentes do olho ipsilateral. Também no CV1, os axônios provenientes do NGL terminam em uma série de bandas alternadas exclusivas para cada olho, chamadas colunas de dominância ocular (Adaptado de Bear et al., 2001).

1.2. Desenvolvimento e Plasticidade do Sistema Visual

A distribuição das fibras provenientes de cada olho em territórios separados é característica do cérebro adulto. No entanto, no início do desenvolvimento, essas projeções axonais estão difusas, compartilhando territórios comuns. Posteriormente, as fibras correspondentes a cada olho se tornam restritas a camadas específicas, formando territórios específicos, através de um processo de segregação que inclui seleção e retração de projeções (Figura 3) (Linden et

al., 1981; Sretavan e Shatz, 1986; Hahm et al., 1999; Bence e Levelt, 2005). Esta especificidade das conexões é obtida, em parte, através de uma superprodução inicial de neurônios e sinapses, que são então seletivamente eliminados durante períodos críticos do desenvolvimento (Cowan et al., 1984; Oppenheim 1991). Os neurônios de projeção da retina, por exemplo, são produzidos em grande quantidade nos estágios embrionários, e quando se inicia a formação das conexões sinápticas, grande parte deles será eliminada por um processo de morte celular espontânea (Galli-Resta e Ensini, 1996). Este mecanismo fisiológico tem a finalidade de ajustar o número correto de células ganglionares da retina com o número de células alvo pós-sinápticas.

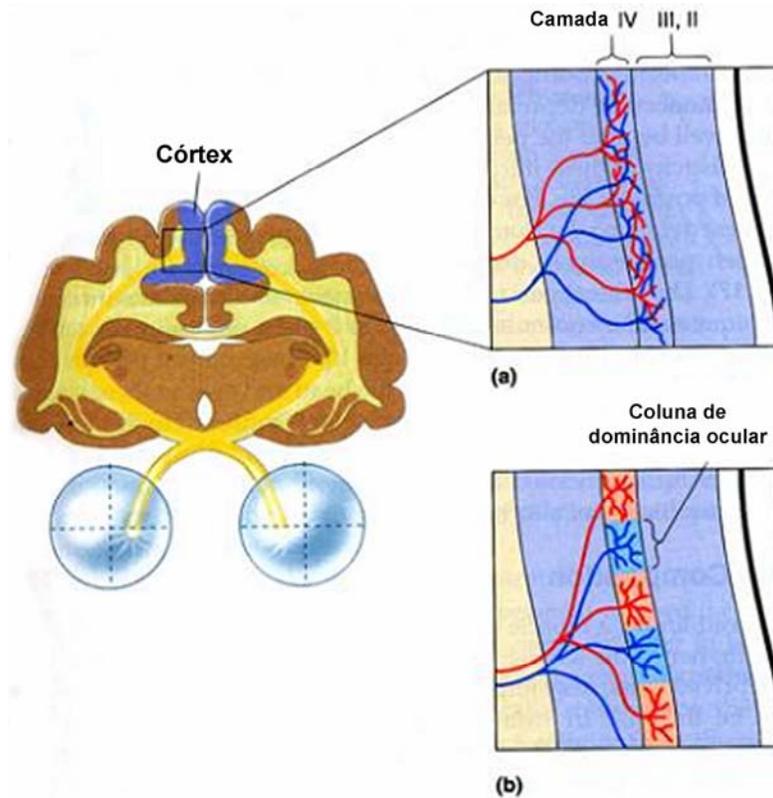


Figura 3 – A segregação das fibras provenientes de cada olho no córtex visual ocorre em um período específico do desenvolvimento. No início do desenvolvimento, as projeções axonais estão difusas, compartilhando territórios comuns no CV1 (a). Posteriormente, as fibras correspondentes a cada olho se tornam restritas a camadas específicas, formando territórios específicos, chamados de colunas de dominância ocular (b) (Adaptado de Bear, 2001).

Além dos mecanismos de eliminação do excesso de células por apoptose, sabe-se que a remodelagem das conexões neuronais envolve uma competição entre as projeções dos dois olhos pela conquista de um território comum, e que este processo é dependente da atividade elétrica (Hubel e Wiesel, 1998). Um exemplo disso é representado pelos efeitos da eliminação da experiência visual

de um olho (deprivação monocular) sobre a maturação do córtex visual. Em consequência deste tipo de manipulação, os territórios inervados pelo olho fechado no córtex visual (colunas de dominância ocular) se tornam menores, enquanto os territórios ocupados pelas projeções provenientes do olho aberto se expandem (Figura 4).



Figura 4 – Modificação das colunas de dominância ocular após deprivação monocular. Secções tangenciais da camada 4 do córtex de macacos mostrando as colunas de dominância ocular referentes ao olho injetado com marcador radioativo. (A) Macaco normal e (B) macaco que sofreu deprivação monocular. O olho não privado foi injetado com prolina radioativa mostrando uma expansão das colunas de dominância ocular na camada 4 (Fonte: Wiesel, 1982).

Esta manipulação tem efeito apenas durante um período específico do desenvolvimento, que, em ratos e camundongos, se inicia no 15º dia pós-natal (dia de abertura dos olhos) e vai até o 45º dia (P15-P45). Após esse período, não há nenhuma consequência da manipulação do estímulo visual. Isso demonstra que, durante o desenvolvimento, existe um período determinado para a maturação do córtex visual, particularmente sensível a experiência visual. Durante esse intervalo de tempo, chamado de período crítico, o córtex visual é plástico (passível de remodelagem). Fora desse período, o cérebro já possui uma estrutura funcional e anatômica determinada, mais difícil de ser modelada (Wiesel e Hubel, 1965; Berardi et al., 2000).

Algo similar acontece também nos alvos primários das CGR (núcleo geniculado lateral e colículo superior). A segregação das projeções da retina nestes alvos acontece entre P4 e P15, período no qual os olhos ainda estão fechados e a retina ainda está em fase de maturação. Portanto, a forma de atividade elétrica implicada neste processo não é a visão, mas uma forma particular de atividade elétrica espontânea da retina (chamada de ondas de atividade elétrica espontânea). O bloqueio dessas ondas previne a formação de camadas específicas de cada olho no núcleo geniculado lateral e no colículo (Shatz e Stryker, 1988; Penn et al. 1998; Rossi et al., 2001; Feller, 2002).

Além da atividade elétrica, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no controle do desenvolvimento das conexões visuais, e que restringem a plasticidade dependente da atividade elétrica a curtos períodos críticos. Muitos estudos têm sugerido um importante papel dos fatores neurotróficos pertencentes à família do fator de crescimento do nervo (NGF),

como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), no desenvolvimento e plasticidade do sistema visual (Cabelli et al., 1995; Huang et al., 1999).

A produção e liberação de neurotrofinas dependem da atividade elétrica, e em particular, da atividade visual. Por sua vez, as neurotrofinas podem modular a atividade elétrica e a transmissão sináptica. Essa regulação recíproca pode ser um meio pelo qual conexões neuronais ativas são seletivamente fortalecidas, sugerindo que as neurotrofinas podem operar em sinergismo com atividade elétrica para promover a plasticidade sináptica (Berardi et al., 2003).

Uma pergunta que muitos grupos têm tentado responder é: como os neurônios podem integrar a sinalização promovida pela atividade elétrica e pelos fatores neurotróficos para controlar a plasticidade das sinapses? Recentemente, algumas vias de sinalização intracelular tem sido implicadas nessa integração de sinal, em particular, a via das proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs) (Thomas e Huganir, 2004; Sweatt, 2004).

1.3. Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos

As MAPKs são uma família de serina/treonina cinases, ativadas por fosforilação, e medeiam a transdução de sinal intracelular em resposta a diferentes estímulos. Elas participam na regulação das atividades celulares de crescimento, diferenciação, sobrevivência ou morte. Os mamíferos expressam diversos grupos de MAPKs, entre eles, as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), e as proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), como as p38^{MAPKs} e JNKs (Figura 5) (Chen et al., 2001; Thomas e Huganir, 2004).

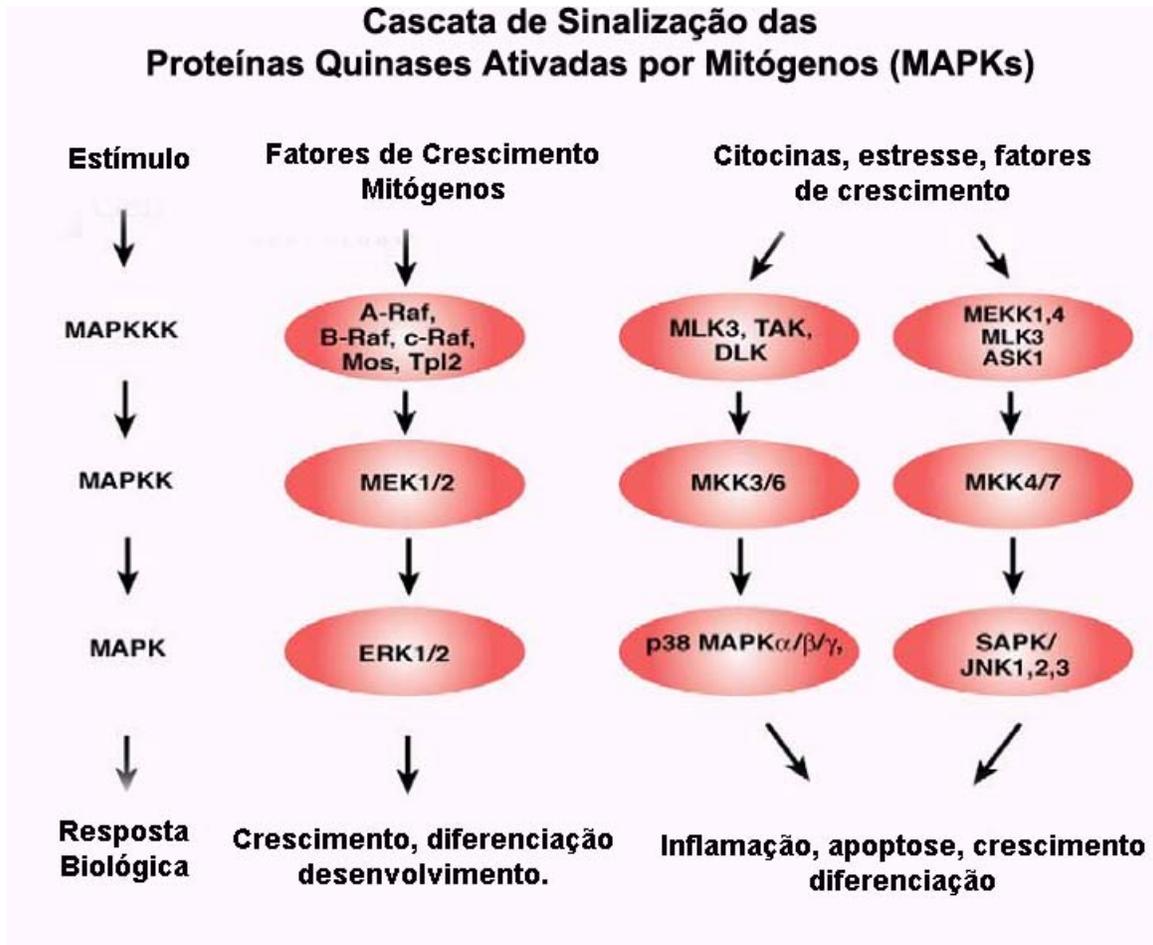


Figura 5 – Cascatas de Sinalização das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) (Adaptado de <http://www.cellsignal.com/pathways/mapkinase.jsp>. Acesso em: 23/jan/2008).

As ERK1/2 possuem uma variedade de substratos, incluindo outras proteínas cinases e fatores de transcrição, e exercem diversas funções celulares. Nos mamíferos, essas enzimas regulam importantes processos celulares que incluem: expressão de genes, sobrevivência, proliferação, reorganização do citoesqueleto e morte celular. Especificamente, no sistema nervoso central, as ERK1/2 são essenciais para o desenvolvimento e plasticidade neuronais. Além disso,

participam nos processos de aprendizado e de formação de memória dependentes do hipocampo e nos processos de indução de potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD) (Orban et al., 1999; Kawasaki et al., 1999; Sweatt, 2001).

Já a p38^{MAPK} e a JNK podem ser ativadas por várias formas de estresse, e têm sido relacionadas com indução de apoptose (Xia et al., 1995; Kyriakis e Avruch, 1996; Takeda and Ichijo, 2002). No entanto, alguns trabalhos demonstram um possível papel da p38^{MAPK} na plasticidade sináptica (Zhu et al. 2002; Bolshakov et al., 2000; Zhen et al., 2001, Thomas e Huganir, 2004, Xiong et al., 2006).

Recentemente, foi demonstrado que ERK1/2 e p38^{MAPK} são constituintes importante da plasticidade do sistema visual. Em particular, foi demonstrado que o bloqueio da cascata da sinalização mediada por ERK mediante administração de inibidores específicos na retina e no tálamo prejudica a plasticidade das projeções retino-talâmicas (Naska et al., 2004). Além disso, o bloqueio de ERK no córtex visual, mas não da p38^{MAPK}, bloqueia a plasticidade cortical (DiCristo et al., 2001). Porém, a p38^{MAPK} parece estar envolvida numa forma particular de LTD no córtex visual (Xiong et al., 2006).

Uma das formas pelas quais as MAPKs podem interferir no desenvolvimento e plasticidade sináptica é através da ativação de fatores de transcrição. Muitos estudos têm demonstrado que o controle transcricional da expressão gênica consiste num dos principais meios de controle e regulação do desenvolvimento de diversos sistemas. Os mecanismos de plasticidade sináptica envolvem mudanças duradouras na circuitaria neuronal que requerem expressão gênica e

síntese de proteínas (Mower et al, 2002; Taha e Stryker, 2002). Portanto, a ativação de vias de proteínas cinases precisa ser traduzida em expressão gênica, provavelmente através da ativação de fatores de transcrição.

Uma via nuclear que pode ser crítica no controle do desenvolvimento e plasticidade no sistema nervoso de mamíferos é a via da proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB). Várias vias de sinalização envolvendo MAPKs culminam com a ativação de CREB, e este poderia ser um provável mecanismo pelo qual as MAPKs integrariam a sinalização da atividade elétrica e fatores neurotróficos com uma resposta a nível de expressão gênica.

1.4. Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo ao AMPc (CREB)

CREB é um fator de transcrição, localizado no núcleo das células, sendo abundante no sistema nervoso. A transcrição gênica mediada por CREB ocorre pela sua ligação a seqüências específicas do DNA chamadas de Elemento Responsivo ao AMPc (CRE) (Yamamoto et al., 1988). No processo de transdução de sinal intracelular, os dímeros de CREB são fosforilados, por diversas proteínas cinases, e iniciam o processo de transcrição (Mayr e Montminy, 2001). CREB é ativado quando a fosforilação ocorre em um resíduo específico de serina, a serina 133 (Ser-133), promovendo a associação do CREB à CBP (proteína de ligação ao CREB) (Chrivia et al., 1993).

Já foi demonstrado o envolvimento de CREB na consolidação da plasticidade e formação de memória (Bourtchuladze et al., 1994). No sistema visual, a expressão gênica mediada por CREB tem um importante papel na

plasticidade de dominância ocular (Pham et al., 1999; Mower et al., 2002), bem como no refinamento das projeções retino-talâmicas (Phan et al., 2001).

No córtex visual, sabe-se que a ativação de ERK integra a informação sensorial numa resposta transcricional mediada por CREB, já que o bloqueio farmacológico de ERK inibe a expressão gênica dependente de CRE após estímulo visual (Cancedda et al., 2003). Estes resultados apontam ERK como um provável efetor ligando sinais extracelulares com a expressão gênica no sistema visual durante os períodos críticos do desenvolvimento (Berardi et al., 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O estudo do desenvolvimento, maturação e da plasticidade sináptica no sistema visual tem sido fundamental, não só para a compreensão do funcionamento deste sistema, mas também porque os resultados obtidos muitas vezes têm sido demonstrados válidos também para outros sistemas sensoriais, sugerindo um mecanismo geral comum nesse processo. As MAPKs têm sido apontadas como importantes elementos da transdução de sinal capazes de modular a circuitaria cerebral, integrando sinais externos com respostas a nível de expressão gênica e síntese protéica, através da ativação de fatores de transcrição, como CREB, por exemplo. Por esta razão, uma investigação mais aprofundada do papel de ERK1/2, p38^{MAPK} e CREB no desenvolvimento do sistema visual são relevantes.

Embora existam algumas informações sobre o papel das MAPKs no desenvolvimento e plasticidade de conexões sinápticas no sistema visual (DiCristo et al., 2001; Berardi et al., 2003; Naska et al., 2004), estas ainda não são completas. Em particular, falta uma descrição da distribuição temporal e espacial das MAPKs no sistema visual durante o desenvolvimento. Para caracterizar essa distribuição, foi usada neste trabalho, a técnica de “western blot”, por ser extremamente sensível, permitindo detectar e avaliar a expressão de pequenas quantidades de proteínas de uma forma semiquantitativa. Neste sentido, foram utilizados para este estudo, animais entre 0 e 45 dias de vida, de forma a cobrir vários eventos críticos que ocorrem durante o desenvolvimento e

maturação do sistema visual. A possível correlação entre a ativação das MAPKs nestes períodos específicos seria um indicativo da participação dessas vias nesses processos.

Outro aspecto importante desta abordagem é a disponibilidade de técnicas que permitam a localização celular das proteínas cinases e seus alvos. Portanto, outro ponto abordado neste trabalho foi a padronização da técnica de imunistoquímica no laboratório, para a detecção e localização das formas ativadas e totais das MAPKs e de CREB nas diferentes regiões do sistema visual.

Outro aspecto ainda não estudado diz respeito ao possível papel das MAPKs no desenvolvimento do sistema retino-colicular, bem como o possível papel da p38^{MAPK} na plasticidade retino-talâmica. Uma das maneiras de responder essas perguntas é através da utilização da técnica de traçado neuronal, através da qual pode ser medido o grau de segregação das projeções da retina no colículo e no tálamo em situações normais ou após manipulações experimentais. Por esse motivo, foi também objetivo a padronização da técnica de traçado neuronal utilizando peroxidase de rabanete silvestre (HRP). Esta técnica permitirá, futuramente, a análise direta do envolvimento das MAPKs na plasticidade, através de uso de inibidores específicos dessas vias nos períodos críticos e posterior análise da segregação das projeções retino-coliculares e retino-talâmicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a modulação das vias de sinalização das MAPKs durante a formação e plasticidade de conexões sinápticas no sistema visual.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a modulação da atividade de ERK1/2 e p38^{MAPK} no sistema visual (córtex visual, colículo superior e retina) durante o desenvolvimento, através de western blot.
- ✓ Determinar a modulação do fator de transcrição CREB no colículo superior durante o desenvolvimento através de western blot.
- ✓ Padronizar a técnica de imunistoquímica para localização celular das MAPKs e de CREB em diferentes áreas do sistema visual durante o desenvolvimento.
- ✓ Padronizar a técnica de traçado neuronal para estudo da plasticidade no colículo superior e no núcleo geniculado lateral.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Long-Evans, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina com idades entre 0 e 45 dias (dias pós-natal P0, 4, 9, 15, 30 e 45). Os animais receberam água e comida *ad libitum*, e foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura entre 22°C e 25°C. Eles foram manipulados e mortos de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa (00013/CEUA; Processo No. 23080.032663/2005-69/UFSC). Saliencia-se que linhagens albinas não podem ser utilizadas para este tipo de estudo devido ao fato de que, nos albinos, a segregação das projeções da retina não ocorre de forma tão precisa quanto nos animais não-albinos (Land e Shamalla-Hannah, 2001).

4.2. Materiais

Acrilamida, Triton X-100, β -mercaptoetanol, Kit ECL, Nitrocelulose, SDS, TEMED e anticorpos secundários (anti-IgG de coelho e camundongo) conjugados à peroxidase foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech[®]. Cloreto de Sódio, EDTA, Álcool Metílico, Álcool Etílico, Ácido Acético, DMSO, Acetato de Sódio, Ácido Clorídrico, Sacarose, Xileno, Peróxido de Hidrogênio, Fosfato Dibásico de Sódio foram obtidos da Nuclear[®]. Tris, PMSF, Glicina, bis-Acrilamida, Persulfato de Amônia, Tween 20, Soro Albumina Bovina, Ponceau, Coomassie Blue R-250 foram obtidos da USB[®]. Fluoreto de Sódio foi obtido da Dinâmica[®]. Glicerol, Gelatina em pó, Paraformaldeído foram obtidos da VETEC[®]. Hidróxido de Sódio,

Fosfato Monobásico de Potássio foram obtidos da MERK®. Folin, Glicose, Diaminobenzidina (DAB), Tetrametilbenzidina (TMB), Peroxidase, anticorpos anti-fosfo-ERK, anti-ERK e anti-p38^{MAPK} foram obtidos da SIGMA®, ABC kit e anticorpos secundários (anti-IgG de coelho e camundongo) biotinilados foram obtidos da Vector®. Anticorpos anti-fosfo-p38^{MAPK}, anti-fosfo-CREB, anti-CREB e anti-β-actina e o Padrão de Peso Molecular foram obtidos da Cell Signaling®. Papel Filtro 3MM foi obtido da Whatman®. As soluções Fixadora e Reveladora e os filmes foram obtidos da KODAK®.

4.3. *Western Blotting*

4.3.1. *Extração de Proteínas*

Os animais foram mortos por decapitação no mesmo período do dia (entre 8:00 e 10:00 da manhã) e os cérebros retirados a 4°C em solução salina (NaCl 0,9%). Com auxílio de um microscópio estereoscópio quando necessário, foram dissecadas as estruturas de interesse (córtex visual, colículo superior e retina), utilizando-se para isso, pincéis e pinças de ponta fina. Em seguida as estruturas foram colocadas em 100-150µL de tampão de homogeneização (Tris 50mM pH 7,0; EDTA 1mM; NaF 100mM; PMSF 0,1mM; Na₃VO₄ 2mM; Triton X-100 1% e glicerol 10%) e foram maceradas mecanicamente com o uso de pistilo. Após este procedimento, os homogenatos foram incubados por 30 minutos no gelo e centrifugados a 13000 RPM, 4°C por 1 hora. Por fim, foram retirados os sobrenadantes, os quais foram diluídos em tampão de amostra (Tris 100mM, EDTA 4mM, SDS 8%, glicerol 16%, pH 6,8), numa proporção de 1:1 (v/v). Uma

parte do sobrenadante foi separada para a dosagem de proteínas e o restante foi armazenado a -70°C para posterior separação protéica por eletroforese.

4.3.2. *Dosagem de Proteínas*

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Peterson (1977). Sobre alíquotas de $3\mu\text{L}$ das amostras foram adicionados $397\mu\text{L}$ de água e $400\mu\text{L}$ do reagente de Lowry (0,2N de NaOH, 2,5% de SDS, 5% de Na_2CO_3 , 0,2% de CuSO_4 e 0,1% de tartarato duplo de sódio e potássio). Após 10 minutos foram adicionados $200\mu\text{L}$ do reagente de Folin 0,4N e aguardados 30 minutos, em temperatura ambiente. A leitura foi realizada através de espectrofotômetro, $\lambda=750\text{nm}$, e as concentrações protéicas das amostras foram obtidas através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA).

4.3.3. *Separação de proteínas*

Antes da eletroforese, foram adicionados aos extratos protéicos, azul de bromofenol 0,2% e β -mercaptoetanol 8%. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), usando gel de separação 10% (10% de Acrilamida/Bis-acrilamida 37,5:1, 375mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,06% de TEMED e 0,036% de persulfato de amônia; pH 8,8) e gel de entrada 4% (4% de acrilamida/bis-acrilamida 37,5:1, 125 mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônia; pH 6,8). Para comparação entre amostras obtidas de ratos de diferentes idades, foi aplicada a mesma quantidade protéica em cada poço do gel ($70\mu\text{g}$ de proteína total). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 20mA por placa e voltagem

máxima de 140V, durante aproximadamente 2h30min, em temperatura ambiente. Foi utilizado como tampão superior, glicina 190 mM, Tris 25mM e SDS 0,1% e como tampão inferior, Tris 50mM, pH 8,3.

4.3.4. *Eletrotransferência*

Após a eletroforese, os géis foram retirados da placa e mantidos em tampão de pré-transferência (Tris 25mM pH 8,3, glicina 190 mM, metanol 5% e SDS 0,1%) por 5 minutos. Para a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, primeiramente foram colocados quatro papéis filtro umedecidos com tampão de transferência (Tris 25mM pH 8,3, glicina 190 mM e metanol 5%) sobre eletrodo inferior (anódico) do aparato de transferência. Em seguida, a membrana, também pré-umedecida no mesmo tampão, foi colocada sobre os papéis filtro, e sobre esta, foi colocado o gel. Sobre o gel, foram colocados mais quatro papéis filtro embebidos em tampão de transferência, com o cuidado para não formar bolhas. O aparato de transferência foi fechado e as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose aplicando-se uma corrente de $1.2\text{mA}/\text{cm}^2$ e a voltagem limitada a 40V por 1 hora e meia. Após a eletrotransferência, para controle da eficiência do processo, os géis foram corados com solução de Comassie blue-R-250 0,1% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 7% (v/v) e as membranas com solução de Ponceau 0,5% (p/v) em ácido acético 1% (v/v) (Figura 6).

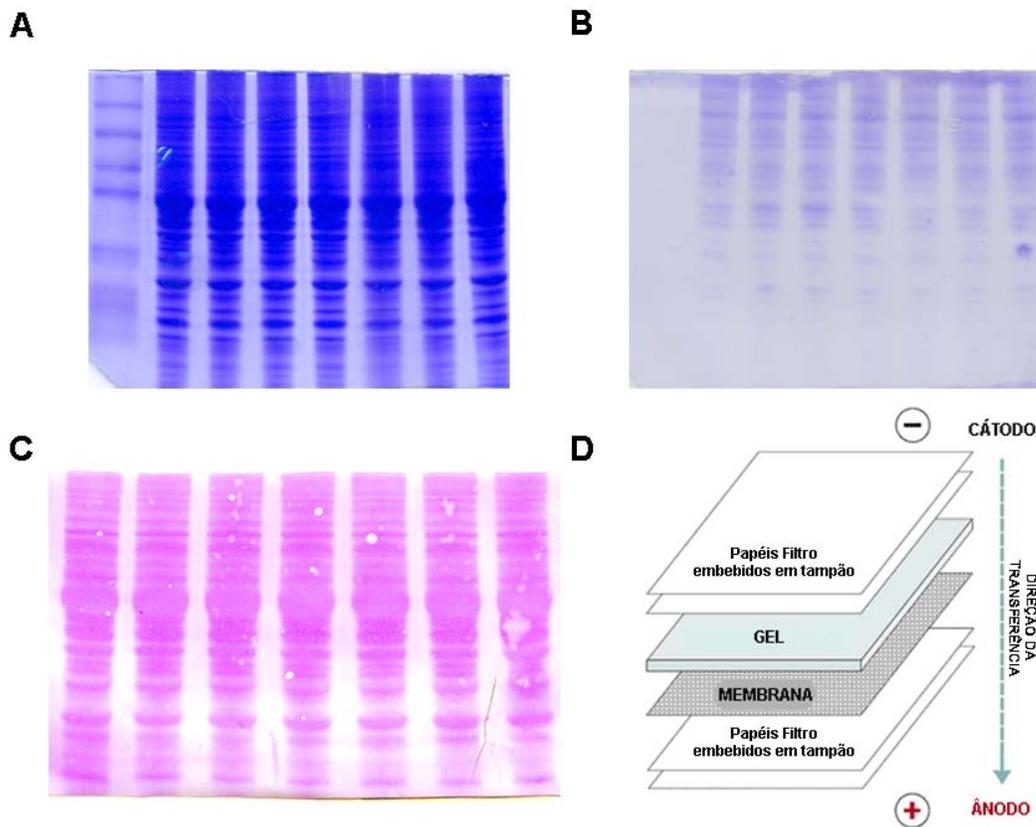


Figura 6 – Eletrotransferência. O gel e a membrana foram colocados entre papéis filtros embebidos em tampão, e montados no aparato de eletrotransferência que permite a passagem de uma corrente elétrica. Para controle da transferência das proteínas, o gel é corado com Coomassie Blue e a membrana corada com Ponceau. (A) Gel corado com Coomassie Blue antes da eletrotransferência; (B) gel corado com Coomassie Blue após a eletrotransferência; (C) membrana de nitrocelulose corada com Ponceau após a eletrotransferência; (D) esquema representativo do sistema de eletrotransferência.

4.3.5. *Imunodeteção*

Após a eletrotransferência, as membranas foram lavadas com TBS (10mM de Tris, 150mM de NaCl, pH 7,5), para retirar o Ponceau, e os sítios inespecíficos

foram bloqueados com 5% de leite desnatado em TBS por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%, 10mM de Tris, 150mM de NaCl, pH7.5), e incubadas com os anticorpos primários (anti-fosfo-ERK, 1:10.000; anti-fosfo-p38^{MAPK}, 1:1.000; anti-fosfo-CREB, 1:1.000; anti-ERK1/2, 1:40.000; anti-p38^{MAPK}, 1:10.000; anti-CREB, 1:1.000 e anti- β -actina 1:1.000), por 12h a 4°C, sob agitação. Em seguida, foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T e incubadas com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase (1:4.000), por 1h a temperatura ambiente, sob agitação. A revelação foi realizada através da técnica de quimioluminescência, utilizando-se para isso o kit ECL (Figura 7).

Com a mesma membrana, foram realizados experimentos primeiramente utilizando anticorpos contra a forma fosforilada da proteína de interesse, depois contra a forma total, e por fim contra β -actina. Para eliminar os complexos antígeno/anticorpo do processo anterior, após a revelação as membranas foram lavadas (5 minutos) com água MilliQ, NaOH 0,2N, água MilliQ novamente e por fim TBS-T, para serem então, novamente bloqueadas com leite e incubadas com o próximo anticorpo primário.

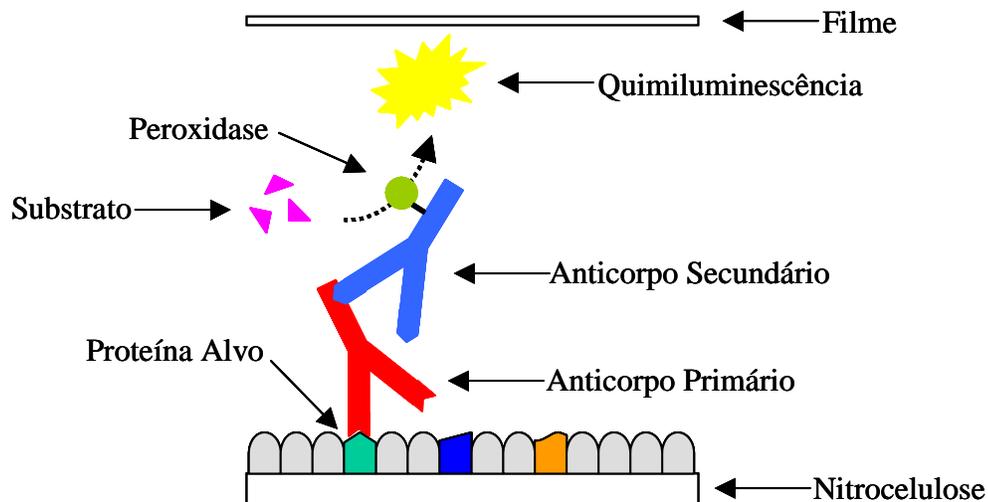


Figura 7 – Esquema representativo da imunodeteção por quimioluminescência. O antígeno (proteína de interesse) é reconhecido por um anticorpo primário específico. Este por sua vez, é reconhecido por um anticorpo secundário conjugado a peroxidase. A adição do kit de quimioluminescência (ECL) permite a emissão de luz, que fere o filme.

4.3.6. Quantificação

A quantificação foi realizada através da densitometria das bandas, com o auxílio do programa Scion Image[®]. Uma determinada área foi escolhida para incluir cada banda a ser quantificada. A media da densidade óptica (DO) de cada banda foi multiplicada pela area total da mesma, resultando na densidade óptica integrada (INT DO). Com relação as MAPKs (ERK1/2 e p38^{MAPK}), foi feita a razão da densidade óptica das bandas das proteínas fosforiladas pelas proteínas totais correspondentes. Dessa forma, foi apresentado o valor relativo de fosforilação, em função da quantidade total da proteína alvo como um índice representativo da ativação destas enzimas. Já com relação a CREB, como houve variação dos

níveis totais da proteína, os resultados referentes tanto à forma fosforilada quanto à forma total foram apresentados em função da β -actina, que foi utilizada como um controle de carga protéica aplicada no gel.

4.4. *Imunoistoquímica*

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400mg/kg) e perfundidos intracardialmente com salina (NaCl 0,9% a 37°C) e com paraformaldeído 4% em tampão fosfato/salina (PBS) a 4°C. Em seguida, os cérebros foram dissecados e pós-fixados em paraformaldeído 4% por 24h a 4°C e crioprotégidos em sacarose 30% também por 24h, para finalmente serem congelados em isopentano e gelo seco, e armazenados a -70°C. Os cérebros foram cortados em fatias coronais de 40 μ m, utilizando-se um criostato. Após rápida lavagem com PBS, as fatias foram bloqueadas por uma hora em temperatura ambiente, em uma solução de BSA 10% e Triton X-100 0,3%. A reação com o anticorpo primário (anti-fosfo-ERK, 1:1.000, anti-fosfo-p38^{MAPK} 1:200, anti-fosfo CREB, 1:200 e anti-CREB, 1:1.000) foi realizada em 5% BSA e 0,3% Triton X-100, por 24-48h a 4°C sob agitação. Posteriormente, as fatias foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário biotilado (1:600) diluído em BSA 5%, Triton X-100 0,3% (2h, temperatura ambiente). Após novas lavagens, as fatias foram incubadas com complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC kit). As reações foram reveladas com solução de diaminobenzidina (DAB) (0,05%), sulfato de níquel 0,05% (para amplificação do sinal) e peróxido de hidrogênio (0,005%). As fatias foram então montadas em lâminas gelatinizadas, e após secas, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e

fechadas com lâminulas usando meio DPX, para posterior análise em microscópio (Figura 8).

Para quantificação, foram selecionadas 5 fatias de cada animal e foram digitalizadas fotos da estrutura de interesse. Para cada fatia, foram selecionados 6 diferentes campos aleatórios de aproximadamente 60X60 μ m e as células marcadas foram contadas manualmente.

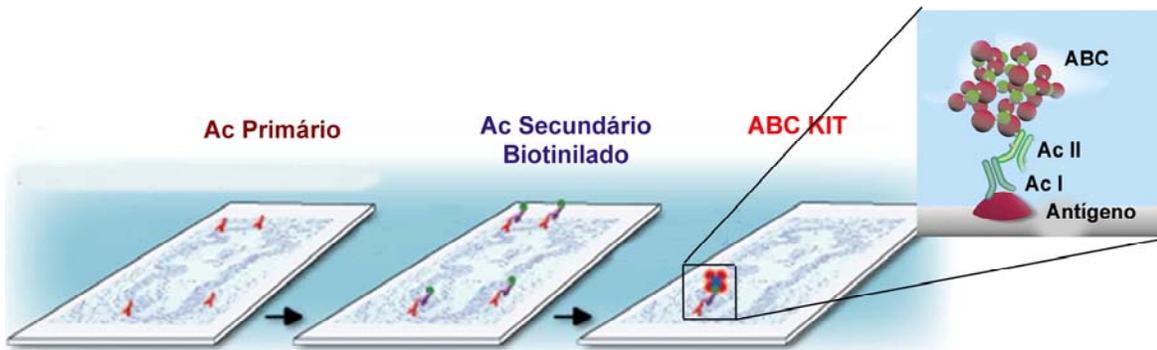


Figura 8 – Esquema representativo do método de imunistoquímica.

O antígeno (proteína de interesse) é reconhecido por um anticorpo primário (Ac I) específico. Este por sua vez, é reconhecido por um anticorpo secundário (Ac II) biotinizado. Para amplificação do sinal, utiliza-se um complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC kit). Desta forma, a peroxidase presente no complexo se liga ao anticorpo secundário, e a atividade da mesma pode ser observada pela precipitação cromógeno (DAB).

4.5. Traçado neuronal

Os animais foram anestesiados com éter etílico, e foram injetados intraocularmente 5 μ L de uma solução 30% de peroxidase de rabanete silvestre (HRP) em solução fisiológica contendo DMSO 2%. As injeções foram realizadas com uma agulha (29-31G) conectada a uma seringa Hamilton. Após 24h, os ratos foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral (400mg/kg) e perfundidos com salina (NaCl 0,9%, 37°C) seguido de 1,25% glutaraldeído, 1% paraformaldeído em tampão fosfato (PBS), pH 7,4, 4°C. Em seguida, os cérebros foram dissecados e pós-fixados na mesma solução fixadora por 24h a 4°C e crioprotetidos em sacarose 30% também por 24h, para finalmente serem congelados em isopentano e gelo seco, e armazenados a -70°C. Os cérebros foram cortados em fatias coronais de 40 μ m, utilizando-se um criostato. Para a revelação, inicialmente as fatias foram mantidas por pelo menos duas horas em tampão fosfato 0,12M, pH 7,3. Em seguida, foram lavadas em tampão acetato 0,12M, pH 3,3 a 4°C por menos de 10 minutos, e depois mantidas em solução de pré-incubação (contendo o cromógeno tetrametilbenzidina, TMB) por 10 minutos protegidas da luz. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio (0,005%) por 3 vezes com intervalo de 20 minutos. A reação foi interrompida transferindo as fatias para o tampão acetato 0,12M pH 3,3 a 4°C, em agitação e protegido da luz. Em seguida, as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas e após secas, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e fechadas com lâminulas usando meio DPX, para posterior análise em microscópio.

4.6. *Análise Estatística*

Os resultados obtidos foram avaliados através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da modulação da atividade de ERK1/2 e p38^{MAPK} no sistema visual (córtex visual, colículo superior, e retina) durante o desenvolvimento por Western Blot.

A fosforilação/ativação de p38^{MAPK} e ERK1/2 foi analisada por imunodeteção em três áreas do sistema visual de rato (retina, colículo superior e córtex visual) em diferentes idades pós-natais, entre P0 e P45.

MAPKs são enzimas que precisam ser duplamente fosforiladas em um resíduo de tirosina e outro de treonina para se tornarem ativas e exercerem sua função de sinalização (English et al., 1999; Chang e Karin, 2001; Chen et al., 2001). Portanto, a detecção das formas bifosforiladas indica que essas vias estão ativadas. Os experimentos foram realizados utilizando um anticorpo que reconhece exclusivamente a forma bifosforilada (ativada) da enzima, seguidos de um anticorpo que reconhece a forma total da mesma enzima. Fazendo a razão entre os sinais obtidos com o primeiro (forma bifosforilada) e com o segundo (forma total), foi calculada a intensidade de ativação de cada enzima. Os anticorpos utilizados para detecção de ERK e fosfo-ERK reconhecem duas bandas correspondentes às duas isoformas da enzima, ERK1 (44kDa) e ERK2 (42kDa), enquanto os anticorpos contra p38^{MAPK} e fosfo-p38^{MAPK} reconhecem uma única banda (38kDa).

Não foram encontradas alterações significativas na quantidade da forma total de ambas, p38^{MAPK} e ERK1/2, durante o período do desenvolvimento estudado nas três áreas analisadas.

5.1.1. *Retina*

A análise da ativação de p38^{MAPK} por imunodeteção na retina revelou uma regulação bimodal durante o desenvolvimento pós-natal. A fosforilação desta enzima estava extremamente baixa (quase indetectável) em P0, aumentando em P4 e voltando a níveis baixos em P9. A partir de P15, houve um aumento gradual da fosforilação da p38^{MAPK} até P45 (Fig. 9A). A quantificação densitométrica dos dados mostrou que, comparado com P0, a fosforilação de p38^{MAPK} aumentou aproximadamente 20 vezes em P4 e P15, 40 vezes em P30 e 60 vezes em P45 (Fig. 9C).

A fosforilação das duas isoformas de ERK na retina permaneceu relativamente constante entre P0 e P9, aumentando em P15 e mantendo-se em níveis similares entre P30 e P45 (Fig. 9B). A quantificação dos resultados mostrou que a fosforilação de ERK1 estava baixa no nascimento e aumentou de 8 a 10 vezes entre P15 e P45, enquanto a fosforilação de ERK2 já estava relativamente alta a P0 e aumentou apenas de 2 a 3 vezes em relação ao tempo P0 (Fig. 9D, E).

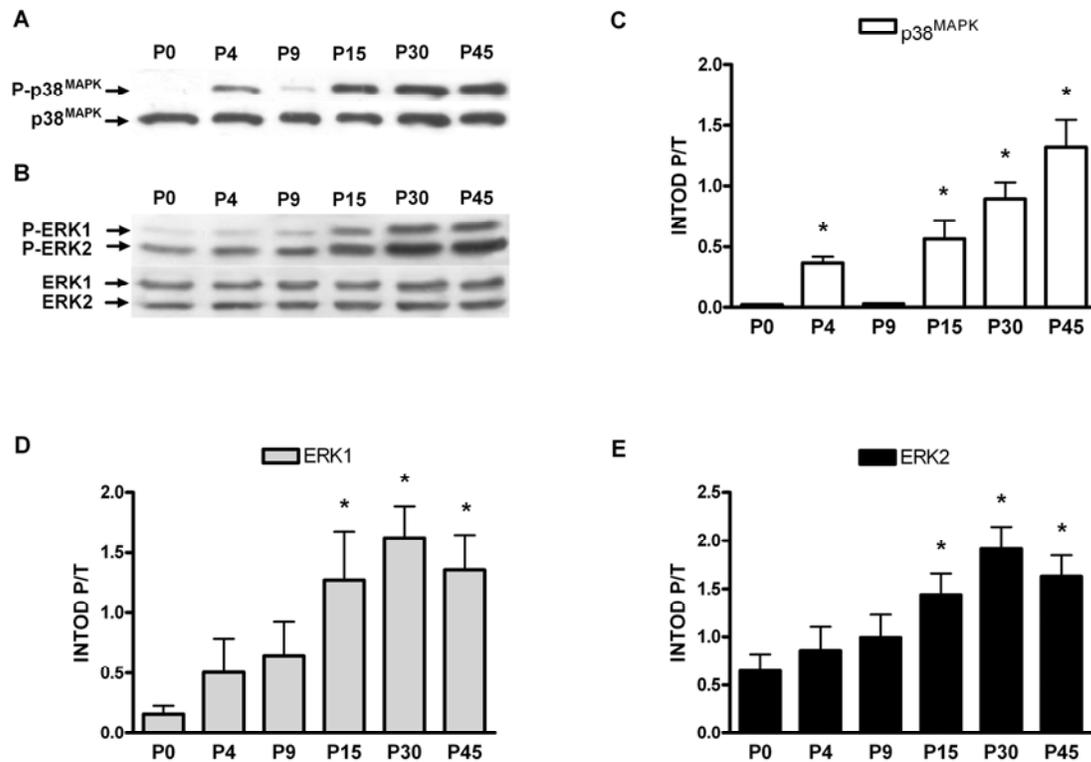


Figura 9 – Modulação da atividade de p38^{MAPK} e ERK1/2 na retina de rato durante o desenvolvimento. **A)** *Western blot* representativo da fosforilação de p38^{MAPK} (P-p38^{MAPK}) e do conteúdo total da enzima (p38^{MAPK}) na retina de rato em diferentes idades pós-natais. **B)** *Western blot* representativo da fosforilação de ERK1/2 (P-ERK1/2) e do conteúdo total da enzima (ERK1/2) na retina de rato em diferentes idades pós-natais. **C)** Quantificação densitométrica apresentada na forma de razão da forma fosforilada pela forma total de p38^{MAPK} (INTDO P/T) em diferentes idades durante o desenvolvimento (n=11). A fosforilação de p38^{MAPK} é baixa em P0, aumenta em P4 e volta a níveis quase indetectáveis em P9, aumentando gradualmente novamente de P15 a P45. **D, E)** Quantificação densitométrica apresentada na forma de razão da forma fosforilada pela forma total de ERK1/2 (INTDO P/T) em diferentes idades durante o desenvolvimento (n=9). A fosforilação de ERK1 e ERK2 é relativamente baixa entre P0 e P9, aumenta em P15, e se mantém alta até P45. * $p < 0.05$ em relação aos níveis em P0. Não foi encontrada diferença significativa nas quantidades totais de p38^{MAPK} ($p=0,38$), ERK1 ($p=0,58$), e ERK2 ($p=0,61$) durante o desenvolvimento.

5.1.2. *Colículo Superior*

A análise da fosforilação de p38^{MAPK} e ERK1/2 no colículo superior revelou que as duas enzimas são reguladas de maneira semelhante durante o desenvolvimento. Quanto a p38^{MAPK}, a ativação estava baixa em P0, aumentando em P4 e permanecendo desta maneira até P15. A fosforilação voltou a níveis mais baixos em P30 e P45 (Fig. 10A) A quantificação dos dados mostrou que o aumento da p38^{MAPK} no colículo entre P4 e P15 foi 4 vezes os níveis detectados em P0 (Fig. 10C).

A fosforilação de ERK1 e de ERK2 estava relativamente baixa em P0, aumentando entre P4 e P30, e diminuindo novamente em P45 (Fig. 10B). Novamente, a fosforilação de ERK1 estava baixa em P0 e aumentou de 4 a 8 vezes, enquanto a fosforilação de ERK2 já se encontrava relativamente alta no nascimento, aumentando apenas duas vezes quando comparada com P0 (Fig. 10D, E).

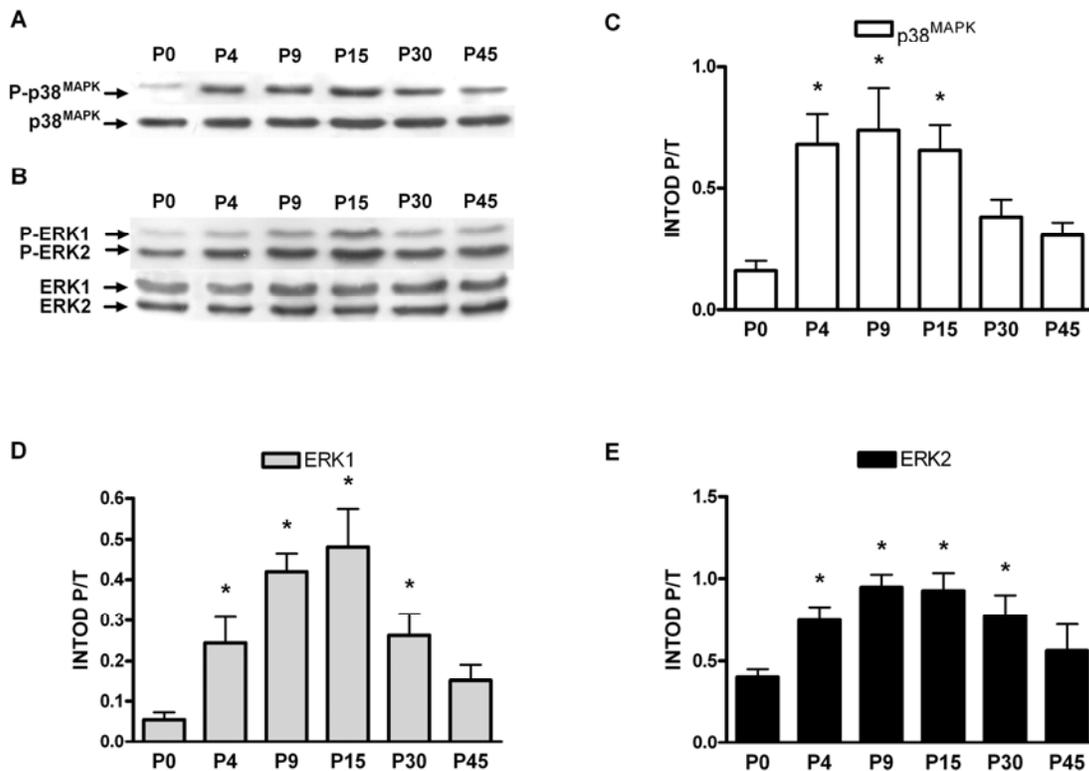


Figura 10 – Modulação da atividade de p38^{MAPK} e ERK1/2 no colículo superior de rato durante o desenvolvimento. **A)** *Western blot* representativo da fosforilação de p38^{MAPK} (P-p38^{MAPK}) e do conteúdo total da enzima (p38^{MAPK}) na retina de rato em diferentes idades pós-natais. **B)** *Western blot* representativo da fosforilação de ERK1/2 (P-ERK1/2) e do conteúdo total da enzima (ERK1/2) na retina de rato em diferentes idades pós-natais. **C)** Quantificação densitométrica apresentada na forma de razão da forma fosforilada pela forma total de p38^{MAPK} (INTDO P/T) em diferentes idades durante o desenvolvimento (n=8). A fosforilação de p38^{MAPK} é baixa em P0, aumenta de P4 a P15 e volta a níveis baixos em P30 e P45. **D, E)** Quantificação densitométrica apresentada na forma de razão da forma fosforilada pela forma total de ERK1/2 (INTDO P/T) em diferentes idades durante o desenvolvimento (n=9). A fosforilação de ERK1 e ERK2 aumenta significativamente entre P4 e P30, caindo em P45. * $p < 0.05$ em relação aos níveis em P0. Não foi encontrada diferença significativa nas quantidades totais de p38^{MAPK} (p=0,96), ERK1 (p=0,68), e ERK2 (p=0,98) durante o desenvolvimento.

5.1.3. *Córtex Visual*

No córtex visual, os níveis de ativação de p38^{MAPK} estavam baixos em P0 aumentando em P4 e mantiveram-se elevados em todos os estágios até P45 (Fig. 11A). A quantificação dos dados mostrou que a fosforilação de p38^{MAPK} aumentou aproximadamente 6-7 vezes de P4 a P45 quando comparado ao tempo P0 (Fig. 11C).

A análise de ERK1 e ERK2 durante o desenvolvimento do córtex visual mostrou que essas enzimas encontravam-se pouco ativadas entre P0 e P9, aumentando sua fosforilação de P15 até P45 (Fig. 11B). A quantificação dos resultados mostrou que a fosforilação de ERK1 aumentou aproximadamente 6 vezes a partir de P15, comparado com P0. Já a fosforilação de ERK2 estava extremamente baixa em P0, aumentado de 30 a 40 vezes de P15 a P45 (Fig. 11D, E).

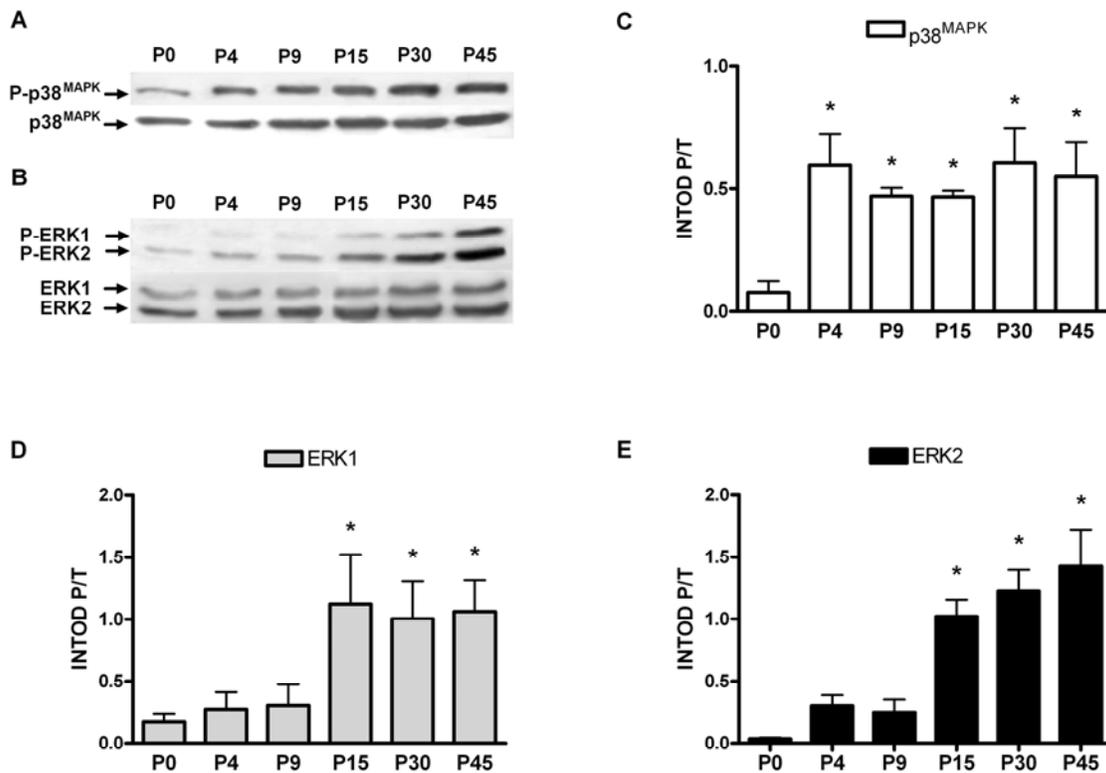


Figura 11 – Modulação da atividade de p38^{MAPK} e ERK1/2 no córtex visual de rato durante o desenvolvimento. **A)** *Western blot* representativo da fosforilação de p38^{MAPK} (P-p38^{MAPK}) e do conteúdo total da enzima (p38^{MAPK}) na retina de rato em diferentes idades pós-natais. **B)** *Western blot* representativo da fosforilação de ERK1/2 (P-ERK1/2) e do conteúdo total da enzima (ERK1/2) na retina de rato em diferentes idades pós-natais. **C)** Quantificação densitométrica apresentada na forma de razão da forma fosforilada pela forma total de p38^{MAPK} (INTDO P/T) em diferentes idades durante o desenvolvimento (n=8). A fosforilação de p38^{MAPK} é baixa em P0, aumenta em P4 e se mantém elevada até P45. **D, E)** Quantificação densitométrica apresentada na forma de razão da forma fosforilada pela forma total de ERK1/2 (INTDO P/T) em diferentes idades durante o desenvolvimento (n=9). A fosforilação de ERK1 e ERK2 é baixa entre P0 e P9, aumenta em P15 e se mantém elevada até P45. * $p < 0.05$ em relação aos níveis em P0. Não foi encontrada diferença significativa nas quantidades totais de p38^{MAPK} ($p=0,98$), ERK1 ($p=0,76$), e ERK2 ($p=0,83$) durante o desenvolvimento.

5.2. Caracterização da modulação de CREB e fosfo-CREB no colículo superior durante o desenvolvimento, por Western Blot.

O controle transcricional da expressão gênica consiste num dos principais meios de controle e regulação do desenvolvimento de diversos sistemas. Uma das formas pelas quais as MAPKs podem interferir no desenvolvimento e plasticidade sináptica é através da ativação de fatores de transcrição, já que a ativação dessas vias precisa ser traduzida em expressão gênica.

Um fator de transcrição que pode ser crítico no controle do desenvolvimento e plasticidade no sistema nervoso de mamíferos é o CREB. Várias vias de sinalização envolvendo MAPKs culminam com a ativação de CREB, e este poderia ser um provável mecanismo pelo qual as MAPKs integrariam a sinalização da atividade elétrica e fatores neurotróficos com uma resposta a nível de expressão gênica.

Já se sabe que a transcrição gênica dependente do promotor CRE tem um papel fundamental no desenvolvimento e plasticidade ao nível do córtex visual e do tálamo (Pham et al., 1999; Mower et al., 2002; Phan et al., 2001). No entanto, nada se sabe a respeito da regulação de CREB no colículo superior durante o desenvolvimento. Para ser ativado, CREB é fosforilado em um resíduo específico de serina, a serina 133 (Ser-133), promovendo a associação do CREB à CBP (proteína de ligação ao CREB) (Chrivia et al., 1993). Desta forma, no presente estudo foi analisada a expressão da forma fosforilada e total de CREB no colículo superior em diferentes idades pós-natais, entre P0 e P45.

A análise preliminar da expressão de fosfo-CREB no colículo superior demonstrou que a forma ativada deste fator de transcrição é quase indetectável ao nascimento, apresentando uma tendência de aumento em P4, que se mantém até P9. A fosforilação de CREB volta a níveis quase indetectáveis em P15, mantendo-se assim até P45. Quanto a forma total de CREB, a regulação foi semelhante, apresentando um aparente aumento da expressão em P4 e P9, retornando a níveis mais baixos em P15 até P45 (Figura 12).

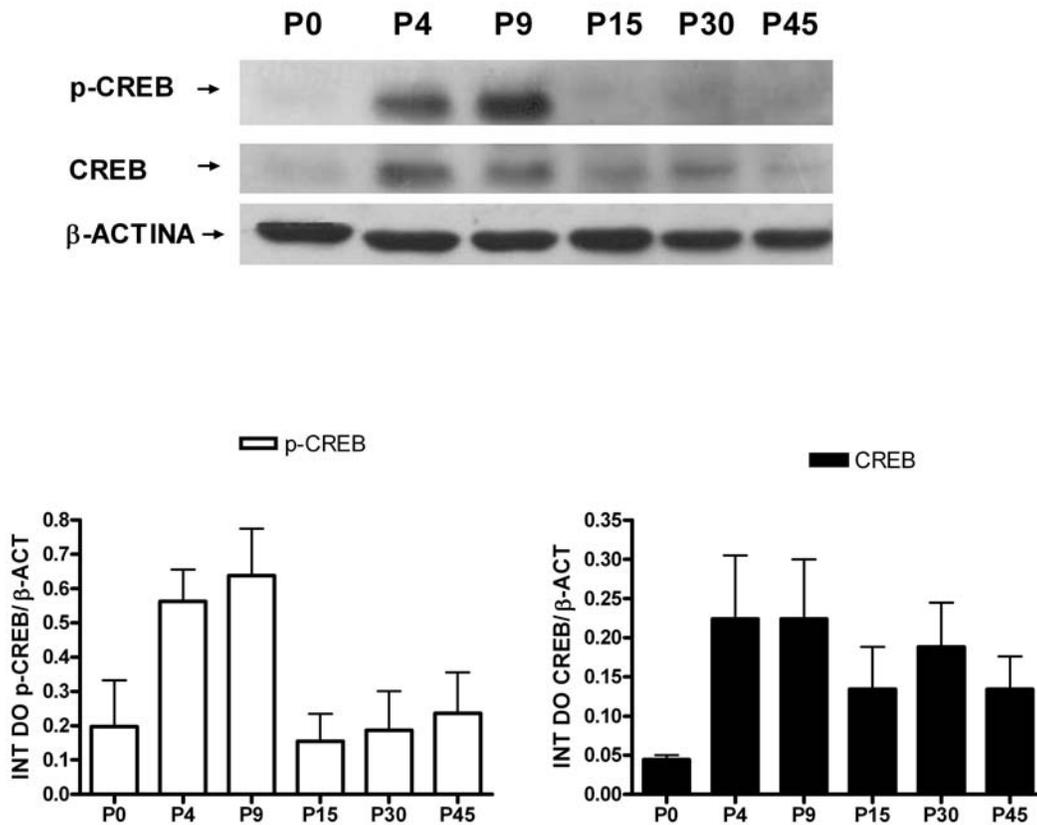


Figura 12 – Modulação de CREB e fosfo-CREB no colículo superior de rato durante o desenvolvimento. A) *Western blot* representativo da fosforilação de CREB (p-CREB), do conteúdo total da proteína (CREB) e do conteúdo de β-actina (β-ACTINA) no colículo superior de rato em diferentes idades pós-natais **B)** Quantificação densitométrica da razão dos sinais detectados da forma fosforilada de CREB pelo sinal detectado da β-actina (INT DO p-CREB/β-ACT) em diferentes idades durante o desenvolvimento (n=3). A presença de fosfo-CREB é baixa em P0, aumenta em P4 e P9, diminuindo novamente de P15 a P45. **C)** Quantificação densitométrica da razão dos sinais detectados de CREB total pelos sinais detectados da β-actina (INT DO CREB/β-ACT) em diferentes idades durante o desenvolvimento (n=3). A presença de CREB total também é baixa em P0, aumentando em P4, voltando a diminuir em P15. * $p < 0.05$ em relação aos níveis em P0.

5.3. Padronização da Técnica de Imunoistoquímica para caracterizar a localização celular das MAPKs e de CREB em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central.

Além da caracterização da expressão das MAPKs e de CREB durante o desenvolvimento por Western Blot, é importante a utilização de uma técnica que permita a localização celular dessas proteínas nas diferentes regiões do sistema visual. Para permitir o acesso a esse tipo de informação, foi padronizada a técnica da imunoistoquímica, utilizando-se anticorpos contra as formas ativas/fosforiladas de ERK e p38^{MAPK}, e contra a forma fosforilada e total de CREB.

5.3.1. Detecção de fosfo-ERK1/2 por imunoistoquímica

Para a detecção de fosfo-ERK1/2 por imunoistoquímica, foi utilizado o anticorpo contra a forma bifosforilada da enzima na diluição de 1:1.000, conforme descrito nos Materiais e Métodos. A figura 13 mostra um experimento representativo, no qual podem se observar grandes neurônios marcados no córtex (Figura 13A e B) e no hipocampo (Figura 13C e D).

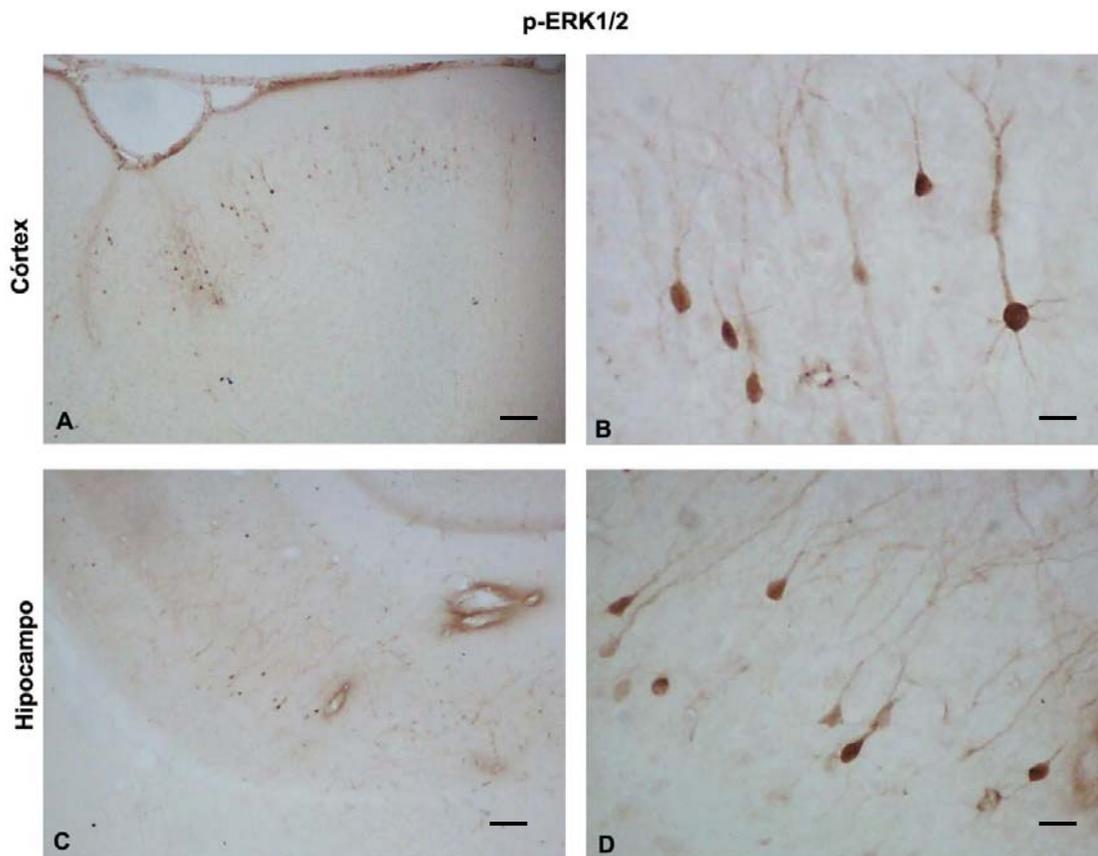


Figura 13 – Detecção de fosfo-ERK no córtex e hipocampo de rato por imunohistoquímica. Experimento representativo mostrando secções coronais (40 μ m) de cérebro de rato. Animais foram perfundidos com paraformaldeído 4%, os cérebros foram congelados e cortados em um criostato a 40 μ m. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com anticorpo primário contra a forma fosforilada de ERK1/2 (1:1000) seguido por anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo (1:150) e kit ABC. A reação foi revelada pelo método da diaminobenzidina (DAB). A marcação está presente em grandes neurônios em algumas camadas do córtex (A) e do hipocampo (C), como pode se observar melhor nas imagens ampliadas (B e D). Barra de escala = 100 μ M em A e C e 20 μ M em B e D.

Com a intenção de acessar detalhes histológicos da localização das MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal na retina, onde diferentes tipos de neurônios podem ser facilmente identificados e estão organizados em camadas distintas, foram realizados experimentos de imunistoquímica em cortes do olho nos quais podem se identificar as diferentes camadas da retina (Figura 14). A idade escolhida para análise foi P15, por ser uma idade na qual o sinal de fosfo-ERK detectado por Western blot foi bastante evidente. Nesta idade, foi observado um sinal nas células ganglionares da retina (CGR) (Figura 14A) e nenhuma marcação no controle, sem anticorpo primário (Figura 14B).

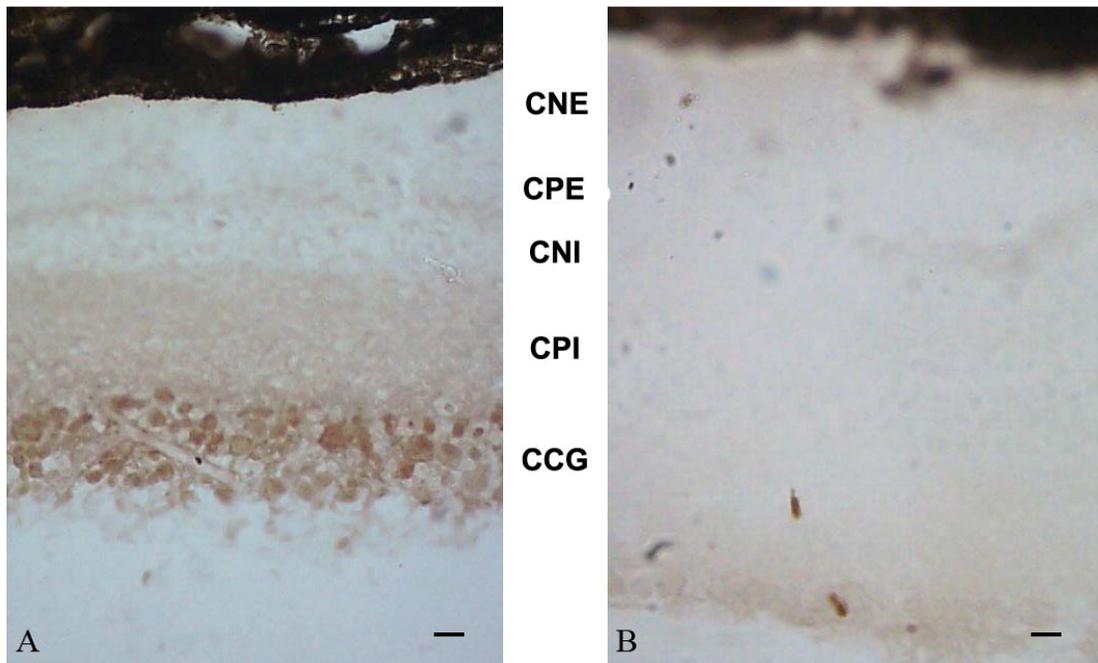


Figura 14 – Análise de fosfo-ERK na retina de rato por imunohistoquímica. Um sinal fraco foi detectado na camada de células ganglionares. Experimento representativo mostrando uma secção coronal (40 μ m) de uma retina de rato P15. Animais foram perfundidos com paraformaldeído 4%, os olhos foram congelados e cortados em fatias de 40 μ m no criostato. Após o bloqueios, as fatias foram incubadas com (A) ou sem anticorpo primário (B) contra a forma fosforilada de ERK1/2 (1:1000) seguido por anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo (1:150) e kit ABC. A reação foi revelada pelo método da diaminobenzidina (DAB). CNE, camada nuclear externa; CPE camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Barras de escala = 20 μ M.

5.3.2. *Detecção de fosfo-p38^{MAPK} por imunistoquímica*

Para a detecção da forma ativa de p38^{MAPK}, foi utilizado anticorpo da Cell Signaling numa diluição de 1:200. Neste estudo, nós detectamos apenas um sinal relativamente fraco de fosfo-p38^{MAPK}, talvez devido a baixa sensibilidade da técnica pelo menos com o protocolo experimental adotado. Diferente de fosfo-ERK, as células marcadas nesse caso, são pequenas e apresentam uma distribuição característica (Figura 15).

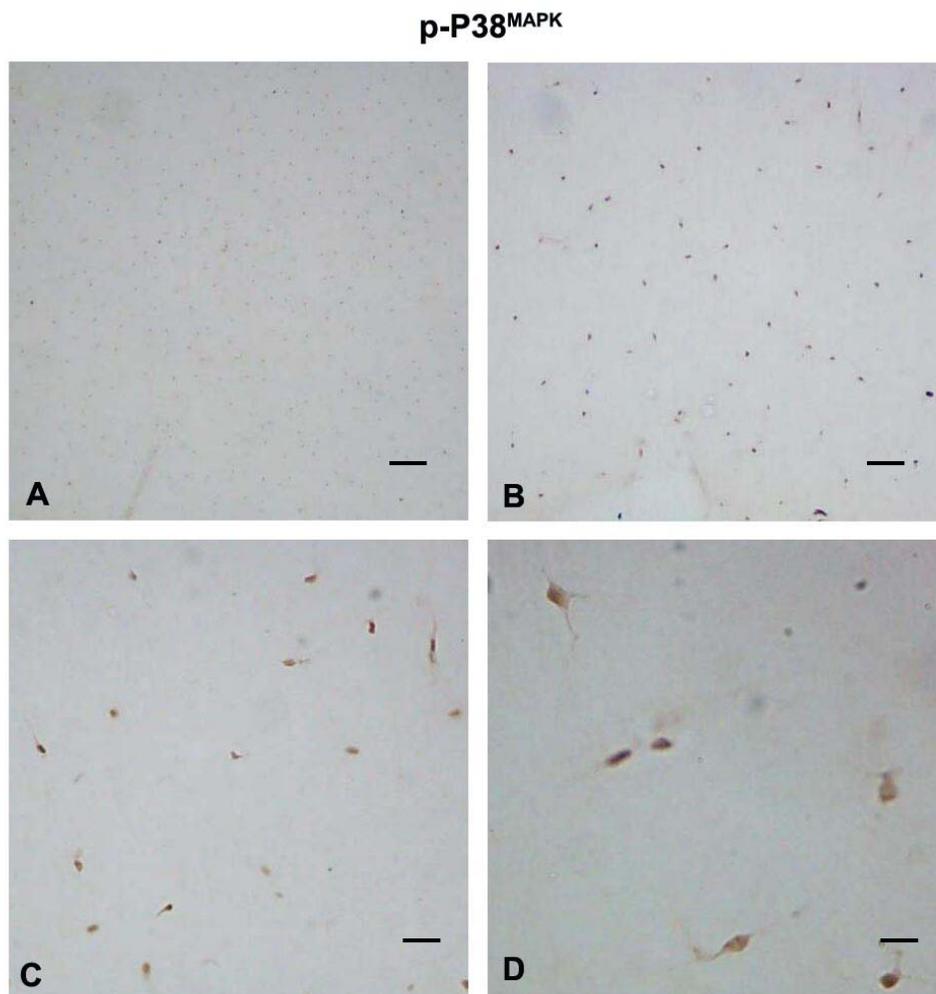


Figura 15 – Detecção de fosfo-p38^{MAPK} no cérebro de rato por imunoistoquímica. Experimento representativo mostrando secções coronais (40 μ m) de cérebro de rato. Animais foram perfundidos com paraformaldeído 4%, os cérebros foram congelados e cortados em fatias de 40 μ m com um criostato. Após o bloqueios, as fatias foram incubadas com anticorpo primário contra a forma fosforilada de p38^{MAPK} (1:200) seguido por anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo (1:150) e kit ABC. A reação foi revelada pelo método da diaminobenzidina (DAB). As células marcadas, nesse caso, são pequenas, e apresentam uma distribuição característica. (A-D) Fotos do córtex de rato do menor para o maior aumento. Barras de escala = 200 μ m em A, 100 μ m em B, 50 μ m em C e 20 μ m em D.

5.3.3. *Detecção de CREB e fosfo-CREB por imunistoquímica*

Para a detecção de fosfo-CREB foi utilizado o anticorpo contra a forma fosforilada da Cell Signaling numa diluição de 1:200, e para detecção de CREB total, o anticorpo, também da Cell Signaling, foi utilizado numa diluição de 1:1.000.

Nos experimentos realizados, foi observada uma forte marcação para fosfo-CREB no giro denteado do hipocampo (Figura 16A) e uma marcação ainda mais intensa para forma total desse fator de transcrição, como observado na figura 8D. A marcação é nuclear, típica de fatores de transcrição, como pode se observar nas ampliações da imagem (Figura 16E e F).

No córtex visual, também foi detectada a presença de fosfo-CREB, e pode-se observar uma característica distribuição em camadas (Figura 16B e C).

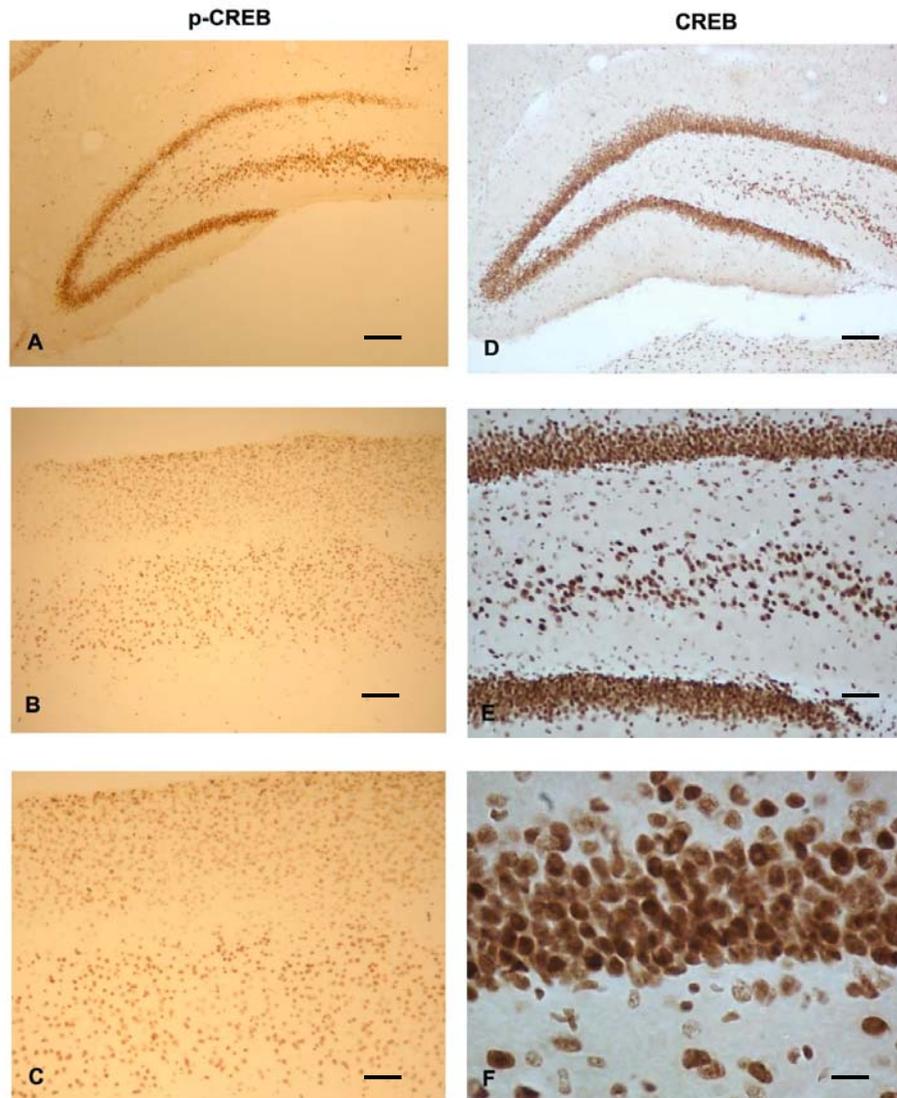


Figura 16 – Detecção de fosfo-CREB e CREB por imunoistoquímica. Experimento representativo mostrando secções coronais (40 μ m) de cérebro de rato. Animais foram perfundidos com paraformaldeído 4%, os cérebros foram congelados e cortados em fatias de 40 μ m com um criostato. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com anticorpo primário contra a forma fosforilada ou total de CREB seguido por anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de camundongo (1:150) e kit ABC. A reação foi revelada pelo método da diaminobenzidina (DAB). Imagens representativas da marcação de fosfo-CREB no giro denteado do hipocampo (A) e nas diferentes camadas do córtex visual (B e C). A marcação para CREB total foi ainda mais forte no giro denteado (D) e pode-se observar no detalhe uma marcação nuclear típica de fatores de transcrição (E e F). Barras de escala = 100 μ M em A-D, 50 μ M em E e 20 μ M em F.

Como os resultados de western blot mostraram uma forte modulação de fosfo-CREB e de CREB no colículo superior entre P4 e P15, nós decidimos fazer uma comparação da expressão de CREB entre P4 e P15 nessa região, utilizando a técnica de imunohistoquímica. Como observado na Figura 17, a presença de CREB é evidente nas diversas camadas do colículo superior em ambas as idades (Figura 17A-F). A quantificação preliminar dos resultados não mostrou diferenças nítidas entre as duas idades analisadas (Figura 17G).

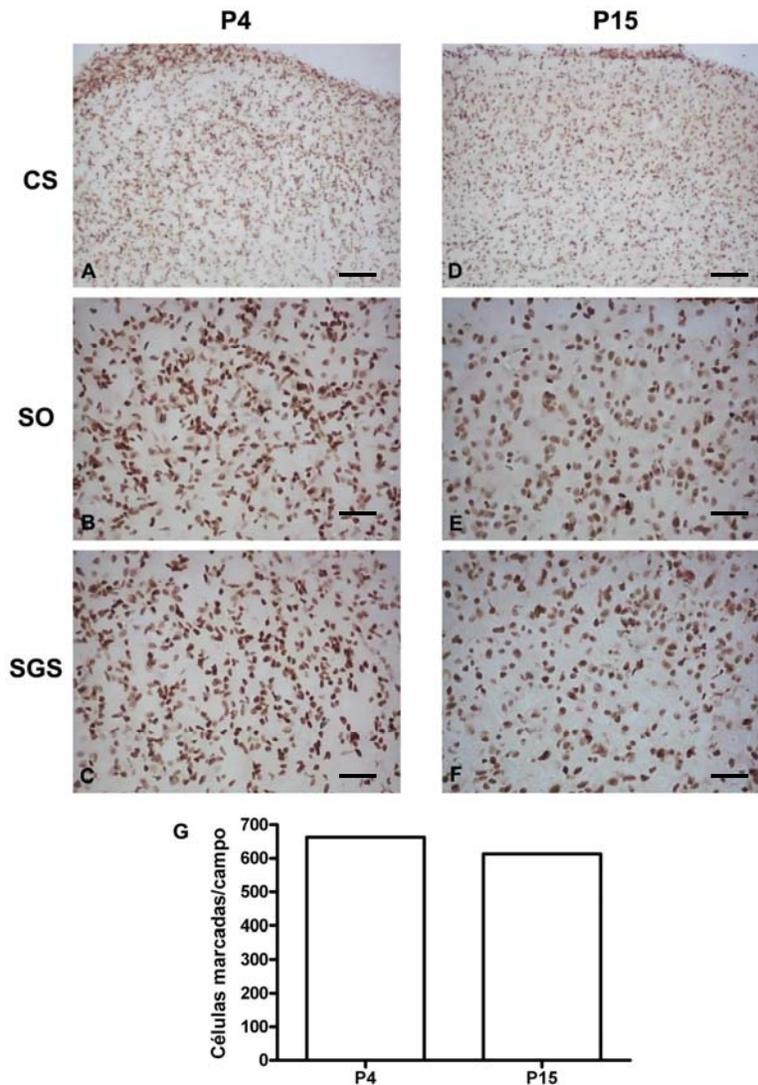


Figura 17 – Detecção de CREB no colículo superior de rato por imunohistoquímica. Experimento representativo mostrando secções coronais (40 μ m) de cérebro de rato em P4 e P15. Animais foram perfundidos com paraformaldeído 4%, os cérebros foram cortados em fatias de 40 μ m com um criostato. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com anticorpo primário contra a forma total de CREB seguido por anticorpo secundário iotilado (1:150) e kit ABC. A reação foi revelada pelo método da diaminobenzidina (DAB). Imagens representativas da marcação de CREB no colículo superior (CS) em P4 (A) e P15 (D). A presença de CREB foi detectada tanto no stratum opticum (SO; B e E) quanto no stratum griseum superficiale (SGS; C e F). A quantificação dos resultados não mostrou diferença entre as idades analisadas (G), Barras de escala = 100 μ M em A e D e 50 μ M em B, C, E e F.

5.4. Padronização da Técnica de Traçado neuronal para o estudo da plasticidade das projeções retino-talâmicas e retino-coliculares.

Os resultados de Western Blot mostraram uma modulação das MAPKs e de CREB durante os períodos críticos do desenvolvimento do Sistema Visual, o que sugere um papel dessas proteínas nos processos de maturação desse sistema. Uma forma de estudar o papel dessas enzimas na formação das projeções retino-coliculares e retino-talâmicas é através da utilização da técnica de traçado neuronal, através da qual pode ser medido o grau de segregação das projeções da retina no colículo e no tálamo em situações normais ou após manipulações experimentais. Por esse motivo, foi padronizada no laboratório, a técnica de traçado neuronal utilizando peroxidase de rabanete silvestre (HRP).

Para verificar a distribuição das projeções retino-coliculares e retino-talâmicas, os animais foram monocularmente injetados com o traçador HRP. No colículo superior, as fotos foram feitas em campo escuro, por mostrarem mais claramente a marcação, neste experimento. Os axônios provenientes do olho contralateral ocupam a maior parte das projeções das camadas superiores deste núcleo (Figura 18B). A distribuição das fibras ipsilaterais forma uma série de agrupamentos (Figura 18A) que variam ao longo do eixo rostro-caudal.

No NGL, as fotos em campo claro mostram que a maioria das fibras provenientes da retina termina na porção contralateral, ocupando toda a área externa desse núcleo (Figura 18D), enquanto as projeções ipsilaterais ocupam uma pequena região central (Figura 18C).

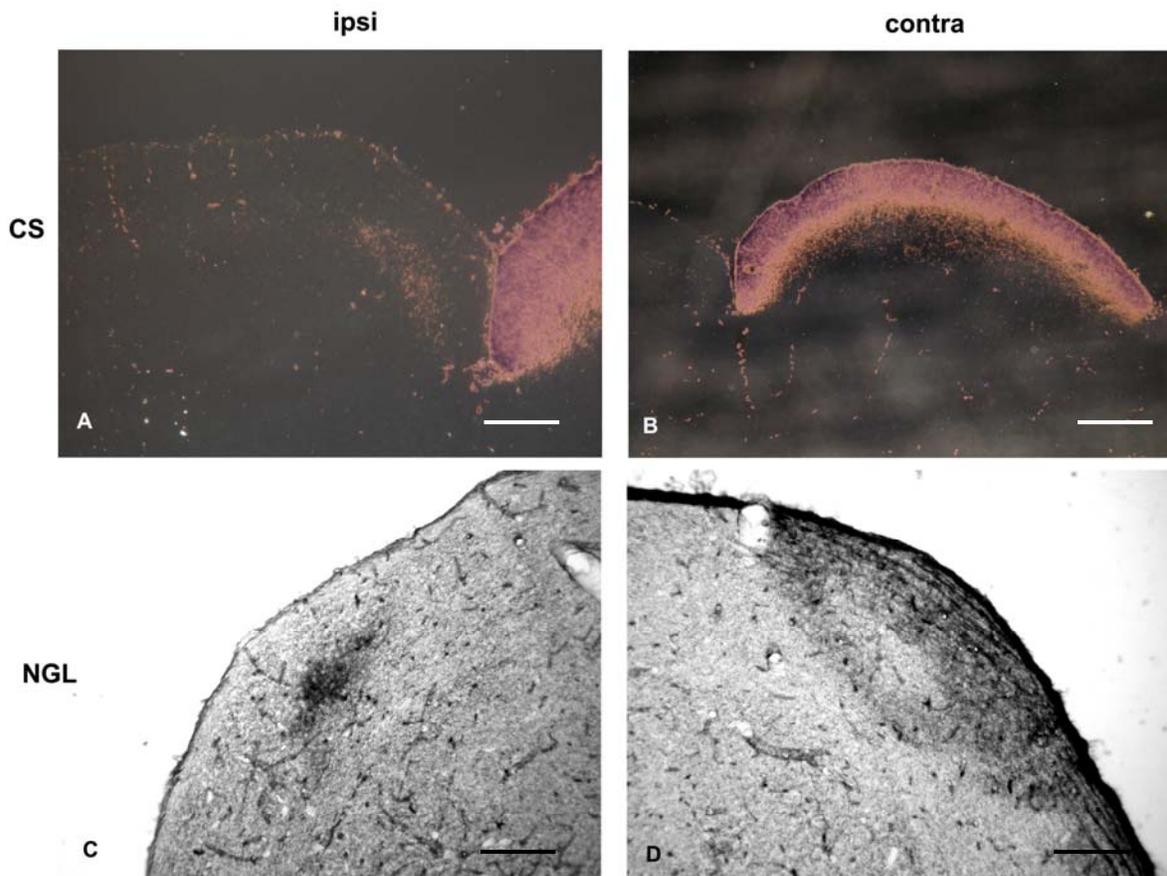


Figura 18 – Marcação por HRP das projeções retino-coliculares e retino-talâmicas. Os animais foram monocularmente injetados com HRP e 24h depois, foram perfundidos com PFA 1% e glutaraldeído 1,25%. Os cérebros foram congelados e fatiados em um criostato em secções de 40 μ M. Para a revelação, foi utilizada solução do cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). No colículo superior, as fibras provenientes do olho ipsilateral encontram-se distribuídas em pequenos agrupamentos (A) enquanto as projeções contralaterais representam a maioria das aferências, ocupando a maior parte das camadas superiores (B). No NGL, as projeções ipsilaterais ocupam uma pequena região central (C), porém a maior parte deste núcleo recebe aferências do olho contralateral, que ocupam toda a porção externa do mesmo (D). Barras de escala = 100 μ M para A-D.

6. DISCUSSÃO

Para estudar o possível envolvimento de ERK e p38^{MAPK} no desenvolvimento da retina, colículo superior e córtex visual, foi analisada a fosforilação destas enzimas através da técnica de Western blot em diferentes idades entre P0 e P45. Como resumido na figura 19, nossos resultados indicam que a ativação de ERK e p38^{MAPK} é regulada nas três áreas visuais analisadas de uma maneira dinâmica. A correlação temporal entre esta regulação e eventos específicos da maturação da retina, colículo superior e córtex visual sugere um importante papel de ERK e p38^{MAPK} no desenvolvimento do sistema visual.

Os dados de ativação de MAPKs durante o desenvolvimento da retina mostram uma regulação distinta para as duas enzimas, p38^{MAPK} apresentando uma regulação bimodal, com um primeiro pico em P4 e um segundo aumento entre P15 e P45, enquanto ERK, de acordo com resultados prévios em camundongo (O'Driscoll et al., 2006), foi baixa de P0 a P9, e aumentou nas idades posteriores. Vários autores analisaram a expressão e fosforilação das MAPKs em estágios adultos. Por imunistoquímica, foi observado que tanto p38^{MAPK} quanto ERK estão presentes nas formas ativas/fosforiladas na retina adulta, e que elas estão diferencialmente distribuídas nas diferentes camadas da retina (Kikuchi *et al.*, 2000; Manabe e Lipton, 2003; Munemasa *et al.*, 2005).

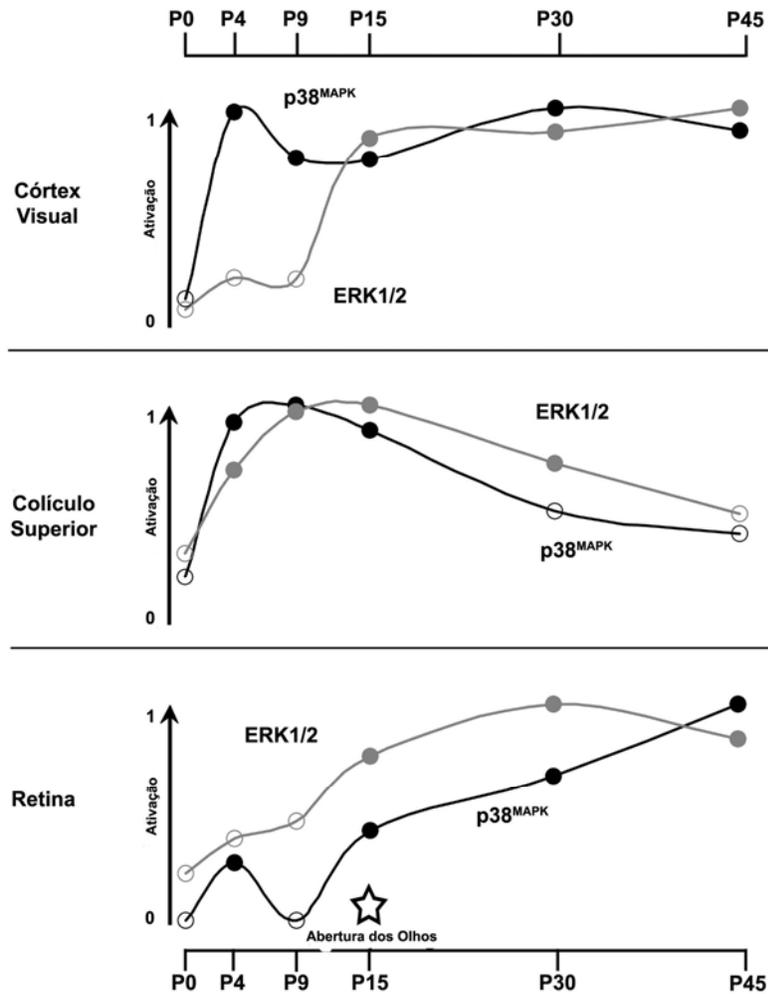


Figura 19 – A ativação de ERK1/2 e p38^{MAPK} é dinamicamente regulada no desenvolvimento do sistema visual de rato. A correlação temporal com eventos específicos da maturação da retina, colículo superior e córtex visual, sugere importante papéis para estas MAPKs no desenvolvimento do sistema visual. As curvas representam os dados apresentados na Figura 9 para retina, Figura 10 para o colículo superior e Figura 11 para o córtex visual. Os dados de cada gráfico foram normalizados com o respectivo valor máximo, expressos como nível de ativação (eixo y) em uma escala de tempo (eixo X). Para simplificar, foi feita a média dos valores de ERK1 e ERK2. Linhas cinzas representam a regulação da fosforilação de ERK1/2; linhas pretas representam a regulação da fosforilação de p38^{MAPK}. Círculos preenchidos foram utilizados para evidenciar os pontos estatisticamente diferentes de P0 (ANOVA de uma via, teste de Duncan, $p < 0,05$).

Apesar da identificação de uma sinalização aumentada tanto da via de p38^{MAPK} quanto de ERK na retina de rato durante o desenvolvimento pós-natal, ainda não é claro se as MAPKs contribuem para processos de maturação da retina, e se for o caso, para quais processos. Um dos papéis mais conhecidos das MAPKs é no controle da sobrevivência celular, que tem sido descrito em várias áreas cerebrais, incluindo a retina, após diversos tipos de insultos (Kikuchi *et al.*, 2000; Manabe e Lipton, 2003; Roth *et al.*, 2003; Munemasa *et al.*, 2005). Nossos resultados mostraram um pico de fosforilação de p38^{MAPK} em P4, que acontece em correlação temporal com um dos principais processos do desenvolvimento da retina, o processo de morte celular programada (Galli-Resta e Ensini, 1996; Vecino *et al.*, 2004; Linden *et al.*, 2005). Portanto, pode-se especular que a via de p38^{MAPK} pode estar regulando diretamente esses processos de morte espontânea na retina.

A fosforilação de ambas, ERK e p38^{MAPK} está significativamente aumentada na retina de rato em P15. Em ratos, esse dia corresponde a abertura dos olhos, o que determina um aumento súbito de atividade elétrica, que por sua vez, pode induzir a ativação das MAPKs. A dependência da fosforilação de ERK da atividade elétrica é bem conhecida no córtex, mas também ocorre na retina, onde o bloqueio da atividade espontânea completamente bloqueia a ativação de ERK (Naska *et al.*, 2004). Ao contrário, não há dados disponíveis sobre os efeitos da atividade elétrica na ativação de p38^{MAPK} na retina. Nossas observações

sugerem que a fosforilação de ambas MAPKs na retina em P15 pode estar sendo induzida pelo aumento da atividade elétrica devido a abertura dos olhos.

No entanto, não se pode excluir outros possíveis fatores além da atividade elétrica, ou conseqüentes desta, que podem contribuir para a ativação das MAPKS aqui observadas. De fato, diversos estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, citocinas, entre outros, que também são regulados durante o desenvolvimento do sistema visual, podem ativar as MAPKS (Chang e Karin, 2001; Pearson et al., 2001; Sweatt, 2001). Um exemplo particularmente interessante é representado pelo BDNF. Esta molécula está claramente envolvida na via de ativação de ERK (Cavanaugh et al., 2001; Barnabé-Heider e Miller, 2003; Igaz et al., 2006; Ratto e Pizzorusso, 2006), e é expressa de uma maneira espaço-temporal peculiar no sistema visual, sendo dependente de atividade elétrica (Castren et al., 1992; Bozzi et al., 1995; Rossi et al., 1999) e possui um papel crucial nos processos plásticos (Huang et al., 1999; Hanover et al., 1999; Gianfranceschi et al., 2003). Portanto, as relações entre este e outros estímulos extracelulares com a ativação das MAPKS merecem mais investigações.

No colículo superior de rato a ativação de ambas, ERK e p38^{MAPK}, foi regulada de uma maneira semelhante durante o desenvolvimento, apresentando níveis relativamente baixos em P0, um aumento entre P4 e P15, e um decréscimo nas idades mais tardias. Esta é a primeira descrição da regulação de MAPKS no colículo superior de rato durante o desenvolvimento. Uma regulação similar de ERK foi descrita em outro importante núcleo visual, o NGL (Naska *et al.*, 2004). Experimentos de bloqueio in vivo demonstram claramente o envolvimento de ERK na formação de domínios olho-específicos no geniculado

(Naska *et al.*, 2004) Portanto, como a regulação da ativação de ERK e p38^{MAPK} no colículo superior está correlacionada com o período de segregação das projeções retino-coliculares (Land e Lund 1979; Fawcett *et al.*, 1984; Godement *et al.*, 1984), é provável que essas vias tenham um importante papel nos processos plásticos também no colículo. Esta sugestão está de acordo com recentes observações de que, não só a via de ERK, mas também a de p38^{MAPK}, são parte de uma cascata de sinalização levando ao crescimento e guiando axônios na retina (Campbell e Holt, 2003; Chierzi *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2005). Além disso, não podemos excluir a participação das MAPKs também em outros eventos importantes do desenvolvimento, como por exemplo, o processo de morte espontânea no colículo. Células em processo de morte tem sido observada nas camadas ópticas do colículo superior de rato durante as duas primeiras semanas pós-natais, com densidade máxima em P6 (Giordano *et al.*, 1980; Galli-Resta *et al.*, 1993), em coincidência com o aumento da ativação das MAPKs observado neste trabalho.

No córtex visual de rato, a ativação de ERK e p38^{MAPK} foi regulada de maneira diferente durante o desenvolvimento. De acordo com o encontrado por outros autores (Cancedda *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004), a fosforilação de ERK foi baixa de P0 a P9, e aumentou entre P15 e P45. O aumento detectado em P15, dia da abertura dos olhos, indica uma provável regulação pelo aumento da atividade elétrica. De fato, sabe-se que ERK no córtex visual é potentemente modulada por manipulações da experiência visual (Kaminska *et al.*, 1999; Di Cristo *et al.*, 2001; Cancedda *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004; Putignano *et al.*, 2007). O aumento da fosforilação de ERK entre P15 e P45 ocorre em correlação

temporal com o período crítico de plasticidade cortical. De fato, já foi demonstrado que o bloqueio específico da via de ERK suprime a indução de potenciação de longo prazo em fatias corticais de rato *in vitro* e bloqueia a plasticidade induzida por deprivação monocular *in vivo* (Di Cristo *et al.*, 2001).

Muito pouco se sabe a respeito da regulação da via de p38^{MAPK} e do seu papel no desenvolvimento do córtex visual. Aqui, pela primeira vez, nós mostramos um estudo detalhado indicando que a fosforilação cortical de p38^{MAPK} é baixa em P0, aumenta em P4 e permanece elevada até P45. Assim como ERK, p38^{MAPK} também está ativada durante o período crítico da plasticidade do córtex visual (P15-P45), sugerindo um possível envolvimento também para esta cinase nos processos plásticos. No entanto, existem estudos controversos a esse respeito. Bloqueando a via de p38^{MAPK} no córtex visual em desenvolvimento não bloqueia a plasticidade induzida por deprivação monocular (Di Cristo *et al.*, 2001), o que sugere que esta via não está envolvida na neuroplasticidade. Porém um estudo recente mostrou que p38^{MAPK} está envolvida em uma forma diferente de plasticidade sináptica no córtex visual de camundongo, a depressão de longo prazo induzida por anisomicina (Xiong *et al.*, 2006).

A via de p38^{MAPK} pode também estar regulando outros eventos do desenvolvimento do córtex visual. Um deles pode ser o processo de morte espontânea, que é particularmente alto nesta região durante as primeiras duas semanas (Nuñez *et al.*, 2000; Nuñez *et al.*, 2001), em correlação com o aumento da fosforilação de p38^{MAPK} mostrado neste trabalho.

Em resumo, os resultados mostram uma regulação dinâmica da ativação de ERK e p38^{MAPK} no sistema visual de rato em desenvolvimento, e sugere que

estas enzimas estão envolvidas na regulação de processos específicos da maturação deste sistema.

Os mecanismos através dos quais as vias de sinalização podem estar interferindo com o desenvolvimento e plasticidade do sistema visual ainda são desconhecidos, mas provavelmente elas são convertidas em mudanças duradouras, envolvendo alterações ao nível de síntese protéica e transcrição gênica. Um possível alvo molecular das vias de transdução de sinal que estão ativas durante o desenvolvimento do sistema visual é o fator de transcrição CREB (Phan et al., 1999; Canceda et al, 2003; Mower et al., 2002; Lalonde e Chauduri, 2007).

A regulação da expressão gênica por CREB é importante para a plasticidade em várias estruturas cerebrais (Silva et al., 1998). Em particular, a introdução de uma forma dominante negativa de CREB em neurônios do córtex visual bloqueia o efeito da deprivação monocular (Mower et al., 2002), sugerindo que os rearranjos plásticos induzidos pela deprivação monocular requerem a ação de CREB. Além disso, Pham e colaboradores, 1999, mostraram que a expressão gênica mediada por CRE está ativada no córtex visual de camundongos monocularmente privados, sugerindo um papel importante de CREB no período crítico de plasticidade no córtex. Canceda e colaboradores, 2003, demonstraram a ativação da expressão gênica mediada por CRE após estímulo visual, e que essa ativação foi dependente da via de ERK.

Além disso, não só no córtex visual, mas também no núcleo geniculado lateral já foi demonstrada a importância da via de CREB no refinamento das projeções retino-talâmicas (Pham et al., 2001).

Porém, nada se sabe sobre a regulação de CREB e fosfo-CREB durante o desenvolvimento do colículo superior. Já que nós observamos uma ativação das MAPKs neste núcleo durante o período crítico do desenvolvimento, e sabendo que CREB tem um papel importante no desenvolvimento e plasticidade de outras regiões visuais, foi analisada a expressão e ativação de CREB durante o desenvolvimento pós-natal do colículo superior.

Os resultados demonstraram que a expressão de CREB é baixa a P0, aumenta de P4 a P9, retornando a níveis mais baixos na segunda semana do desenvolvimento (Figura 12A e C). A presença de fosfo-CREB seguiu o mesmo padrão, estando baixa a P0, aumentando entre P4 e P9, e voltando a diminuir de P15 até P45 (Figura 12A e B), o que indica que talvez as alterações observadas para a forma fosforilada de CREB estejam refletindo as mudanças do nível total da proteína. Esses resultados corroboram os dados já descritos no NGL, no qual foi demonstrado por imunistoquímica que a imunoreatividade de CREB e de fosfo-CREB aumenta durante a primeira semana do desenvolvimento e volta a cair a P20 (Pham et al., 2001), sugerindo fortemente, que assim como no geniculado, CREB teria também um importante papel no desenvolvimento e plasticidade do colículo superior.

Além da caracterização da expressão das MAPKs e de CREB durante o desenvolvimento por Western Blot, é interessante a utilização de uma técnica que permita o acesso a detalhes histológicos da localização celular dessas enzimas. Tendo isso em vista, foi padronizada a técnica da imunistoquímica no laboratório, para a detecção e localização das formas ativadas e totais das MAPKs e de CREB nas diferentes regiões do cérebro.

Uma das dificuldades encontradas no uso da técnica de imunistoquímica em estudos fisiológicos como este é que os níveis endógenos de fosforilação das MAPKs são relativamente baixos, e muitas vezes, abaixo do limiar de detecção por imunistoquímica, talvez devido aos tratamentos do tecido necessários para esta técnica, ou pela menor sensibilidade desta quando comparada com Western Blot.

Apesar destas dificuldades, neste estudo, nós detectamos sinal de fosfo-ERK em grandes neurônios no córtex e no hipocampo (Figura 13). Já o sinal para fosfo-p38^{MAPK} estava presente em células menores, por todo o cérebro, podendo se tratar de interneurônios, ou células gliais, por exemplo. (Figura 15).

A retina consiste numa área interessante para se caracterizar a localização das MAPKs, já que os diferentes tipos celulares são facilmente identificados e estão distribuídos em camadas distintas. Tendo isso em vista, foram realizados experimentos de imunistoquímica em cortes do olho nos quais podem se identificar as diferentes camadas da retina (Figura 14).

A idade escolhida para análise de fosfo-ERK foi P15, por ser uma idade na qual o sinal detectado por Western blot foi bastante evidente. Nesta idade, foi observado um sinal para fosfo-ERK nas células ganglionares da retina (CGR) (Figura 14A). Quanto a p38^{MAPK}, foram testadas as idades de P4 e P15, que foram os períodos nos quais foi detectado o nível de ativação mais alto pela técnica de Western Blot. Ao contrário, por imunistoquímica, nenhum sinal foi detectado em ambos os casos (dados não mostrados). A ausência de detecção da forma fosforilada basal de p38^{MAPK} já era esperada, e está de acordo com outros trabalhos anteriores, que também não detectaram ativação de p38^{MAPK} na

ausência de estímulo externo (Munemasa et al., 2005; Inomata et al., 2006; Levkovitch-Verbin et al., 2007).

Para CREB e fosfo-CREB, células marcadas foram observadas por todo o cérebro, principalmente no giro denteado do hipocampo (Figura 16A, D-F), mas também no córtex visual se observam as células distribuídas em camadas características dessa região (Figura 16B e C).

Na tentativa de fazer uma comparação com os experimentos de western blot, foi realizada uma quantificação da marcação de CREB no colículo superior de rato em duas diferentes idades, P4 e P15. Diferentemente dos resultados obtidos para western blot, esses resultados preliminares não mostraram diferença na quantidade de células marcadas entre as duas idades (Figura 17). Essa diferença de resultados encontrada entre as técnicas utilizadas também foi encontrada por outros autores (Pham et al., 2001) e pode ser explicada pelo fato de que no western blot, há uma normalização em relação à quantidade total de proteína da amostra, enquanto na imunohistquímica os resultados mostram a expressão absoluta de CREB presente nas secções histológicas. Além disso, as conformações protéicas e interações proteína-proteína são preservadas na imunistoquímica com as fatias fixadas, enquanto durante o processamento para o western blot elas são perdidas (Pham et al., 2001).

Em resumo, os resultados mostraram uma modulação das MAPKs e de CREB durante os períodos críticos do desenvolvimento do Sistema Visual, o que sugere um papel dessas proteínas nos processos de maturação desse sistema.

No entanto, para se confirmar o papel dessas enzimas na formação das projeções retino-coliculares e retino-talâmicas, seriam necessários estudos mais

específicos de plasticidade, utilizando-se técnicas de traçado neuronal, que permitem medir o grau de segregação das projeções da retina no colículo e no tálamo em situações normais ou após manipulações experimentais. Para permitir esse tipo de estudo futuro, foi padronizada no laboratório a técnica de traçado neuronal utilizando peroxidase de rábano silvestre (HRP).

Através da injeção monocular da peroxidase, e da revelação com o cromógeno TMB, foi possível observar, no colículo superior, os axônios provenientes do olho contralateral, ocupando a maior parte das camadas superiores deste núcleo (Figura 18B), e a distribuição típica das fibras ipsilaterais formando agrupamentos (Figura 18A) que variam ao longo do eixo rostro-caudal.

No NGL, também conseguimos detectar a distribuição dos territórios específicos de cada olho, sendo que na porção contralateral é onde termina a maioria das fibras provenientes da retina, ocupando toda a área externa desse núcleo (Figura 18D), enquanto as projeções ipsilaterais ocupam uma pequena região central (Figura 18C).

Tendo detectado essas distribuições características do sistema visual maduro, é possível agora realizar estudos de manipulação in vivo, dentro e fora do período crítico, e analisar o efeito destas na plasticidade do sistema visual.

7. CONCLUSÕES

→ Na retina, há um pico de ativação de p38^{MAPK}, em coincidência com o pico de morte celular programada. A partir de P15, com a abertura dos olhos e aumento da atividade elétrica, tanto ERK quanto p38^{MAPK} apresentam um aumento na fosforilação.

→ No colículo superior, tanto a fosforilação das MAPKs quanto a presença de CREB e fosfo-CREB encontram-se aumentadas até a segunda semana do desenvolvimento, que corresponde ao período crítico da plasticidade retinocolicular.

→ No córtex visual, a fosforilação de ERK aumenta de P15 a P45, em coincidência com o período de plasticidade cortical, enquanto P38^{MAPK} aumenta a partir de P4.

8. PERSPECTIVAS

→ Determinar detalhes histológicos da localização celular de ERK1/2 e p38^{MAPK} no desenvolvimento sistema visual (córtex visual, colículo superior, núcleo geniculado lateral e retina), através de imunoistoquímica.

→ Avaliar o papel de ERK1/2 e p38^{MAPK} na plasticidade visual ao nível do tálamo e do colículo superior através do uso de inibidores específicos dessa via e da técnica de traçado neuronal.

→ Avaliar a modulação do fator de transcrição CREB no desenvolvimento do colículo superior através das técnicas de Western Blot e Imunoistoquímica, para confirmar os dados preliminares apresentados neste estudo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2001). *Neuroscience: Exploring the brain*. Baltimore, MD: Lippincott, Williams, & Wilkins
- Barnabe-Heider F, Miller FD (2003) Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci* 23:5149-60
- Bence M, Levelt CN (2005) Structural plasticity in the developing visual system. *Prog Brain Res* 147:125-39
- Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (2000) Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol* 10:138-45
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L (2003) Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci* 26:369-78
- Bolshakov VY, Carboni L, Cobb MH, Siegelbaum SA, Belardetti F (2000) Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci* 3:1107-12
- Bourtchuladze R, Frenquelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ (1994) Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79:59-68
- Bozzi Y, Pizzorusso T, Cremisi F, Rossi FM, Barsacchi G, Maffei L (1995) Monocular deprivation decreases the expression of messenger RNA for brain-derived neurotrophic factor in the rat visual cortex. *Neuroscience* 69:1133-44

- Cabelli RJ, Hohn A, Shatz CJ (1995) Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science* 267:1662-6
- Campbell DS, Holt CE (2003) Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron* 37:939-52
- Cancedda L, Putignano E, Impey S, Maffei L, Ratto GM, Pizzorusso T (2003) Patterned vision causes CRE-mediated gene expression in the visual cortex through PKA and ERK. *J Neurosci* 23:7012-20
- Castren E, Zafra F, Thoenen H, Lindholm D (1992) Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9444-8
- Cavanaugh JE, Ham J, Hetman M, Poser S, Yan C, Xia Z (2001) Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J Neurosci* 21:434-43
- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101:2449-76
- Chierzi S, Ratto GM, Verma P, Fawcett JW (2005) The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur J Neurosci* 21:2051-62
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855-9

- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DD, Stanfield BB (1984) Regressive events in neurogenesis. *Science* 225:1258-65
- Di Cristo G, Berardi N, Cancedda L, Pizzorusso T, Putignano E, Ratto GM, Maffei L (2001) Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* 292:2337-40
- English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH (1999) New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253:255-70
- Fawcett JW, O'Leary DD, Cowan WM (1984) Activity and the control of ganglion cell death in the rat retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:5589-93
- Feller MB (2002) The role of nAChR-mediated spontaneous retinal activity in visual system development. *J Neurobiol* 53:556-67
- Fox K, Wong RO (2005) A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems. *Neuron* 48:465-77
- Galli-Resta L, Ensini M (1996) An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *J Neurosci* 16:2318-24
- Galli-Resta L, Ensini M, Fusco E, Gravina A, Margheritti B (1993) Afferent spontaneous electrical activity promotes the survival of target cells in the developing retinotectal system of the rat. *J Neurosci* 13:243-50
- Gianfranceschi L, Siciliano R, Walls J, Morales B, Kirkwood A, Huang ZJ, Tonegawa S, Maffei L (2003) Visual cortex is rescued from the effects of dark rearing by overexpression of BDNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12486-91

- Giordano DL, Murray M, Cunningham TJ (1980) Naturally occurring neuron death in the optic layers of superior colliculus of the postnatal rat. *J Neurocytol* 9:603-14
- Godement P, Salaun J, Imbert M (1984) Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol* 230:552-75
- Hahm JO, Cramer KS, Sur M (1999) Pattern formation by retinal afferents in the ferret lateral geniculate nucleus: developmental segregation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Comp Neurol* 411:327-45
- Hanover JL, Huang ZJ, Tonegawa S, Stryker MP (1999) Brain-derived neurotrophic factor overexpression induces precocious critical period in mouse visual cortex. *J Neurosci* 19:RC40
- Hensch TK (2005) Critical period mechanisms in developing visual cortex. *Curr Top Dev Biol* 69:215-37
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98:739-55
- Hubel DH, Wiesel TN (1998) Early exploration of the visual cortex. *Neuron* 20:401-12
- Igaz LM, Winograd M, Cammarota M, Izquierdo LA, Alonso M, Izquierdo I, Medina JH (2006) Early activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in the hippocampus is required for short-term memory formation of a fear-motivated learning. *Cell Mol Neurobiol* 26:989-1002

- Inomata Y, Nakamura H, Tanito M, Teratani A, Kawaji T, Kondo N, Yodoi J, Tanihara H (2006) Thioredoxin inhibits NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *J Neurochem* 98:372-85
- Kaminska B, Kaczmarek L, Zangenehpour S, Chaudhuri A (1999) Rapid phosphorylation of Elk-1 transcription factor and activation of MAP kinase signal transduction pathways in response to visual stimulation. *Mol Cell Neurosci* 13:405-14
- Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. (2002) *Princípios da Neurociência*. 4ª. Edição, Manole, São Paulo. ISBN: 85-204-1281-5
- Katz LC, Crowley JC (2002) Development of cortical circuits: lessons from ocular dominance columns. *Nat Rev Neurosci* 3:34-42
- Kawasaki H, Fujii H, Gotoh Y, Morooka T, Shimohama S, Nishida E, Hirano T (1999) Requirement for mitogen-activated protein kinase in cerebellar long term depression. *J Biol Chem* 274:13498-502
- Kikuchi M, Tenneti L, Lipton SA (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20:5037-44
- Kyriakis JM, Avruch J (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* 271:24313-6
- Lalonde J, Chaudhuri A (2007) Dynamic changes in CREB phosphorylation and neuroadaptive gene expression in area V1 of adult monkeys after monocular enucleation. *Mol Cell Neurosci* 35:24-37
- Land PW, Lund RD (1979) Development of the rat's uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies. *Science* 205:698-700

- Land PW, Shamalla-Hannah L (2001) Transient expression of synaptic zinc during development of uncrossed retinogeniculate projections. *J Comp Neurol* 433:515-25
- Levkovitch-Verbin H, Harizman N, Dardik R, Nisgav Y, Vander S, Melamed S (2007) Regulation of cell death and survival pathways in experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 85:250-8
- Linden DC, Guillery RW, Cucchiaro J (1981) The dorsal lateral geniculate nucleus of the normal ferret and its postnatal development. *J Comp Neurol* 203:189-211
- Linden R, Martins RA, Silveira MS (2005) Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 24:457-91
- Manabe S, Lipton SA (2003) Divergent NMDA signals leading to proapoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:385-92
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599-609
- Mower AF, Liao DS, Nestler EJ, Neve RL, Ramoa AS (2002) cAMP/Ca²⁺ response element-binding protein function is essential for ocular dominance plasticity. *J Neurosci* 22:2237-45
- Munemasa Y, Ohtani-Kaneko R, Kitaoka Y, Kuribayashi K, Isenoumi K, Kogo J, Yamashita K, Kumai T, Kobayashi S, Hirata K, Ueno S (2005) Contribution of mitogen-activated protein kinases to NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res* 1044:227-40

- Naska S, Cenni MC, Menna E, Maffei L (2004) ERK signaling is required for eye-specific retino-geniculate segregation. *Development* 131:3559-70
- Nunez JL, Jurgens HA, Juraska JM (2000) Androgens reduce cell death in the developing rat visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 125:83-8
- Nunez JL, Lauschke DM, Juraska JM (2001) Cell death in the development of the posterior cortex in male and female rats. *J Comp Neurol* 436:32-41
- O'Driscoll C, Donovan M, Cotter TG (2006) Analysis of apoptotic and survival mediators in the early post-natal and mature retina. *Exp Eye Res* 83:1482-92
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453-501
- Orban PC, Chapman PF, Brambilla R (1999) Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation? *Trends Neurosci* 22:38-44
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-83
- Penn AA, Riquelme PA, Feller MB, Shatz CJ (1998) Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. *Science* 279:2108-12
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-56
- Pham TA, Impey S, Storm DR, Stryker MP (1999) CRE-mediated gene transcription in neocortical neuronal plasticity during the developmental critical period. *Neuron* 22:63-72

- Pham TA, Rubenstein JL, Silva AJ, Storm DR, Stryker MP (2001) The CRE/CREB pathway is transiently expressed in thalamic circuit development and contributes to refinement of retinogeniculate axons. *Neuron* 31:409-20
- Putignano E, Lonetti G, Cancedda L, Ratto G, Costa M, Maffei L, Pizzorusso T (2007) Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron* 53:747-59
- Ratto GM, Pizzorusso T (2006) A kinase with a vision: Role of ERK in the synaptic plasticity of the visual cortex. *Adv Exp Med Biol* 557:122-32
- Rossi FM, Bozzi Y, Pizzorusso T, Maffei L (1999) Monocular deprivation decreases brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the rat visual cortex. *Neuroscience* 90:363-8
- Rossi FM, Pizzorusso T, Porciatti V, Marubio LM, Maffei L, Changeux JP (2001) Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6453-8
- Roth S, Shaikh AR, Hennelly MM, Li Q, Bindokas V, Graham CE (2003) Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5383-95
- Shatz CJ, Stryker MP (1988) Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents. *Science* 242:87-9
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-48

- Sretavan DW, Shatz CJ (1986) Prenatal development of retinal ganglion cell axons: segregation into eye-specific layers within the cat's lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* 6:234-51
- Suzuki S, al-Noori S, Butt SA, Pham TA (2004) Regulation of the CREB signaling cascade in the visual cortex by visual experience and neuronal activity. *J Comp Neurol* 479:70-83
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76:1-10
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311-7
- Taha S, Stryker MP (2002) Rapid ocular dominance plasticity requires cortical but not geniculate protein synthesis. *Neuron* 34:425-36
- Takeda K, Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7:1099-111
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-83
- Vecino E, Hernandez M, Garcia M (2004) Cell death in the developing vertebrate retina. *Int J Dev Biol* 48:965-74
- Verma P, Chierzi S, Codd AM, Campbell DS, Meyer RL, Holt CE, Fawcett JW (2005) Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J Neurosci* 25:331-42
- Wiesel TN (1982) Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature* 299:583-91

- Wiesel TN, Hubel DH (1965) Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J Neurophysiol* 28:1029-40
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-31
- Xiong W, Kojic LZ, Zhang L, Prasad SS, Douglas R, Wang Y, Cynader MS (2006) Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res* 1085:68-76
- Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH, 3rd, Montminy MR (1988) Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334:494-8
- Zhen X, Du W, Romano AG, Friedman E, Harvey JA (2001) The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in associative learning in rabbits. *J Neurosci* 21:5513-9
- Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110:443-55

ANEXO



The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system

Camila Salum Oliveira, Ana Paula Rigon, Rodrigo Bainy Leal*,
Francesco Mattia Rossi*

Laboratório de Neuroquímica-3, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

Received 27 September 2007; received in revised form 11 December 2007; accepted 12 December 2007

Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are serine/threonine kinases that play an instrumental role in signal transduction from the cell surface to the nucleus. These enzymes are major intracellular mediators of developmental events and recently have been shown to control also synaptic plasticity processes [Sweatt, J.D., 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 311–317; Thomas, G.M., Huganir, R.L., 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173–183]. Mammalian members of this family are extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2), c-Jun amino-terminal kinases or stress-activated protein kinases (JNK/SAPKs) and p38 kinases (p38^{MAPK}). At the level of the visual system, it has been demonstrated that the ERK pathway regulates developmental plastic processes at both retino-thalamic and thalamo-cortical level and that p38^{MAPK} controls a peculiar form of long-term depression in the visual cortex [Di Cristo, G., Berardi, N., Cancedda, L., Pizzorusso, T., Putignano, E., Ratto, G.M., Maffei, L., 2001. Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* 292, 2337–2340; Naska, S., Cenni, M.C., Menna, E., Maffei, L., 2004. ERK signaling is required for eye-specific retino-geniculate segregation. *Development* 131, 3559–3570; Xiong, W., Kojic, L.Z., Zhang, L., Prasad, S.S., Douglas, R., Wang, Y., Cynader, M.S., 2006. Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res.* 1085, 68–76]. Here, as a first approach to gain more insight on the role of two MAPKs – ERK1/2 and p38^{MAPK} – in visual system maturation, we characterized by western blot the regulation of their phosphorylation/activation in rat retina, superior colliculus and visual cortex, during postnatal development from birth to adult age. Our main results show that: (i) in the retina p38^{MAPK} activation peaks at P4, and then, from P15 to P45, both ERK1/2 and p38^{MAPK} phosphorylation increases; (ii) in the superior colliculus phosphorylation of both MAPKs increases between P4 and P15; (iii) in the visual cortex ERK1/2 phosphorylation increases from P15 to P45, while phosphorylation of p38^{MAPK} increases starting from P4. The present data demonstrate a distinct regulation of the activation of ERK1/2 and p38^{MAPK} in the three visual areas analyzed which occurs in temporal correlation with critical events for visual system maturation. These results suggest an important role for ERK1/2 and p38^{MAPK} in the postnatal development of the rat visual system.

© 2007 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Development; Retina; Superior colliculus; Visual cortex; Phosphorylation

Abbreviations: dLGN, dorso-lateral geniculate nucleus; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1/2; INTOD, integrated optical density; JNK/SAPK, c-Jun amino-terminal kinases or stress-activated protein kinases; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; p38 kinase, p38^{MAPK}; P, postnatal day.

* Corresponding authors. Tel.: +55 48 3721 5045; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail addresses: bainyle@mbox1.ufsc.br (R.B. Leal),
fmrossi@ccb.ufsc.br (F.M. Rossi).

The mammalian visual system is characterized by a high level of spatial specificity in that axons emerging from neighboring retinal ganglion cells specifically innervate neighboring neurons in the dorso-lateral geniculate nucleus (dLGN) of the thalamus and in the superior colliculus. Retinal projections from the two eyes are initially mixed in these targets during early phases of development, but then, through a process of selection and retraction, they will form eye-specific territories. In turn, projections from the dLGN to the primary visual cortex will segregate into ocular dominance

columns. This remarkable specificity of connections is, in part, obtained through an initial overproduction of neurons and synapses that are then selectively eliminated during critical periods of development (Cowan et al., 1984; Oppenheim, 1991).

It is well known that electrical activity and neurotrophic factors of the Nerve Growth Factor family play a fundamental role in visual system development (Katz and Shatz, 1996; McAllister et al., 1999; Berardi et al., 2003). However, how neurons sense these converging inputs and react to modify their function and structure is still relatively unknown. In recent years many studies have tried to identify the intracellular signaling cascades mediating these processes. Among others, the pathway of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) resulted to be a predominant player in many physiological aspects. Mammalian MAPKs include extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), c-Jun amino-terminal kinases or stress-activated protein kinases (JNK/SAPKs) and p38 kinases (p38^{MAPK}). These enzymes are serine/threonine kinases that become functional upon phosphorylation at both a threonine and a tyrosine residue by an upstream MAPK (English et al., 1999; Chang and Karin, 2001; Chen et al., 2001). MAPKs have been initially identified as enzymes controlling both proliferation and differentiation. These enzymes also control cell survival, with, by and large, ERK1/2 activation playing a protective role, while activation of JNK/SAPK and p38^{MAPK} is linked to induction of apoptosis (Xia et al., 1995; Takeda and Ichijo, 2002). More recently, it has been shown that ERK1/2 and p38^{MAPK} play a fundamental role also in synaptic plasticity processes in the hippocampus and in the visual system (Sweatt, 2004; Thomas and Huganir, 2004). Here, the ERK pathway is required for structural and functional plasticity during the development of the visual retino-thalamo-cortical pathway and p38^{MAPK} activation has been linked to long-term depression at cortical level (Di Cristo et al., 2001; Naska et al., 2004; Xiong et al., 2006). Notwithstanding this information, very little is known on the role played by ERK1/2 in other visual structures and almost no information is available on p38^{MAPK}. In the present study, we contribute to deciphering the role of ERK1/2 and p38^{MAPK} in rat visual system development by analyzing the regulation of their phosphorylation/activation. Our results demonstrate that the activation of ERK1/2 and p38^{MAPK} is dynamically regulated during the development of the visual system. Moreover, the temporal correlation of MAPKs activation with critical periods for programmed cell death and axonal remodeling suggests an important role for these enzymes in specific events of visual system development.

1. Experimental procedures

1.1. Animals

For the present study $n = 54$ Long–Evans hooded rats from the animal house of the Federal University of Santa Catarina, Brazil, of different ages (postnatal day P0, 4, 9, 15, 30, 45) were used. Experiments were performed following approval of the Institutional Ethics Committee.

1.2. Western blot

Animals were killed at the same time of the day (between 8:00 and 10:00 a.m.) by decapitation and brains rapidly removed in saline solution (NaCl 0.9%) on ice. Brain areas of interest (retina, superior colliculus and visual cortex) were rapidly dissected under a stereoscopic microscope and proteins extracted according to Rossi et al. (2002). Briefly, samples were mechanically homogenized in 100–150 μ l of Tris–base 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0.1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glycerol 10%, and then incubated for 30 min in ice. Lysates were centrifuged (10000 \times g for 1 h, at 4 °C) to eliminate cellular debris, and supernatants diluted 1/1 (v/v) in Tris–base 100 mM pH 6.8, EDTA 4 mM, SDS 8%, glycerol 16%. Protein content was estimated with the method described in Peterson (1977) at 750 nm wavelength and concentration calculated by a pattern curve with bovine serum albumin. To compare signals obtained at different postnatal ages, the same amount of protein (70 μ g per lane) for each sample was electrophoresed in 10% SDS–PAGE minigels (after addition of bromophenol blue 0.2% and β -mercaptoethanol 8%) and transferred to nitro-cellulose membranes (Amersham). To verify transfer efficiency process, gels were stained with Coomassie blue (Coomassie blue R-250 0.1%, methanol 50%, acetic acid 7%) and membranes with Ponceau 0.5% in acetic acid 1%.

The same membrane was processed in three sequential steps, accordingly to Cordova et al. (2004): (i) incubation with antibody against the phosphorylated form of the enzyme (phospho-p38^{MAPK} or phospho-ERK1/2); (ii) antibody against the total form of the enzyme (p38^{MAPK} or ERK1/2); (iii) antibody against a housekeeping protein (β -actin). In between each step membranes were stripped to eliminate residues of the previous process and then re-probed.

In detail, blots were incubated in a blocking solution (5% non-fat dry milk in Tris buffer saline solution, TBS) for 1 h at RT and then probed *o/n* at 4 °C with anti-phospho-ERK1/2 (Sigma, 1:10000) or anti-phospho-p38^{MAPK} (Cell Signaling or Calbiochem 1:1000) primary antibodies in TBS containing 0.05% Tween 20 (TBST). Following several washes in TBST, blots were incubated with horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or -rabbit (Amersham 1:4000, for detection of anti-phospho-ERK1/2 or anti-phospho-p38^{MAPK}, respectively) secondary antibodies for 1 h at RT. Immunoreactive bands were visualized using enhanced chemiluminescence system (Amersham). Blots were then stripped with NaOH 0.2 M for 5 min, abundantly washed in TBST and re-probed with anti-total-ERK1/2 (Sigma, 1:40000) or anti-total-p38^{MAPK} (Sigma, 1:10000) antibody. Following several washes, blots were incubated with HRP-conjugated anti-rabbit (Amersham, 1:4000) secondary antibodies for 1 h at RT and bands visualized as described above. Finally, following a second stripping step, membranes were incubated with rabbit anti- β -actin antibody (Cell Signaling, 1:1000) to verify that equal amounts of proteins were loaded on the gel, and the signal revealed as above.

The antibody against p38^{MAPK} detected a single band of approximately 38 kDa, while the antibody against ERK1/2 detected two bands, one at approximately 44 kDa and the second at approximately 42 kDa, corresponding respectively to the two ERK isoforms, ERK1 and ERK2. The anti- β -actin antibody detected a single band of approximately 45 kDa (data not shown).

1.3. Densitometric analysis, quantification and presentation of data

To assess semi-quantitatively the different signals obtained in Western blot analysis, several sheets of X-ray film were exposed to each blot for varying lengths of time (1 h for detection of phospho-p38^{MAPK} protein and 5–15 min for detection of the others). The bands of the developed films were quantified using the Scion Image[®] analysis system. A window size was chosen to include one band for each measurement. For each band, an index of the precipitated silver in the emulsion of the film was calculated by multiplying the mean optical density (OD) by the total area of the band (giving the integrated optical density, INTOD).

MAPKs are enzymes that become activated exclusively following double phosphorylation (English et al., 1999; Chang and Karin, 2001; Chen et al., 2001). Thus, the comparison between the amount of the enzyme in the phosphorylated state and the total amount of the enzyme is a representative index of MAPK activation. The ratio between the INTOD value obtained with the antibody against the phosphorylated form of each enzyme and the INTOD value obtained with the antibody against the corresponding total form was

calculated and plotted in graphs as a function of age. Quantification of β -actin signal in each membrane was exclusively used as an additional control that equal loading of protein was used in the gel.

For each of the three visual areas analyzed, at each age, $n = 8-11$ tissue samples were used. To control inter-experimental variability each western blot experiment was repeated 2-3 times. Data in the graphs are presented as mean \pm S.E.M.

1.4. Statistical analysis

Differences in MAPKs phosphorylation values among age groups were analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's *post hoc* test, with $p < 0.05$ as threshold for significant difference. As reported in Section 2, no significant differences were detected in the signal for the total forms of MAPKs and for β -actin during development. Statistical analysis performed on the phosphorylated form individually gave the same result as the analysis performed on the ratio.

2. Results

MAPKs are enzymes that require to be dually phosphorylated on a tyrosine and threonine residue in order to exert their signaling action (English et al., 1999; Chang and Karin, 2001; Chen et al., 2001). Thus, detection of the phosphorylated forms indicates that these signaling pathways are activated. The present experiments were performed by using a specific antibody that exclusively recognizes the bi-phosphorylated form (activated) of the enzyme, sequentially followed by a second antibody

recognizing the total form of the same enzyme. By making the ratio between the signals obtained with the first (phosphorylated form) and the second (total form) antibody we calculated the amount of activation for each enzyme (see Section 2).

As detailed below, the phosphorylation/activation of $p38^{\text{MAPK}}$ and ERK1/2 was analyzed by western blot in three rat visual areas (retina, superior colliculus and visual cortex) at different postnatal ages, ranging from P0 up to P45. No major changes were detected in the amount of total forms for both $p38^{\text{MAPK}}$ and ERK1/2 during the developmental period studied in the three visual areas analyzed.

2.1. Retina

Western blot analysis of $p38^{\text{MAPK}}$ activation in the rat retina revealed a bimodal regulation during postnatal development. The phosphorylation was extremely low (almost undetectable) at P0, suddenly increased at P4 to go back to low levels at P9. Then, $p38^{\text{MAPK}}$ phosphorylation increased again starting from P15 and gradually through P30 and P45 (Fig. 1A). Quantification by densitometry of these data showed that, when compared to P0 level, the phosphorylation of $p38^{\text{MAPK}}$ increased approximately 20 times at P4 and P15, 40 times at P30 and 60 times at P45 (Fig. 1C).

The phosphorylation of both ERK isoforms, ERK1 and ERK2, in the rat retina was relatively constant between P0 and

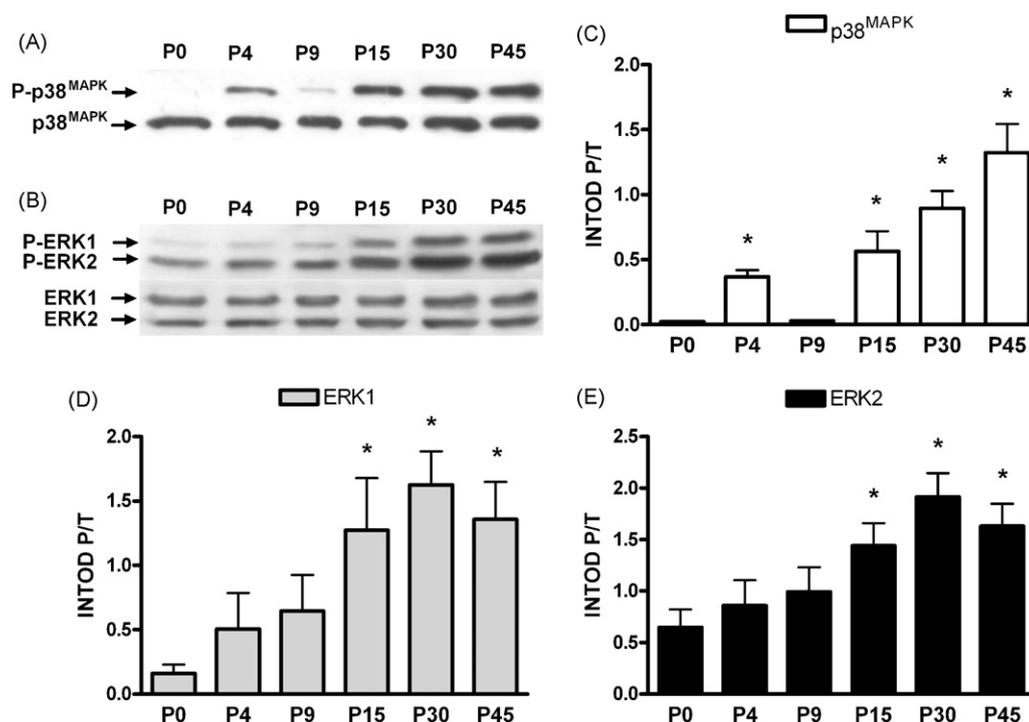


Fig. 1. The activation of $p38^{\text{MAPK}}$ and ERK1/2 is dynamically regulated in the rat retina during development. (A) Representative western blot of rat retina at different postnatal ages incubated with anti-phospho- $p38^{\text{MAPK}}$ antibody and successively with anti-total- $p38^{\text{MAPK}}$ antibody. (B) Representative western blot of rat retina at different postnatal ages incubated with anti-phospho-ERK1/2 antibody and successively with anti-total-ERK1/2 antibody. (C) Graph reports the INTOD values of the ratio between phospho- and total form of $p38^{\text{MAPK}}$ (INTOD P/T) signals detected in rat retina during development ($n = 11$). The phosphorylation of $p38^{\text{MAPK}}$ is low at P0, increases at P4 and then goes back to almost undetectable level at P9. It gradually increases again from P15 through P30 and P45. (D and E) Graph reports the INTOD values of the ratio between phospho- and total form of ERK1 and ERK2 (INTOD P/T) signals detected in rat retina during development ($n = 9$). The phosphorylation of both ERK1 and ERK2 is relatively low between P0 and P9, increases at P15, and is maintained at high level at later ages. * $p < 0.05$ when compared to P0 level. No statistically significant differences were detected in the amount of total forms for $p38^{\text{MAPK}}$ ($p = 0.38$), ERK1 ($p = 0.58$), and ERK2 ($p = 0.61$).

P9, increased at P15 and remained at similar level through P30 and P45 ages (Fig. 1B). Quantification of the results showed that ERK1 phosphorylation was low at P0 and the increase at P15 through P45 approximately 8–10 times, while the phosphorylation of ERK2 was already relatively high at P0 and increased only 2–3 times when compared to P0 levels (Fig. 1D and E).

2.2. Superior colliculus

Analysis of p38^{MAPK} and ERK1/2 phosphorylation in the superior colliculus of the rat revealed a “bell-shape” regulation during development. Considering p38^{MAPK}, its activation was low at P0, increased at P4 and remained at similar level through P9 and P15. It then moved back to lower level at P30 and P45 (Fig. 2A). Quantification of the data showed that the increase of p38^{MAPK} phosphorylation in the superior colliculus between P4 and P15 was 4 times the level detected at P0 (Fig. 2C).

The phosphorylation of ERK1 and ERK2 was regulated in a similar way to p38^{MAPK}. The phosphorylation was relatively low at P0, increased between P4 and P30, and decreased to lower level at P45 (Fig. 2B). Again, the phosphorylation of ERK1 was low at P0 and the increase at later ages 4–8 times, while ERK2 phosphorylation was relatively high at P0 and increased only 2 times when compared to P0 levels (Fig. 2D and E).

2.3. Visual cortex

Considering the developing visual cortex the activation of p38^{MAPK} was low at P0, increased at P4 and remained at high level at all later ages (Fig. 3A). The quantified data revealed that p38^{MAPK} phosphorylation increased approximately 6–7 times at P4 and later ages when compared to the signal obtained at P0 (Fig. 3C).

The developmental analysis of ERK1 and ERK2 phosphorylation in the rat visual cortex revealed that the signal was low between P0 and P9, and increased starting from P15 through P30 and P45 (Fig. 3B). The quantification of the results showed that ERK1 phosphorylation was low at P0 and increased at later ages 6 times, while the phosphorylation of ERK2 was very low at P0 and increased 30–40 times when compared to P0 values (Fig. 3D and E).

3. Discussion

In order to study a possible involvement of ERK1/2 and p38^{MAPK} signaling in the development of retina, superior colliculus and visual cortex, we analyzed their phosphorylation/activation with the western blot technique at different ages between P0 and P45. By means of this approach, for the first time, we report a detailed analysis of ERK1/2 and p38^{MAPK}

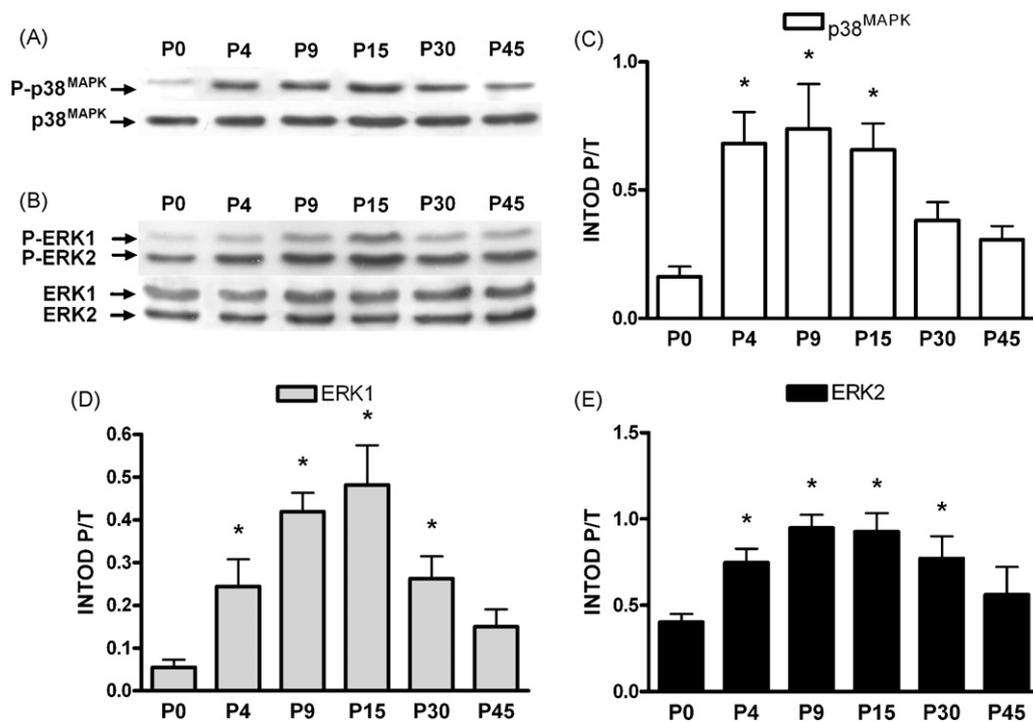


Fig. 2. The phosphorylation of p38^{MAPK} and ERK1/2 is regulated in a “bell-shape” way in the superior colliculus of the rat during development. (A) Representative western blot of rat superior colliculus at different postnatal ages incubated with anti-phospho-p38^{MAPK} antibody and successively with anti-total-p38^{MAPK} antibody. (B) Representative western blot of rat superior colliculus at different postnatal ages incubated with anti-phospho-ERK1/2 antibody and successively with anti-total-ERK1/2 antibody. (C) Graph reports the INTOD values of the ratio between phospho- and total form of p38^{MAPK} (INTOD P/T) signals detected in rat colliculus during development (n = 8). The phosphorylation of p38^{MAPK} is low at P0, increases through P4 to P15, and goes back to low level at later ages. (D and E) Graph reports the INTOD values of the ratio between phospho- and total form of ERK1 and ERK2 (INTOD P/T) signals detected in rat colliculus during development (n = 8). The phosphorylation of both ERK1 and ERK2 increases significantly between P4 and P30, and decreases to low level at P45. *p < 0.05 when compared to P0 level. No statistically significant differences were detected in the amount of total forms for p38^{MAPK} (p = 0.96), ERK1 (p = 0.68), and ERK2 (p = 0.98).

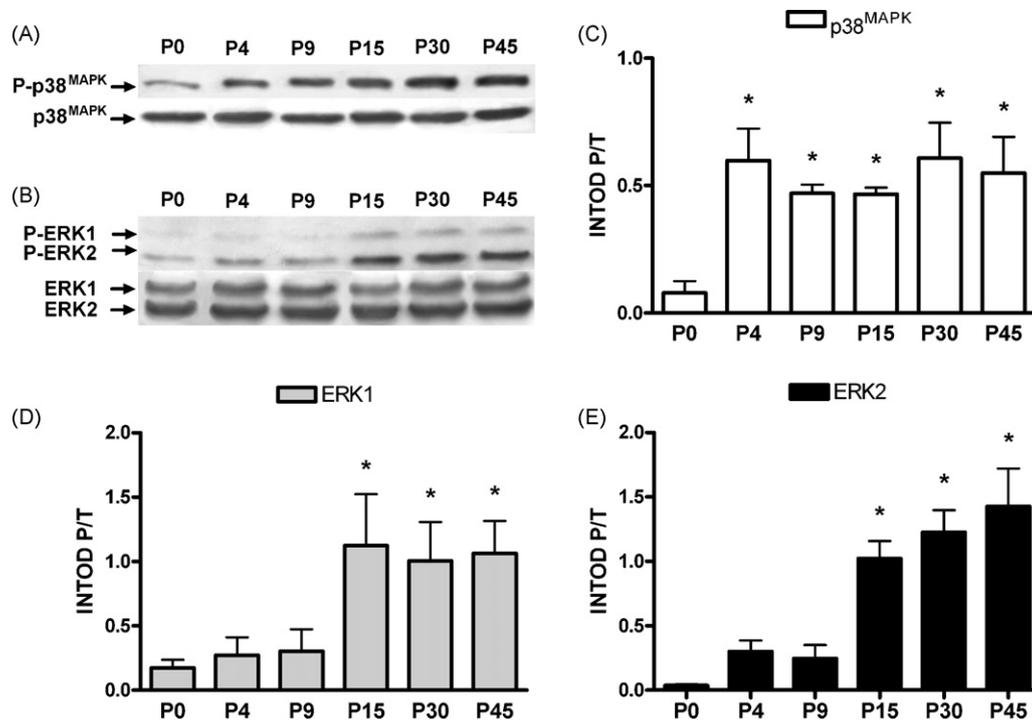


Fig. 3. The phosphorylation of p38^{MAPK} and ERK1/2 is dynamically regulated in the visual cortex of the rat during development. (A) Representative western blot of rat visual cortex at different postnatal ages incubated with anti-phospho-p38^{MAPK} antibody and successively with anti-total-p38^{MAPK} antibody. (B) Representative western blot of rat visual cortex at different postnatal ages incubated with anti-phospho-ERK1/2 antibody and successively with anti-total-ERK1/2 antibody. (C) Graph reports the INTOD values of the ratio between phospho- and total form of p38^{MAPK} (INTOD P/T) signals detected in rat visual cortex during development ($n = 8$). The phosphorylation of p38^{MAPK} is low at P0, increases at P4 and remains at high level at later ages. (D and E) Graph reports the INTOD values of the ratio between phospho- and total form of ERK1 and ERK2 (INTOD P/T) signals detected in rat visual cortex during development ($n = 10$). The phosphorylation of both ERK1 and ERK2 is low between P0 and P9, increases at P15 and remains at high level at later ages. * $p < 0.05$ when compared to P0 level. No statistically significant differences were detected in the amount of total forms for p38^{MAPK} ($p = 0.98$), ERK1 ($p = 0.76$), and ERK2 ($p = 0.83$).

activation during postnatal development of the rat visual system. As summarized in Fig. 4, our results indicate that the activation of ERK1/2 and p38^{MAPK} is regulated in the three visual areas analyzed in a dynamical way. Even though exclusively temporal, the correlation between this regulation and specific events in the postnatal maturation of the retina, superior colliculus and visual cortex of the rat, suggests an important role for ERK1/2 and p38^{MAPK} in the development of the visual system, as detailed below.

3.1. Retina

Our data on MAPKs activation during the development of the rat retina show a distinct regulation of the two enzymes. p38^{MAPK} presented a “bimodal” regulation with a first increase at P4 and a second between P15 and P45, while ERK1/2 signal, in agreement with previous data in mice (O’Driscoll et al., 2006), was low from P0 to P9, and increased at later ages. Several authors have analyzed the expression and phosphorylation of MAPKs at adult stage. By immunohistochemistry it has been reported that both p38^{MAPK} and ERK1/2 are present in phosphorylated/activated forms in the adult rat retina, and that they are differentially distributed in the different retinal layers (Kikuchi et al., 2000; Manabe and Lipton, 2003; Munemasa et al., 2005).

Besides the identification of an increased signaling through both p38^{MAPK} and ERK1/2 pathways in the rat retina during

postnatal development (present study; O’Driscoll et al., 2006), it is still unclear at present whether MAPKs contribute to retinal maturation processes and, if this is the case, to which ones. One of the best known roles of MAPKs is the control of cell survival, which has been reported in various brain areas including the retina following a series of different insults (Kikuchi et al., 2000; Manabe and Lipton, 2003; Roth et al., 2003; Munemasa et al., 2005). Our results reported a peak of p38^{MAPK} phosphorylation at P4 which occurs in temporal correlation with one of the major developmental processes shaping the retina, the process of programmed cell death (Galli-Resta and Ensini, 1996; Vecino et al., 2004; Linden et al., 2005). Thus, it is tempting to speculate that the p38^{MAPK} pathway may be directly regulating this spontaneously occurring retinal cell death process.

The phosphorylation of both p38^{MAPK} and ERK1/2 increased significantly in the rat retina at P15. In rats, this postnatal day approximately corresponds to eye opening, which is known to determine a sudden increase of electrical activity that, in turn, may induce MAPKs activation. The dependence of ERK phosphorylation on electrical activity is well known at cortical (see below) but also at retinal level, where blocking spontaneous activity completely turns-off ERK activation (Naska et al., 2004). On the contrary, no data are available on the effects of electrical activity on p38^{MAPK} activation at retinal level. Our observation suggests that the phosphorylation

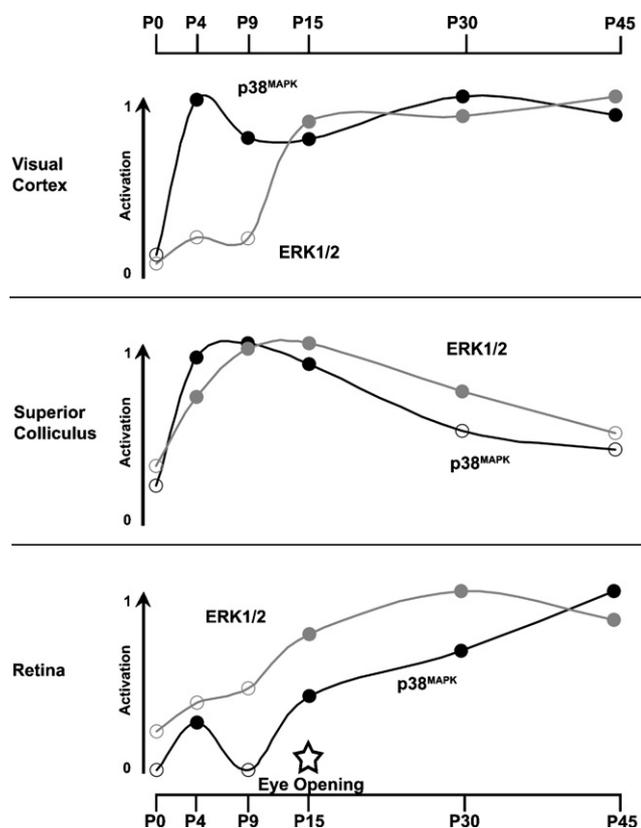


Fig. 4. The activation of ERK1/2 and p38^{MAPK} in the developing rat visual system is regulated in a dynamical way. The temporal correlation with specific events in the postnatal maturation of retina, superior colliculus and visual cortex, suggests an important role for these MAPKs in the development of the visual system (see Section 3). Curves were drawn to fit the data points plotted in Fig. 1 for retina, Fig. 2 for superior colliculus and Fig. 3 for visual cortex. Raw data for each graph (INTOD P/T) were normalized to the respective maximal value, expressed as activation level (y-axis) and reported in a time scale (x-axis). To simplify, ERK1 and ERK2 values were averaged. Grey lines, ERK1/2 phosphorylation regulation; black lines, p38^{MAPK} phosphorylation regulation. Filled circles are used to evidenciate the time points statistically different from P0 (one-way ANOVA, Duncan's *post hoc* test, $p < 0.05$).

of both ERK1/2 and p38^{MAPK} in the P15 retina may be up-regulated by the increased electrical activity induced by the visual input at eye opening.

We cannot exclude that other factors besides or as a consequence of electrical activity contribute to the MAPKs activation reported in the present study. In fact, several extracellular stimuli, as growth factors and cytokines among others, that are developmentally regulated in the visual system, are known to activate MAPKs (Chang and Karin, 2001; Pearson et al., 2001; Sweatt, 2001). A particularly interesting example is represented by the brain-derived neurotrophic factor. This molecule has been clearly shown to be in the pathway of ERK1/2 activation (Cavanaugh et al., 2001; Barnabé-Heider and Miller, 2003; Igaz et al., 2006; Ratto and Pizzorusso, 2006), to be expressed in a peculiar spatio-temporal manner in the visual system, to be dependent upon visual electrical activity (Castrén et al., 1992; Bozzi et al., 1995; Rossi et al., 1999), and to play a crucial role in plastic processes (Huang et al., 1999; Hanover et al., 1999; Gianfranceschi et al., 2003). The mechanistic

relations between developmental changes in BDNF, and other extracellular stimuli, and MAPK activation in the visual system deserve further investigations.

3.2. Superior colliculus

In the rat superior colliculus the activation of both ERK1/2 and p38^{MAPK} was regulated in a “bell-shape” way during development, with relatively low level at P0, an increase between P4 and P15, and a decrease to lower level at later ages. This is the first report describing a regulation of MAPKs phosphorylation in the rat superior colliculus during development. A similar developmental regulation of ERK phosphorylation has been reported for the other main visual nucleus, the dLGN (Naska et al., 2004). The temporal correlation with the critical period for plasticity and *in vivo* blocking experiments, clearly demonstrated the involvement of the ERK pathway in the formation of eye-specific domains at geniculate level (Naska et al., 2004). Therefore, as the regulation of ERK1/2 and p38^{MAPK} phosphorylation in the superior colliculus detected in the present study correlates with the critical period for segregation of retino-collicular projections (Land and Lund, 1979; Fawcett et al., 1984; Godement et al., 1984), it is likely that these pathways play an important role in plastic processes also at collicular level. This suggestion is in agreement with the recent observation that not only the ERK pathway, but also the p38^{MAPK} one, is part of a signaling cascade leading to retinal axon growth and guidance (Campbell and Holt, 2003; Chierzi et al., 2005; Verma et al., 2005). Nevertheless, we cannot exclude the participation of MAPKs also in other developmental processes, as for instance, the spontaneous process of collicular cell death. Dying cells have been observed in the optic layers of the rat superior colliculus during the first two postnatal weeks, with a maximal density at P6 (Giordano et al., 1980; Galli-Resta et al., 1993), in coincidence with the increase of MAPKs phosphorylation reported here.

3.3. Visual cortex

In the rat visual cortex the activation of ERK1/2 and p38^{MAPK} was regulated in a distinct way during development. In agreement with previous immunocytochemical experiments (Cancedda et al., 2003; Suzuki et al., 2004), ERK1/2 phosphorylation was low from P0 to P9, and increased between P15 and P45. The detected increase at P15, time of eye opening, indicates a regulation by the visual input. It is in fact known that visual cortical ERK is promptly and potently modulated by manipulations of visual experience (Kaminska et al., 1999; Di Cristo et al., 2001; Cancedda et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Putignano et al., 2007). The up-regulation of ERK1/2 phosphorylation between P15 and P45 occurs in temporal correlation with the critical period for cortical plasticity. Indeed, it has been shown that specifically blocking the ERK pathway suppresses the induction of long-term potentiation in rat cortical slices *in vitro* and blocks monocular deprivation-induced plasticity *in vivo* (Di Cristo et al., 2001).

Much less is known on the developmental regulation of the p38^{MAPK} pathway and on its role in the developing visual cortex. Here, for the first time, we report a detailed study indicating that cortical p38^{MAPK} phosphorylation is low at P0 and increases at P4 to remain at high level at later ages. Similarly to ERK1/2, also p38^{MAPK} is phosphorylated/activated during the critical period for visual cortical plasticity (P15–P45), suggesting a possible involvement also for this kinase in plasticity processes. However, controversial results have been reported. Blocking the p38^{MAPK} pathway in the rat developing visual cortex does not block the monocular deprivation-induced plasticity (Di Cristo et al., 2001); but a recent report showed that p38^{MAPK} is involved in a different form of synaptic plasticity in the mouse visual cortex, the anysomicin-induced long-term depression (Xiong et al., 2006).

The p38^{MAPK} pathway may be regulating also other developmental processes in the postnatal cortex. Again, one of them may be the spontaneous cell death process, that in the rat visual cortex is particularly high during the first two postnatal weeks (Nunez et al., 2000, 2001), in correlation with the reported increase of p38^{MAPK} phosphorylation.

In summary, the results of the present study disclose a dynamic and transient regulation of the activation of ERK1/2 and p38^{MAPK} in the developing rat visual system and suggest that these enzymes are involved in the regulation of specific visual developmental processes.

Acknowledgements

We thank Andrea Villarino and Michele Zoli for suggestions and discussion. This project was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” #01.06.0842-00, Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), and International Society for Neurochemistry (ISN). FMR and RBL are recipients of CNPq fellowships.

References

Barnabé-Heider, F., Miller, F.D., 2003. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J. Neurosci.* 23, 5149–5160.

Berardi, N., Pizzorusso, T., Ratto, G.M., Maffei, L., 2003. Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci.* 26, 369–378.

Bozzi, Y., Pizzorusso, T., Cremisi, F., Rossi, F.M., Barsacchi, G., Maffei, L., 1995. Monocular deprivation decreases the expression of messenger RNA for brain-derived neurotrophic factor in the rat visual cortex. *Neuroscience* 69, 1133–1144.

Campbell, D.S., Holt, C.E., 2003. Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron* 37, 939–952.

Cancedda, L., Putignano, E., Impey, S., Maffei, L., Ratto, G.M., Pizzorusso, T., 2003. Patterned vision causes CRE-mediated gene expression in the visual cortex through PKA and ERK. *J. Neurosci.* 23, 7012–7020.

Castrén, E., Zafra, F., Thoenen, H., Lindholm, D., 1992. Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 9444–9448.

Cavanaugh, J.E., Ham, J., Hetman, M., Poser, S., Yan, C., Xia, Z., 2001. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J. Neurosci.* 21, 434–443.

Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.

Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.H., 2001. MAP kinases. *Chem. Rev.* 101, 2449–2476.

Chierzi, S., Ratto, G.M., Verma, P., Fawcett, J.W., 2005. The ability of axons to regenerate their growth cones depends on axonal type and age, and is regulated by calcium, cAMP and ERK. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2051–2062.

Cordova, F.M., Rodrigues, A.L., Giacomelli, M.B., Oliveira, C.S., Posser, T., Dunkley, P.R., Leal, R.B., 2004. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res.* 998, 65–72.

Cowan, W.M., Fawcett, J.W., O’Leary, D.D., Stanfield, B.B., 1984. Regressive events in neurogenesis. *Science* 225, 1258–1265.

Di Cristo, G., Berardi, N., Cancedda, L., Pizzorusso, T., Putignano, E., Ratto, G.M., Maffei, L., 2001. Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* 292, 2337–2340.

English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., Cobb, M.H., 1999. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp. Cell Res.* 253, 255–270.

Fawcett, J.W., O’Leary, D.D., Cowan, W.M., 1984. Activity and the control of ganglion cell death in the rat retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5589–5593.

Galli-Resta, L., Ensini, M., Fusco, E., Gravina, A., Margheritti, B., 1993. Afferent spontaneous electrical activity promotes the survival of target cells in the developing retinotectal system of the rat. *J. Neurosci.* 13, 243–250.

Galli-Resta, L., Ensini, M., 1996. An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *J. Neurosci.* 16, 2318–2324.

Gianfranceschi, L., Siciliano, R., Walls, J., Morales, B., Kirkwood, A., Huang, Z.J., Tonegawa, S., Maffei, L., 2003. Visual cortex is rescued from the effects of dark rearing by overexpression of BDNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 12486–12491.

Giordano, D.L., Murray, M., Cunningham, T.J., 1980. Naturally occurring neuron death in the optic layers of superior colliculus of the postnatal rat. *J. Neurocytol.* 9, 603–614.

Godement, P., Salaun, J., Imbert, M., 1984. Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 230, 552–575.

Hanover, J.L., Huang, Z.J., Tonegawa, S., Stryker, M.P., 1999. Brain-derived neurotrophic factor overexpression induces precocious critical period in mouse visual cortex. *J. Neurosci.* 19, RC40.

Huang, Z.J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M.F., Maffei, L., Tonegawa, S., 1999. (BDNF) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98, 739–755.

Igaz, L.M., Winograd, M., Cammarota, M., Izquierdo, L.A., Alonso, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2006. Early activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in the hippocampus is required for short-term memory formation of a fear-motivated learning. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26, 989–1002.

Kaminska, B., Kaczmarek, L., Zangenehpour, S., Chaudhuri, A., 1999. Rapid phosphorylation of Elk-1 transcription factor and activation of MAP kinase signal transduction pathways in response to visual stimulation. *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 405–414.

Katz, L.C., Shatz, C.J., 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274, 1133–1138.

Kikuchi, M., Tanneti, L., Lipton, S.A., 2000. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 20, 5037–5044.

- Land, P.W., Lund, R.D., 1979. Development of the rat's uncrossed retinotectal pathway and its relation to plasticity studies. *Science* 205, 698–700.
- Linden, R., Martins, R.A., Silveira, M.S., 2005. Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 457–491.
- Manabe, S., Lipton, S.A., 2003. Divergent NMDA signals leading to proapoptotic and antiapoptotic pathways in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 385–392.
- McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C., 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 295–318.
- Munemasa, Y., Ohtani-Kaneko, R., Kitaoka, Y., Kuribayashi, K., Isenoumi, K., Kogo, J., Yamashita, K., Kumai, T., Kobayashi, S., Hirata, K., Ueno, S., 2005. Contribution of mitogen-activated protein kinases to NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res.* 1044, 227–240.
- Naska, S., Cenni, M.C., Menna, E., Maffei, L., 2004. ERK signaling is required for eye-specific retino-geniculate segregation. *Development* 131, 3559–3570.
- Nunez, J.L., Jurgens, H.A., Juraska, J.M., 2000. Androgens reduce cell death in the developing rat visual cortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 125, 83–88.
- Nunez, J.L., Lauschke, D.M., Juraska, J.M., 2001. Cell death in the development of the posterior cortex in male and female rats. *J. Comp. Neurol.* 436, 32–41.
- O'Driscoll, C., Donovan, M., Cotter, T.G., 2006. Analysis of apoptotic and survival mediators in the early post-natal and mature retina. *Exp. Eye Res.* 83, 1482–1492.
- Oppenheim, R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453–501.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–183.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Putignano, E., Lonetti, G., Cancedda, L., Ratto, G., Costa, M., Maffei, L., Pizzorusso, T., 2007. Developmental downregulation of histone posttranslational modifications regulates visual cortical plasticity. *Neuron* 53, 747–759.
- Ratto, G.M., Pizzorusso, T., 2006. A kinase with a vision: role of ERK in the synaptic plasticity of the visual cortex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 557, 122–132.
- Rossi, F.M., Bozzi, Y., Pizzorusso, T., Maffei, L., 1999. Monocular deprivation decreases brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in the rat visual cortex. *Neuroscience* 90, 363–368.
- Rossi, F.M., Sala, R., Maffei, L., 2002. Expression of the nerve growth factor receptors TrkA and p75NTR in the visual cortex of the rat: development and regulation by the cholinergic input. *J. Neurosci.* 22, 912–919.
- Roth, S., Shaikh, A.R., Hennelly, M.M., Li, Q., Bindokas, V., Graham, C.E., 2003. Mitogen-activated protein kinases and retinal ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5383–5395.
- Suzuki, S., al-Noori, S., Butt, S.A., Pham, T.A., 2004. Regulation of the CREB signaling cascade in the visual cortex by visual experience and neuronal activity. *J. Comp. Neurol.* 479, 70–83.
- Sweatt, J.D., 2001. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76, 1–10.
- Sweatt, J.D., 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 311–317.
- Takeda, K., Ichijo, H., 2002. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7, 1099–1111.
- Thomas, G.M., Haganir, R.L., 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173–183.
- Vecino, E., Hernandez, M., Garcia, M., 2004. Cell death in the developing vertebrate retina. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 965–974.
- Verma, P., Chierzi, S., Codd, A.M., Campbell, D.S., Meyer, R.L., Holt, C.E., Fawcett, J.W., 2005. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. *J. Neurosci.* 25, 331–342.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E., 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326–1331.
- Xiong, W., Kojic, L.Z., Zhang, L., Prasad, S.S., Douglas, R., Wang, Y., Cynader, M.S., 2006. Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res.* 1085, 68–76.