

Ana Paula Costa

**PERFIL DE ATIVAÇÃO DE PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS
POR MITÓGENOS (MAPKs) NO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL DE RATOS E SEU PAPEL NO
DESENVOLVIMENTO**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Orientador: Dr. Rodrigo Bainy Leal

Florianópolis

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Ana Paula
PERFIL DE ATIVAÇÃO DE PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS POR
MITÓGENOS (MAPKs) NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS E SEU
PAPEL NO DESENVOLVIMENTO / Ana Paula Costa ; orientador,
Rodrigo Bainy Leal - Florianópolis, SC, 2015.
173 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

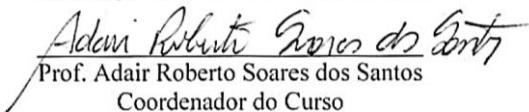
1. Neurociências. 2. Proteínas cinases ativadas por
mitógenos (MAPKs). 3. Desenvolvimento do sistema nervoso
central. 4. Proteína cinase ativada por sinal extracelular.
5. Hipocampo. I. Leal, Rodrigo Bainy. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. III. Título.

ANA PAULA COSTA

**“PERFIL DE ATIVAÇÃO DE PROTEÍNAS CINASES
ATIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKS) NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE RATOS E SEU PAPEL NO
DESENVOLVIMENTO”**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa Catarina

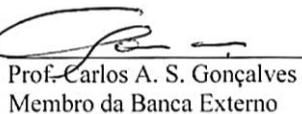
Florianópolis, 17 de dezembro de 2015.

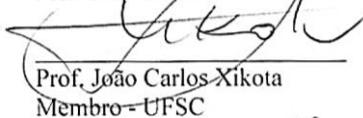

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

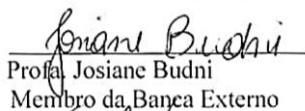
Banca Examinadora:

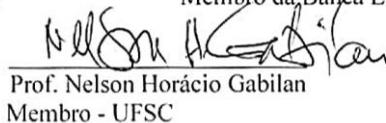

Prof. Rodrigo Bairy Leal
Orientador – UFSC


Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC


Prof. Carlos A. S. Gonçalves
Membro da Banca Externo


Prof. João Carlos Xikota
Membro - UFSC


Profa. Josiane Budni
Membro da Banca Externo


Prof. Nelson Horácio Gabilan
Membro - UFSC

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais,
meu irmão e, principalmente, ao Alexandre pelo constante apoio,
incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz Carlos e Iraci, e ao meu irmão Rafael, pelo constante apoio, incentivo e compreensão. Ao Alexandre, pelo exemplo de dedicação, companheirismo e paciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Bairy Leal pela orientação, amizade e por todas as oportunidades científicas que me proporcionou durante esses anos de trabalho em seu laboratório.

Às minhas queridas amigas, Manuella e Patrícia, que além de grandes amigas são meus exemplos na vida científica, muito obrigada por todo o apoio, na vida e no trabalho. Sinto muito orgulho de vocês!

À minha amiga Débora, minha parceira! Obrigada pela sua amizade e companheirismo.

À minha amiga Jade! Obrigada pela sua amizade e pela colaboração neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Neuroquímica-3 por todo o apoio nesse período, obrigada Mark, Filipe, Isabella, Jhônatas, Ingrid, Helena e Sabrina. Obrigada pelo companheirismo e auxílio no laboratório! Sentirei saudades!

Obrigada Prof. Dr. Rui D. Prediger, e a todos do seu laboratório. Em especial, à Samantha e ao Filipe. Aprendi muito com vocês!

Obrigada Prof. Dr^a. Ana Lúcia de Paul, da Universidad Nacional de Córdoba, e a todos do Centro de Microscopia Eletrônica. Em especial, à minha amiga Vicky. Vocês ficarão sempre no meu coração, Córdoba foi um período muito feliz na minha vida!

Obrigada amigas do meu coração, Cassi, Carol Maranhão, Carol Hilgert, Josi e Tine. Cada uma de vocês tem uma contribuição especial nessa conquista!

À Arlete, tenho muito que agradecer pela sua dedicação ao trabalho no Biotério Central da UFSC! Você é uma pessoa admirável!

Obrigada aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica, que fizeram parte dos meus dias durante todos esses anos. Tenho muito carinho por todos vocês!

Muito obrigada ao PPG Neurociências, CAPES/CNPq, CAPES/MINCYT e Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade.

“... é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

RESUMO

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) representam uma família de serina/treonina cinases ativadas por fosforilação em resposta a sinais extracelulares que incluem ERK 1/2, JNK p54/p46 e p38^{MAPK}. No sistema nervoso central (SNC) estas enzimas medeiam eventos associados ao desenvolvimento e neuroplasticidade. No período inicial do desenvolvimento pós-natal ocorrem alterações significativas na estrutura do cérebro e sinalização intracelular. No hipocampo de roedores as MAPKs têm sido apontadas como proteínas fundamentais na modulação do desenvolvimento neural e plasticidade sináptica. Apesar dessas evidências a ontogenia pós-natal das MAPKs em estruturas específicas, bem como o seu papel, em determinadas fases do desenvolvimento, para o estabelecimento de funções motoras e cognitivas no adulto tem sido pouco caracterizada. A compreensão do padrão de ativação das MAPKs durante o neurodesenvolvimento é essencial, uma vez que pequenas alterações na atividade dessas proteínas em janelas específicas do desenvolvimento podem implicar em alterações funcionais tardias. No presente estudo foi determinado, em uma primeira etapa, o perfil ontogenético da fosforilação e conteúdo total das MAPKs no hipocampo de ratos Wistar machos durante o período pós-natal (PN) 1-60. Para isso a fosforilação e o conteúdo total das MAPKs foram avaliados por western blotting nas idades: PN1, PN4, PN7, PN10, PN14, PN21, PN30 e PN60. Os resultados foram expressos como percentual relativo à PN1 e demonstraram: (1) aumento significativo na fosforilação de p38^{MAPK} de forma bimodal em PN4 e PN10-60; (2) aumento na fosforilação de ERK1 (PN4) e ERK2 (PN14) dependente da idade; (3) variação do conteúdo total de JNKp54 com perfil similar ao da ativação de p38^{MAPK}; 4) ausência de variação na taxa de fosforilação de JNK p54/p46 nas idades analisadas. Em uma segunda etapa foi determinado o papel da atividade de ERK 1/2 durante o desenvolvimento em relação às alterações comportamentais, da estrutura sináptica e na proliferação celular hipocampal na vida adulta do animal. Para isso, foi utilizado um protocolo de inibição de MEK/ERK com U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante um período crítico de sinaptogênese (PN7-14). Os resultados mostraram que o tratamento com o U0126 foi efetivo, pois foi observado inibição significativa da fosforilação de ERK 1, avaliada no hipocampo em PN7 e 6 h após a administração do inibidor. Adicionalmente, demonstraram que o tratamento com U0126 em PN7-14, quando comparado ao controle (DMSO 1%), tem consequências relevantes na vida adulta dos animais que incluem: (i) modificações na

estrutura sináptica no hipocampo em PN30, com diminuição do diâmetro da densidade pós-sináptica e no número de vesículas no terminal pré-sináptico; (ii) danos permanentes na memória de curta duração; (iii) diminuição na proliferação celular analisado pela quantidade de células positivas para Ki-67 no giro denteado do hipocampo; e (iv) aumento na expressão de GFAP no hipocampo dos ratos quando comparado ao grupo controle (DMSO 1%). Em conjunto os resultados mostram a existência de um perfil específico de atividade das MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal de ratos e sugerem que alteração da atividade dessas enzimas, por fatores ambientais diversos, podem acarretar alterações funcionais e estruturais permanentes do SNC.

Palavras-chave: proteínas cinases ativadas por mitógenos, desenvolvimento do sistema nervoso central, hipocampo, cinase ativada por sinal extracelular, U0126, memória de curta duração.

ABSTRACT

The mitogen-activated protein kinases (MAPK) represent a family of serine/threonine kinases activated by phosphorylation in response to extracellular signals that includes ERK 1/2, JNK p54/p46 and p38^{MAPK}. In the central nervous system (CNS), these enzymes mediate events associated with development and neuroplasticity. The early postnatal development is characterized by significant changes in brain structure, and intracellular signaling. In the hippocampus of rodents MAPKs have been identified as key proteins in the modulation of neural development and synaptic plasticity. Despite these evidences, studies characterizing the postnatal ontogeny of MAPKs in specific structures in the early periods of postnatal development in rodents are scarce. Thus, understanding the pattern of MAPK activation during brain development is critical, since minor changes in the activity of these proteins in specific developmental windows can result in later functional disorders. Accordingly, our study initially determined the profile of phosphorylation and total content of MAPKs in the hippocampus of male Wistar rats during the postnatal period (PN) 1-60. In order to target this aim MAPKs were evaluated by western blotting at ages: PN1, PN4, PN7, PN10, PN14, PN21, PN30 and PN60. The results were expressed as percentage related to PN1 and demonstrated: (1) significant increment in phosphorylation of p38^{MAPK} displayed in two peaks one PN4 and a second at PN10-60; (2) age dependent increase in the phosphorylation of ERK1 (PN4) and ERK2 (PN14); (3) change in the total content JNKp54 with similar profile to that of p38^{MAPK} activation; (4) no variation in the content of JNKp46 nether in the rate of phosphorylation of JNK p54/p46 in the ages analyzed. In a second stage we determined the role of ERK 1/2 activity during development regarding changes in synaptic structure, behavioral and cellular proliferation in the adult life. For this, rats were treated in the developmental period PN7-14 with the MEK/ERK inhibitor U0126 (5 mg/kg; ip). The results showed that the treatment with U0126 was effective, since it was detected a significant inhibition of ERK 1 phosphorylation, evaluated at PN7 and 6 h after the administration of the inhibitor. Moreover, the results demonstrated that the treatment with U0126 at PN7-14, as compared to the control (DMSO 1%), bring consequences for adulthood that include: (i) changes in hippocampal synaptic structure at PN30, decreasing the diameter of postsynaptic density and the number of vesicles in the presynaptic terminal; (ii) permanent damage in short term memory; (iii) a decrease in cell proliferation assessed by the number of cells positive for Ki-67 in the

dentate gyrus of the hippocampus); and (iv) increased expression of GFAP in the hippocampus of rats compared with the control group (1% DMSO). Taken together the results show a specific profile of MAPKs activity during the postnatal development of rats and suggest that alteration of the activity of these enzymes by environmental factors may cause permanent functional changes in the CNS.

Keywords: mitogen-activated protein kinases, development of the central nervous system, hippocampus, kinase activated by extracellular signal, U0126, short-term memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios do desenvolvimento do sistema nervoso central em humanos.....	24
Figura 2. Principais eventos celulares durante o desenvolvimento pós-natal no sistema nervoso central (SNC) de ratos.....	27
Figura 3. Regiões e vias que compõem o hipocampo de roedores.....	32
Figura 4. Esquema geral da ativação da via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).....	34
Figura 5. Desenho experimental de administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural em ratos.....	45
Figura 6: Esquema ilustrativo do teste de realocação de objetos.....	53
Figura 7. Análise por western blotting da fosforilação JNK p54/p46 e de seu conteúdo total durante o desenvolvimento pós-natal no hipocampo de ratos.....	60
Figura 8. Análise por western blotting da fosforilação ERK 1/2 e de seu conteúdo total durante o desenvolvimento pós-natal no hipocampo de rato.....	62
Figura 9. Análise por western blotting da fosforilação p38 ^{MAPK} e de seu conteúdo total durante o desenvolvimento pós-natal no hipocampo de ratos.....	64
Figura 10. Análise por western blotting da fosforilação ERK 1/2 e de seu conteúdo total após administração única de U0126 (5 mg/kg; i.p.) em PN7.....	67
Figura 11. Análise por western blotting da fosforilação ERK 1/2 e de seu conteúdo total após administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14.....	69
Figura 12. Avaliação da fosforilação de CaMKII α/β (p-Ser286) e sinapsina I (p-Ser 62/67) medida em PN15 em resposta à administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14.....	71
Figura 13. Avaliação da fosforilação de CREB e expressão de BDNF medida em PN15 em resposta à administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14.....	72
Figura 14. Avaliação da fosforilação de CaMKII α/β (p-Ser286) e sinapsina I (p-Ser 62/67) medida em PN30 em resposta à administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14.....	73
Figura 15. Microscopia eletrônica do hipocampo de ratos após administração de U0126 durante o desenvolvimento (PN7-14).....	74

Figura 16. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a preferência social (“ <i>homing test</i> ”) em ratos machos jovens (PN15).....	77
Figura 17: Efeito da administração de U0126 durante o desenvolvimento (PN7-14) sobre o comportamento social (teste de interação social) em ratos machos (PN30).....	78
Figura 18. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a atividade locomotora (teste do campo aberto) em ratos machos adultos (PN30).....	78
Figura 19. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a atividade locomotora (teste do campo aberto) em ratos machos adultos (PN55-63).....	80
Figura 20. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a atividade coordenação motora (teste Rotarod) em ratos machos adultos (PN55-63).....	81
Figura 21. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre o comportamento “tipo ansioso” (teste do labirinto em cruz elevado) em ratos machos adultos (PN55-63).....	83
Figura 22. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a memória de curto prazo (teste de realocação de objetos) em ratos machos adultos (PN55-63).....	85
Figura 23. Efeitos da administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante um período crítico do desenvolvimento do SNC (PN7-14) na proliferação celular no giro denteado do hipocampo em ratos adultos (PN63).....	87
Figura 24. Expressão de GFAP no hipocampo após a administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período crítico do desenvolvimento do SNC (PN7-14)....	88
Figura 25. Perfil de ativação e conteúdo total das MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal em hipocampo de ratos.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CaMKII: Ca²⁺/calmodulina-dependente de proteína cinase II

CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico

DMSO: dimetil sulfóxido

DO: densidade ótica

EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético

EPM: erro padrão da média

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

JNK: cinase c-Jun N-terminal

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

MAP2K: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno

MAP3K: cinase da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno

MEK: cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular

MEKK: cinase da cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular

p38^{MAPK}: proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kDa

PBS: tampão salina fosfato

SAPK: proteína cinase ativada por estresse

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo

SNC: sistema nervoso central

TBS: tampão tris-salina

TBS-T: tampão tris-salina acrescido de Tween-20

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central	22
1.2 Bases do neurodesenvolvimento em humanos	23
1.3 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central em roedores	26
1.4 Períodos críticos de vulnerabilidade para o neurodesenvolvimento	30
1.5 Desenvolvimento pós-natal do hipocampo em roedores	32
1.6 Proteínas cinases envolvidas no desenvolvimento neural	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 MÉTODOS	41
3.1 Animais	41
3.2 Protocolo experimental I	41
3.2.1 Western blotting	41
3.3 Protocolo experimental II	45
3.3.1 Tratamento <i>in vivo</i> com U0126	45
3.3.2 Western blotting	46
3.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão	48
3.3.4 Testes comportamentais	49
3.3.5 Imunoistoquímica	55
3.4 Análise estatística	57
4 RESULTADOS	59
4.1 Perfil de fosforilação das MAPKs no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal	59
4.2 Inibição de MEK 1/2 em período específico do desenvolvimento do sistema nervoso central	65
4.2.1 Inibição da fosforilação de ERK 1 após a administração de inibidor de MEK 1/2	65

4.2.3 Modificações na estrutura sináptica no hipocampo de ratos após a administração de U0126 no período específico do desenvolvimento do sistema nervoso central.....	74
4.2.4 Inibição de MEK1/2 durante um período crítico do desenvolvimento neural causa alterações comportamentais na vida adulta de ratos.....	75
4.2.5 Alterações nos níveis de fosforilação de ERK 1/2 em período crítico do desenvolvimento do SNC diminui a proliferação celular e aumenta a expressão de GFAP na vida adulta de ratos.....	86
5 DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÕES	111
7 REFERÊNCIAS.....	115
ANEXOS	129

1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos têm conhecimento, há pelo menos 3.500 anos, que o funcionamento cerebral afeta o comportamento e que danos ao sistema nervoso central (SNC) causam alterações comportamentais (Breasted, 1930). Cerca de 2400 anos atrás, Hipócrates disse que “a partir do cérebro surgem nossos prazeres, alegrias, risos e brincadeiras, bem como nossas tristezas, dores, aflições e lágrimas”. Ele também estava consciente de que “...todas as doenças mais graves, as mais severas, e mais mortais, e aquelas que são mais difíceis de ser compreendidas pelas pessoas, recaem sobre o cérebro” (Adams, 1939).

Transtornos do neurodesenvolvimento afetam aproximadamente 10-15 % de todos os nascimentos (World Health Organization, 2012). Esses transtornos estão associados com alterações no desenvolvimento do SNC, incluindo: alterações do neurodesenvolvimento do espectro autista, déficit de atenção e hiperatividade, dislexia, entre outras deficiências cognitivas que afetam milhões de crianças em todo o mundo (Grandjean & Landrigan, 2014).

A maioria dos transtornos, neurocomportamentais e neuropsiquiátricos, têm suas origens durante o desenvolvimento neural, e modelos emergentes postulam que essa vulnerabilidade durante o desenvolvimento é, frequentemente, limitada a períodos sensíveis (Yu et al, 2014). Evidências epidemiológicas revelam uma estreita associação entre experiências em períodos iniciais da vida com alterações no comportamento na vida adulta, revelando a natureza ambientalmente sensível das estruturas e vias neurobiológicas do cérebro em desenvolvimento (Anda et al, 2006; Spenrath et al, 2011).

1 1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

Há cerca de 2000 anos, o filósofo romano Sêneca propôs que o embrião humano seria nada mais que um adulto em miniatura e, portanto, desenvolver-se seria somente aumentar de tamanho. No início do século 20 tornou-se evidente que o desenvolvimento do SNC refletia uma sequência de eventos *in utero* e após o nascimento, até a vida adulta (Kolb & Gibb, 2011).

Na maioria dos mamíferos essa sequência de eventos pode ser dividida em duas grandes etapas. A primeira reflete principalmente uma sequência de eventos no útero determinada geneticamente, mas também modulada pelo ambiente materno. A segunda, ao mesmo tempo pré e pós-natal, na qual a conectividade do cérebro começa a se estabelecer, apresentando-se muito sensível ao ambiente, bem como aos padrões de atividade cerebral produzido pelas experiências às quais o indivíduo é submetido. Notavelmente, em ambas as etapas, as alterações epigenéticas que representam as modificações de expressão gênica que ocorrem de forma estável ao longo das divisões celulares em resposta aos estímulos ambientais, representarão um fator determinante para o resultado final do desenvolvimento (Kolb & Gibb, 2011).

Sendo assim, o desenvolvimento do SNC ocorre em um ambiente altamente contido, geneticamente organizado e em constante mudança (Stiles & Jernigan, 2010). Portanto, este é dependente de fatores determinados geneticamente (herança), mas também dependente de fatores ambientais e epigenéticos (Roth & Sweatt, 2011). Dentro desse paradigma, os estudos na área de neurobiologia do desenvolvimento em nível anatômico, celular e molecular, têm evidenciado alguns períodos altamente críticos no processo de neurodesenvolvimento, considerando a

diversidade de eventos observados dentro das várias etapas, que incluem: proliferação de células-tronco (capazes de gerar neurônios e células gliais), migração celular, diferenciação, maturação, sinaptogênese, apoptose e mielinização (Rice & Barone, 2000).

1.2 Bases do neurodesenvolvimento em humanos

O desenvolvimento do SNC é um processo prolongado que inicia, em humanos, na terceira semana de gestação com a diferenciação das células progenitoras neurais e se estende pelo menos até o final da adolescência (Stiles & Jernigan, 2010). Os processos que contribuem para o desenvolvimento do cérebro dependem de eventos moleculares de expressão gênica bem como da influência recebida de fatores ambientais. Esses processos interagem de forma a dar suporte a uma série contínua de eventos que definem o desenvolvimento do cérebro. O neurodesenvolvimento é caracterizado como uma série complexa de processos dinâmicos adaptativos que operam ininterruptamente para promover a diferenciação e o surgimento de novas estruturas e funções neurais. Durante o período perinatal em humanos, núcleos cerebrais, estruturas corticais, conexões e uma fina organização dessas conexões neurais são estabelecidas (Watson et al, 2006).

Os principais eventos que contribuem para o desenvolvimento do cérebro humano (Figura 1), do estado embrionário até a vida adulta, começam com as mudanças fundamentais que ocorrem durante o período embrionário, que em seres humanos se estende até a oitava semana pós-concepção (oitava semana de gestação). Ao final do período embrionário as estruturas rudimentares do SNC estão definidas e são estabelecidos os principais compartimentos do SNC. O período que segue, de

desenvolvimento fetal, se estende até o final da gestação – de aproximadamente 266 dias (38 semanas em humanos). Durante este período de rápido crescimento há o surgimento de diversas estruturas, corticais e subcorticais (Kostovic & Jovanov-Milosevic, 2006).

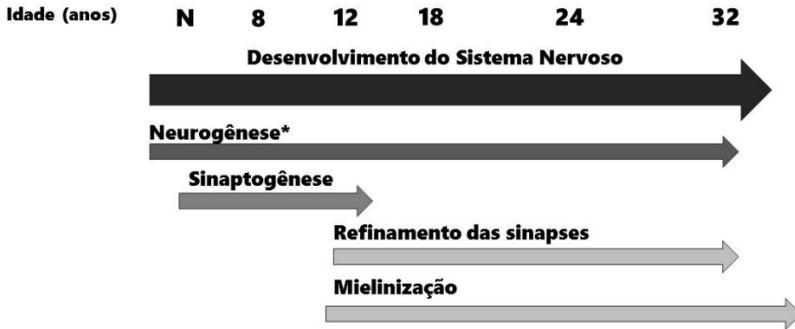


Figura 1. Estágios do desenvolvimento do sistema nervoso central em humanos. O desenvolvimento do SNC inicia aproximadamente na terceira semana de gestação e se estende até cerca de 30 anos de idade. *Neurogênese é completada ao final do sexto mês de gestação, porém continua em estruturas específicas, como no cerebelo até o final do oitavo mês de vida, e no hipocampo e zona subventricular ao longo da vida. (N= dia do nascimento) (Adaptado de Kolb et al., 2014).

O início do estágio de proliferação neuronal, em humanos, varia da 5^a – 6^a semana gestacional até a 16^a - 20^a semana; a migração neuronal ocorre da 6^a – 7^a semana até a 20^a – 24^a semanas e a organização cortical inicia-se a partir da 16^a semana e se prolonga até a vida pós-natal (Barkovich et al, 2005; Jansen & Andermann, 2005). O marco inicial da neurogênese em humanos ocorre aproximadamente no 33^o dia embrionário (E33) na zona subventricular (Bystron et al, 2008). Após o surgimento dos primeiros neurônios, os mesmos migram para diferentes áreas do cérebro onde começam a fazer conexões com outros neurônios

estabelecendo redes neurais rudimentares. Até o final do período pré-natal as principais vias, incluindo a via tálamo-cortical, estão completas (Stiles & Jernigan, 2010). A neurogênese e migração celular cortical parece se completar ao final da primeira semana de vida pós-natal. Depois disso, o desenvolvimento cortical é amplamente dependente de uma progressiva e variável maturação e eliminação de sinapses existentes, bem como de uma seletiva morte neuronal (Levitt, 2003).

O desenvolvimento do cérebro continua durante um período prolongado após o nascimento. O cérebro aumenta de tamanho até quatro vezes durante o período pré-escolar, atingindo aproximadamente 90% do volume final até 6 anos de idade (Lenroot & Giedd, 2006; Reiss et al, 1996). Porém, mudanças estruturais continuam ao longo da infância e adolescência, e essas mudanças na estrutura são paralelas a organização funcional que também se reflete no comportamento. Durante o período pós-natal precoce, o nível de conectividade em todo o cérebro em desenvolvimento é muito superior ao nível na vida adulta (Innocenti & Price, 2005). Essa conectividade exacerbada é gradualmente refinada por meio de processos competitivos que são influenciados por fatores externos. Estes processos precoces dependentes de fatores ambientais são subjacentes à plasticidade, característica marcante do desenvolvimento inicial do cérebro (Stiles & Jernigan, 2010). Em geral, a sequência de eventos é comparável entre as espécies mamíferas, embora a escala de tempo de cada evento seja consideravelmente diferente (Rice & Barone, 2000).

1.3 Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central em roedores

O neurodesenvolvimento normal em roedores é diferente quando comparado a humanos. Os roedores apresentam um desenvolvimento pós-natal significativamente pronunciado, enquanto os humanos apresentam uma maturação do SNC prioritariamente pré-natal. No hipocampo de roedores, muitas das conexões alcançam a maturidade ao final da segunda semana de vida pós-natal (Dobbing & Sands, 1979; Rice & Barone, 2000; Watson et al, 2006). Os roedores nascem com o SNC mais imaturo, comparado aos humanos, sendo necessários aproximadamente 21 dias para completar os estágios obrigatórios do desenvolvimento neural (Levitt, 2003).

A função cerebral está diretamente relacionada à composição e organização da rede celular, a base da qual é estabelecida durante o desenvolvimento neural. Determinar como essa composição e organização são estabelecidas durante o neurodesenvolvimento é um elemento fundamental para a compreensão de como o cérebro funciona, e também indispensável para a investigação dos mecanismos de desenvolvimento através do qual a diversidade é alcançada durante a evolução das espécies (Bandeira et al, 2009).

Em ratos o desenvolvimento neural de recém-nascidos (PN0-1) equivale aos 4-5 meses de gestação em humanos (Rosen & Galaburda, 2000). A primeira semana de vida pós-natal (PN1-7) nos ratos caracteriza-se pela presença de migração, diferenciação e início do crescimento dos neuritos. Durante a segunda semana de vida (PN7-14), ocorre um período máximo de crescimento dendrítico e intensa sinaptogênese. Adicionalmente, também é descrita a ocorrência de um

pico de neurogênese na região do giro denteado do hipocampo no período PN7-10 correspondente ao desenvolvimento do hipocampo em humanos que ocorre no terceiro trimestre da gestação (Kolb et al, 1998; Rice & Barone, 2000). A Figura 2 ilustra esquematicamente esse conjunto de eventos no desenvolvimento do SNC de ratos.

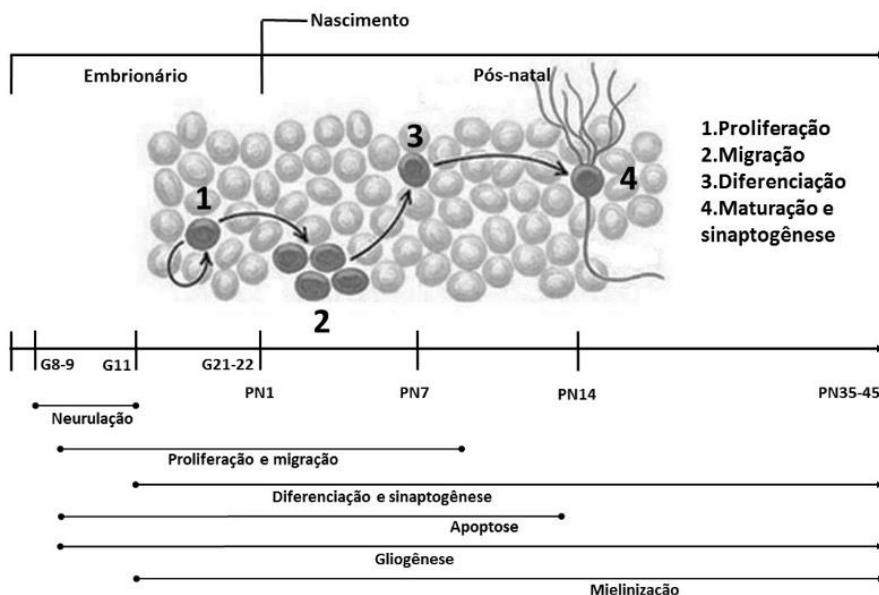


Figura 2. Principais eventos celulares durante o desenvolvimento pós-natal no sistema nervoso central (SNC) de ratos. No desenvolvimento do SNC de ratos as células precursoras iniciam seu desenvolvimento no período embrionário (E= dias embrionários). Os principais eventos celulares ocorrem no período pós-natal (PN= dias pós-natal), principalmente nas primeiras duas semanas de vida em ratos (Adaptado de Liu et al., 2004; e Rice & Barone, 2000).

As células precursoras neurais, as quais compõem o SNC, iniciam seu desenvolvimento na embriogênese, através de um processo chamado neurulação. A notocorda, haste celular que define o eixo primitivo do embrião, induz a dobra do ectoderma formando assim a placa neural, que

mais tarde dará origem ao tubo neural. A formação do tubo neural é completada aproximadamente ao final do 11º dia gestacional em ratos. Iniciando na segunda semana de gestação em roedores, áreas específicas do SNC começam o processo de neurogênese e migração celular, iniciando então a sequência de eventos característicos do neurodesenvolvimento em mamíferos (Rice & Barone 2000).

As células neurais que compõem o cérebro adulto em roedores, surgem durante o período pré-natal, de acordo com estudos celulares de Altman e Bayer (1989) – com exceção de neurônios do cerebelo (Altman, 1969), bulbo olfatório (Bayer, 1983), e hipocampo (Bayer, 1980). Embora na maioria das espécies, incluindo roedores e humanos, a neurogênese ocorra principalmente durante a vida intrauterina, no período pós-natal há um segundo aumento significativo de neurogênese em algumas áreas específicas do SNC (Watson et al, 2006). Em ratos, 85 % da neurogênese acontece após o nascimento (durante as duas primeiras semanas de vida) no bulbo olfatório e células granulares do giro denteado no hipocampo; diminuindo com o aumento da idade, de forma que apenas uma pequena taxa de neurogênese mantêm-se durante a vida adulta (Rice & Barone, 2000; Watson et al, 2006).

Na sequência de eventos que caracterizam o desenvolvimento neural pós-natal em ratos, as células progenitoras neurais que passaram pela fase de proliferação iniciam o processo de migração celular (fase G_0 do ciclo celular), das zonas ventricular e subventricular, e outras camadas germinativas, para diferentes regiões do cérebro. As células progenitoras neurais que migraram para regiões específicas do SNC, iniciam a fase de diferenciação celular (Rice & Barone, 2000).

A diferenciação das células progenitoras neurais pode ser definida como o processo de determinação de um fenótipo específico para os neuroblastos ao fim da diferenciação celular. Embora a proliferação, migração e diferenciação sejam investigadas e discutidas separadamente, a fase inicial de diferenciação provavelmente inicia assim que os precursores neuronais completam sua última divisão e estão prontos para migrar em direção a placa cortical. Com a migração dos neurônios, a interação de sinais extracelulares e intracelulares sinaliza para a expressão de genes específicos que irão influenciar o fenótipo terminal, neuronal ou glial (Rice & Barone, 2000; Watson et al, 2006).

Sinaptogênese refere-se à formação das sinapses entre neurônios através de um processo elaborado em que a conexão envolve eventos bioquímicos e morfológicos. Para que isso ocorra neurônios migram para a placa cortical e sinais químicos orientam os dendritos em desenvolvimento na direção da sua localização final, onde surgem as sinapses. A sinaptogênese em ratos inicia-se, aproximadamente, no 12º dia embrionário e se estende até o PN16, com um pico significativo da sua atividade na segunda semana de desenvolvimento pós-natal (PN7) (Rice & Barone, 2000; Watson et al, 2006).

Uma quantidade muito maior de neurônios e processos celulares estão presentes no cérebro em desenvolvimento pós-natal, comparado ao cérebro adulto. O adequado neurodesenvolvimento exige a remoção sistemática de numerosos neurônios, através de eventos de morte celular programada, e eliminação do excesso de dendritos (Costa et al, 2004). A morte celular programada é mais acentuada nos neurônios pós-mitóticos durante o período pós-natal de sinaptogênese (Kim & Sun, 2011). Esse refinamento durante o desenvolvimento do SNC é responsável pela

seleção dos neurônios mais ativos, bem como sinapses mais efetivas para o melhor funcionamento do cérebro adulto. Os eventos de refinamento das sinapses podem se estender em roedores até a adolescência (PN35-45) (Costa et al, 2004; Watson et al, 2006).

O desenvolvimento pós-natal do SNC de ratos, período conhecido como “*brain growth spurt*” (do inglês rápido crescimento do cérebro), é consideravelmente crítico para o estabelecimento das corretas funções e conexões neurais durante o desenvolvimento, e acontece nos dez primeiros dias de vida pós-natal nos ratos (PN1-10). Nesse período ocorrem importantes alterações na conectividade sináptica, uma vez que a proliferação celular, migração, diferenciação, sinaptogênese, apoptose e mielinização, se sobrepõem de forma significativa nesta fase (Dobbing & Sands, 1979).

1.4 Períodos críticos de vulnerabilidade para o neurodesenvolvimento

O período de rápido desenvolvimento do sistema nervoso representa uma etapa muito sensível à influência de agentes ambientais, incluindo: toxicantes, processos inflamatórios, interação social e afetiva. Isso se deve principalmente ao fato de que um conjunto de processos essenciais, altamente regulados em termos temporais e regionais, ocorre durante o desenvolvimento neural (Rice & Barone, 2000).

Kolb e Gibb (2011) identificaram uma série de fatores ambientais que influenciam o neurodesenvolvimento no início do período pós-natal em roedores. A influência desses fatores, incluindo: estímulos sensoriais e motores, drogas psicoativas, inter-relações (pais e cuidadores), e estresse físico e/ou emocional apresentaram-se relevantes para o

desenvolvimento normal do SNC. Estudos recentes sugerem que estímulos ambientais específicos, podem inibir ou intensificar processos do desenvolvimento do cérebro, resultando em alterações no perfil de emocionalidade, interação social, comportamental ou cognitiva, na vida adulta em ratos (Kolb et al, 2011).

Durante as primeiras semanas de vida em roedores, importantes estruturas envolvidas em processamento cognitivo e emocional, como o hipocampo, não estão completamente desenvolvidas. É provável que interferências no desenvolvimento dessas estruturas possam acarretar alterações estruturais e funcionais de neurônios e/ou células gliais, transitórias ou permanentes de forma a aumentar o risco de desenvolver transtornos comportamentais (Koehl, 2015).

Estudos relacionados à neurociência do desenvolvimento continuam a avançar no entendimento dos mecanismos pelos quais as influências ambientais em períodos específicos do neurodesenvolvimento interagem diretamente com os genes (ex.: metilação do DNA, alteração em histonas). Esses mecanismos epigenéticos alteram a expressão gênica, sendo influenciados por experiências durante o desenvolvimento do SNC (Roth & Sweatt, 2011). Considerando esses fatos, muitos estudos têm buscado caracterizar o perfil dos processos celulares e moleculares, em humanos e roedores, no sentido de determinar as janelas de vulnerabilidade e demonstrar que alterações moleculares específicas, especialmente, durante esses períodos críticos do desenvolvimento neural pós-natal, podem produzir alterações neuroquímicas e comportamentais permanentes, contribuindo na gênese de neuropatologias na vida adulta (Obiorah et al, 2015; Yufune et al, 2015).

1.5 Desenvolvimento pós-natal do hipocampo em roedores

O desenvolvimento pós-natal do SNC é um período crítico para o estabelecimento correto da formação e refinamento das conexões sinápticas. No hipocampo de roedores, muitas dessas conexões alcançam a maturidade ao final da segunda semana de vida (Dobbing & Sands, 1979; Rice & Barone, 2000; Watson et al, 2006).

A formação hipocampal é uma estrutura que compreende o *Cornus ammonis* (região CA1, CA2 e CA3), giro denteado, córtex entorrinal e parahipocampal, e complexo subicular. No cérebro de roedores, este complexo de estruturas está localizado na região medial do lobo temporal (Figura 3) (Hayashi et al, 2015).

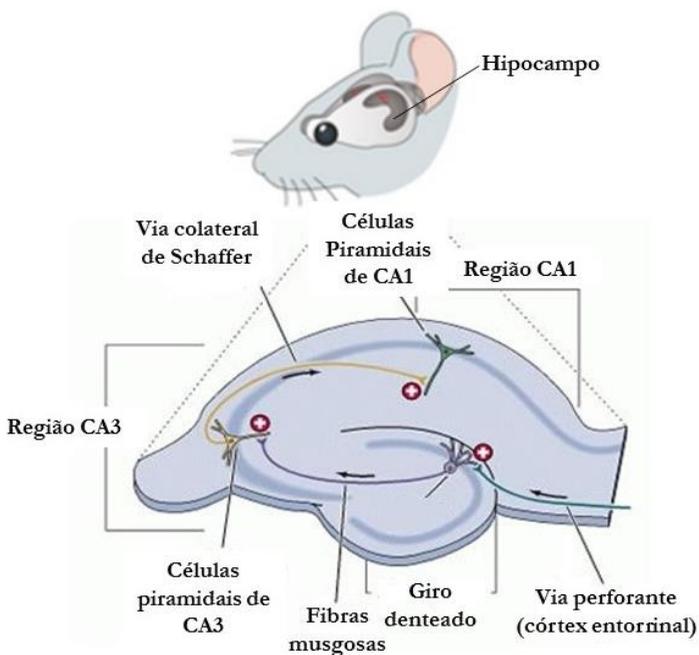


Figura 3. Regiões e vias que compõem o hipocampo de roedores. No cérebro de roedores, este complexo de estruturas está localizado na região medial do lobo temporal. Adaptado de (Hyde & Strowbridge, 2012).

O hipocampo de roedores é a única estrutura encefálica na qual a maior parte do desenvolvimento neuronal acontece no período pós-natal. No giro denteado, aproximadamente 85 % da neurogênese ocorre entre PN1-14, com um pico em PN7 (Altman & Bayer, 1990; Koehl, 2015; Obiorah et al, 2015).

O hipocampo faz parte do chamado sistema límbico, funcionalmente associado com memória espacial, bem como memória de curto e longo prazo (Hayashi et al, 2015). Assim, é muito provável que interferências durante o desenvolvimento neural dessa estrutura possa levar a consequências estruturais e funcionais, inclusive aumentando o risco de desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta (Koehl, 2015).

1.6 Proteínas cinases envolvidas no desenvolvimento neural

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são um grupo de serina/treonina cinases, ativadas por fosforilação que medeiam a transdução de sinal intracelular em resposta a diferentes estímulos. As MAPKs participam na regulação das atividades celulares de crescimento, diferenciação, sobrevivência e morte (Figura 4). 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 a p38^{MAPK} e JNK 1/2/3 (Chen et al, 2001; Thomas & Haganir, 2004).

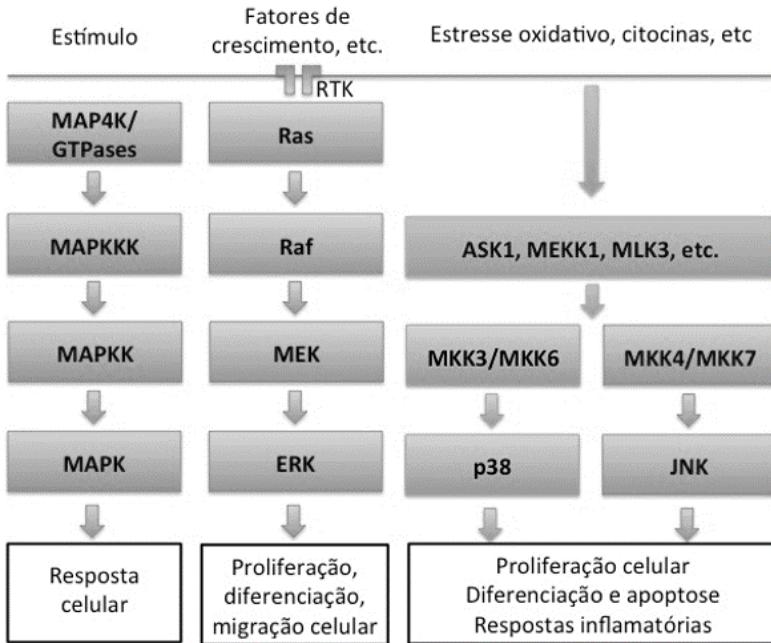


Figura 4. Esquema geral da ativação da via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). MAPKs operam em forma de cascata e medeiam a sinalização intracelular iniciada por fatores extracelulares ou intracelulares. MAP3Ks, que podem ser ativadas tanto por MAP4Ks ou GTPases, fosforilam MAP2Ks que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs. Uma vez ativadas, MAPKs fosforilam vários substratos, incluindo fatores de transcrição, regulando desta maneira uma variedade de atividades celulares, como proliferação, diferenciação, migração, respostas inflamatórias e morte celular. Em mamíferos, a família de MAPKs é composta principalmente por ERK, $p38^{MAPK}$ e JNK. RTK: receptor tirosina cinase. Adaptado de Kim e Choi (2010).

A ativação de ERK1/2, através da via de sinalização Ras-Raf-MEK, possui 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. Nesse sentido ERK1/2 têm sido demonstradas ser essenciais para o desenvolvimento neural e neuroplasticidade, participando dos processos de aprendizado e de formação de memória dependentes do hipocampo e na indução de potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD) (Kawasaki et al, 1999; Orban et al, 1999).

p38^{MAPK} e JNK1/2/3 podem ser ativadas por várias formas de estresse, e têm sido relacionadas com mecanismos de inflamação, resposta a estresse e morte celular (Kyriakis & Avruch, 1996; Takeda & Ichijo, 2002; Xia et al, 1995). No entanto, p38^{MAPK} e JNK1/2/3 também regulam o desenvolvimento e plasticidade do SNC (Bolshakov et al, 2000; Thomas & Huganir, 2004; Xiong et al, 2006; Zhen et al, 2001; Zhu et al, 2002).

Evidências crescentes mostram que a via de sinalização das MAPKs e seus reguladores “*upstream*” e “*downstream*” tem um papel fundamental em muitos processos indispensáveis para o desenvolvimento do SNC (Cheng et al, 2013; Jeanneteau et al, 2010; Qu et al, 2013). Assim, possíveis alterações na via de sinalização das MAPKs podem ser responsáveis por alterar o desenvolvimento neural (Pucilowska et al, 2012).

Apesar de extensos estudos sobre os mecanismos bioquímicos que regulam a atividade das MAPKs, bem como os seus papéis fisiológicos e patológicos na modulação das funções do SNC, o perfil ontogenético do conteúdo e da atividade das MAPKs, especialmente em estruturas específicas do SNC e durante o período pós-natal de ratos tem sido pouco estudado de forma sistemática (Oliveira et al, 2008).

Embora estudos em humanos sejam fundamentais para elucidar as bases biológicas da função neural, neurodesenvolvimento e distúrbios causados por alterações em períodos críticos do desenvolvimento, eles têm limitações intrínsecas significativas. Portanto, os modelos animais, especialmente os que utilizam ratos, demonstram ser bastante eficientes para definir o perfil neuroquímico normal durante as diversas fases do desenvolvimento do cérebro, e identificar os períodos críticos na organização dos sistemas que podem representar pontos de vulnerabilidade para acometimentos. Dentro desse paradigma salienta-se que uma compreensão temporal dos padrões de fosforilação e do conteúdo total das MAPKs (p38^{MAPK}, ERK1/2 e JNKp54/p46) durante desenvolvimento pós-natal é de grande importância para a compreensão do desenvolvimento fisiológico do SNC, bem como das possíveis alterações que podem decorrer por interferentes ambientais desse processo.

Estudos recentes tem demonstrado que alterações nas vias de sinalização das MAPKs (p38^{MAPK}, ERK1/2 e JNKp54/p46), obtidas através do uso de animais nocaute ou pelo uso de inibidores seletivos em períodos críticos para o desenvolvimento do SNC, acarretam transtornos do neurodesenvolvimento com danos cognitivos (Sato et al, 2011a; Yufune et al, 2015) e comportamentais permanentes (Pucilowska et al, 2015; Wefers et al, 2012), além de causar aumento na predisposição à doenças neurodegenerativas na vida adulta dos animais.

O hipocampo tem sido a estrutura amplamente utilizada para estudar a neuroplasticidade e o desenvolvimento neuropsicomotor em ratos; no entanto, surpreendentemente, pouco é conhecido sobre a ontogenia pós-natal de MAPKs nesta estrutura cerebral. A fim de

determinar esta característica, investigou-se o perfil ontogenético da fosforilação e do conteúdo total das MAPKs (p38^{MAPK}, ERK 1/2 e JNK p54/p46) no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal (PN1-60). Além disso, foi avaliado os efeitos de uma inibição pontual e transitória na via de sinalização de ERK1/2 em uma janela do desenvolvimento (PN7-14), em relação a alterações estruturais, celulares e moleculares do hipocampo, bem como no comportamento cognitivo e motor de ratos na vida adulta (PN55-63).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi determinar o perfil de atividade de MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal do SNC de ratos, bem como caracterizar seu papel no desenvolvimento. Dentro desse paradigma, buscou-se determinar o perfil de ativação das MAPKs no hipocampo bem como caracterizar possíveis alterações bioquímicas, morfológicas e comportamentais decorrentes da inibição da via de sinalização de Ras-Raf-MEK-ERK durante um período específico do desenvolvimento pós-natal do rato.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar o perfil de fosforilação e conteúdo total das MAPKs ($p38^{MAPK}$, ERK1/2 e JNKp54 /p46) no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal (PN1-60);

b) Verificar a possível correlação temporal de atividade de MAPKs ($p38^{MAPK}$, ERK1/2 e JNKp54/p46) com períodos críticos para a morte celular programada e sinaptogênese no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal;

c) Investigar modificações na estrutura sináptica do hipocampo de ratos que foram submetidos ao tratamento com inibidor de MEK/ERK (U0126; 5 mg/Kg; i.p.) durante o período crítico do desenvolvimento pós-natal (PN7-14).

d) Avaliar, no hipocampo de ratos, as possíveis alterações na fosforilação/expressão de proteínas sinápticas e de sinalização, incluindo sinapsina I, CaMKII, CREB e BDNF, após a administração de U0126 durante o período pós-natal PN7-14.

e) Determinar se a administração do inibidor de MEK/ERK no período crítico do desenvolvimento do SNC (PN7-14) altera a proliferação celular e a expressão de GFAP no hipocampo de ratos na vida adulta.

f) Investigar possíveis alterações de comportamentos dependentes do hipocampo na vida adulta de ratos pela administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento pós-natal (PN7-14).

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Nos modelos experimentais foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica (BQA-UFSC), em ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo PP00772/CEUA-UFSC).

3.2 Protocolo experimental I

3.2.1 Western blotting

Para determinar o perfil de fosforilação e conteúdo total das MAPKs (p38^{MAPK}, ERK 1/2 e JNK p54/p46) no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal (PN1-60) foi utilizada a técnica de western blotting, previamente padronizada pelo nosso grupo de pesquisa (Cordova et al, 2004; Leal et al, 2007) O preparo das amostras para eletroforese em gel de poli-acrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) foi realizado a partir de hipocampo de ratos coletados nas idades PN1, PN4, PN7, PN10, PN14, PN21, PN30 e PN60 (PN= dias pós-natal). Os hipocampos foram homogeneizados em tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0; EDTA 1 mM; NaF 100 mM; PMSF 0,1 mM; Na₃VO₄ 2 mM; Triton X-100 1%; glycerol 10%; coquetel inibidor de proteases); a seguir o homogeneizado foi submetido a centrifugação (10.000 ×g) por

10 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram diluídos 1:1 (v/v) em tampão de amostra para eletroforese (Tris 100 mM pH 6,8; EDTA 4 mM; SDS 8%) e incubados por 5 minutos a 100°C. Sobre essa solução de amostra foi adicionado tampão de diluição na proporção de 1:4 (40% glicerol, 50 mM de Tris e azul de bromofenol) e β -mercaptoetanol na concentração final de 5% (v/v). As proteínas totais das amostras foram dosadas pelo método de Lowry modificado (Peterson, 1977). A separação de proteínas foi realizada por SDS-PAGE utilizando géis 10% acrilamida/bis-acrilamida e logo a seguir foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Cordova et al, 2004; Leal et al, 2007). As membranas de nitrocelulose foram cortadas nas posições correspondentes às massas moleculares das proteínas de interesse. A seguir foram incubadas com anticorpos específicos contra formas fosforiladas ou totais conforme listado na Tabela 1. Primeiramente as membranas foram lavadas com solução salina tamponada com Tris (TBS; Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) e a seguir, sob temperatura ambiente (TA), foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado 5% diluído em TBS. Então as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%; Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) e incubadas com os anticorpos de interesse (Tabela 1) “*overnight*” a 4° C sob agitação constante. Após 3 lavagens de 5 min com TBS-T incubaram-se as membranas por 1 h a TA com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase. Por fim as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS, e reveladas por quimioluminescência. A densitometria das bandas foi determinada utilizando o programa Scion Image® versão Beta 3 (Frederick, MD, EUA). A expressão de fosforilação é dada como a razão da DO (densidade óptica) da forma fosforila/DO do conteúdo total, das

respectivas MAPKs. O conteúdo total foi obtido pela razão da DO do conteúdo total/DO da β -actina. Os dados representam média \pm E.P.M. e foram expressos como % de PN1.

Tabela 1: Massa molecular da proteína alvo e número do catálogo, fabricante e diluição dos anticorpos utilizados para western blotting.

ANTICORPO	MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA ALVO	FABRICANTE (CÓDIGO)	DILUIÇÃO
Anti-phospho-p38^{MAPK} (pThr ¹⁸⁰ /pThy ¹⁸²)	~ 38 kDa	Sigma (P1491)	1:1000
Anti-p38 MAPK	~ 38 kDa	Sigma (M 0800)	1:10000
Anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr ²⁰² / Tyr ²⁰⁴)	44-42 kDa	Cell Signalling Technology (#4370)	1:2000
Anti-Mitogen Activated protein kinase (ERK1&ERK2)	44-42 kDa	Sigma (M5670)	1:40000
Anti-phospho SAPK/JNK (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵)	46-54 kDa	Cell Signalling Technology (#9251)	1:1000
Anti-c-Jun N-Terminal Kinase (JNK1, JNK2)	46-54 kDa	Sigma (J4500)	1:5000
Anti β-actina	43kDa	Santa Cruz Biotechnology (sc- 47778)	1:2000
Anti-phospho-CaMKII (Thr ²⁸⁶)	50 kDa	Cell Signaling Technology (#3361)	1:1000

Anti-CaMKII (pan)	60, 50 kDa	Cell Signaling Technology (#3362)	1:1000
Anti-phospho-Synapsin Ia/b (Ser⁶²/Ser⁶⁷)	80, 86 kDa	Santa Cruz Biotechnology (sc-135709)	1:2000
Anti-Synapsin-1	77 kDa	Cell Singaling Technology (#5297)	1:1000
Anti-phospho-CREB (Ser¹³³)	43 kDa	Cell Singaling Technology (#9198)	1:1000
Anti-CREB	43 kDa	Cell Singaling Technology (#9197)	1:1000
Anti-BDNF	17 kDa	Santa Cruz Biotechnology (sc-546)	1:1000
Goat anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody	-	Millipore (AP308P)	1:2500
Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody	-	Millipore (AP132P)	1:5000

3.3 Protocolo experimental II

3.3.1 Tratamento *in vivo* com U0126

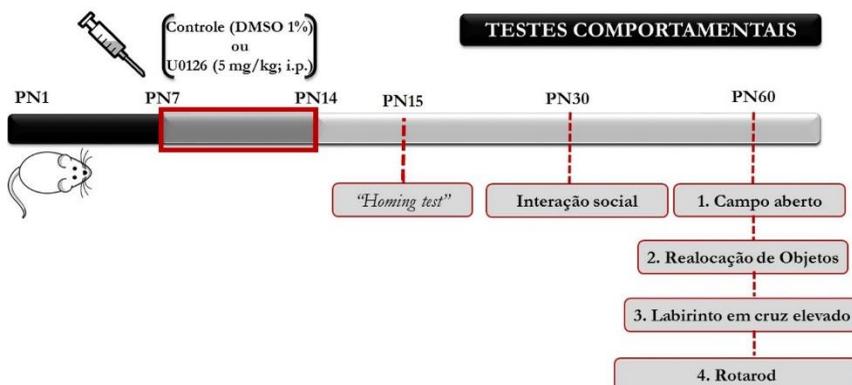


Figura 5. Desenho experimental de administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural em ratos. Ratos Wistar machos foram administrados com DMSO 1 % (Controle) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o 7º ao 14º dia pós-natal (PN= dias pós-natal). Os testes comportamentais foram realizados em três momentos específicos: (1) num período bem precoce (PN15); (2) durante o período da adolescência (PN30); (3) na vida adulta dos ratos (PN55-63).

Para a realização dos experimentos *in vivo*, foram utilizadas ninhadas de ratos Wistar machos (divididos em dois grupos). Os grupos foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com veículo (DMSO 1%) ou U0126 (inibidor de MEK 1/2; 5 mg/kg). Os tratamentos foram realizados no período do desenvolvimento entre o 7º e 14º dia pós-natal (PN7-14). Após o desmame (PN21), foram mantidos 4 animais por caixa. Os animais foram utilizados para avaliação de parâmetros comportamentais a partir do 15º dia pós-natal (PN15) e a partir do 30º dia pós-natal (PN30), e do 55º ao 63º dia pós-natal (PN55-63), em experimentos independentes.

Para análises neuroquímicas, os animais foram mortos no 7º, 15º, 30º-32º ou 60º-63º dia pós-natal. Os pesos corporais dos animais foram monitorados durante todo o período de tratamento até a vida adulta dos animais (PN1-63) e não apresentaram alterações significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Como medida de controle experimental de todas as análises, foram realizados experimentos utilizando animais injetados com salina 0,9 % i.p. (controle salina) e animais naive (que não receberam tratamento), nas mesmas condições já descritas para os tratamentos com U0126 ou DMSO 1%. Notavelmente, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos naive, os grupos tratados com salina e os grupos tratados com veículo (DMSO 1%). Dessa forma, os resultados foram apresentados em comparação ao grupo veículo (DMSO 1%), considerado como o grupo controle.

3.3.2 Western blotting

Os níveis de fosforilação e expressão de outras proteínas envolvidas na regulação da sinaptogênese e plasticidade neural também foram avaliados após administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) no período PN7-14 além de ERK1/2. Para determinar a ativação/expressão de proteínas, incluindo: sinapsina I, CaMKII, CREB e BDNF; foi utilizada a técnica de western blotting, previamente padronizada pelo nosso grupo de pesquisa (Cordova et al, 2004; Leal et al, 2007). No estudo da ação *in vivo* do U0126 (5 mg/kg; i.p) o hipocampo foi coletado ao final dos tratamentos nas idades: PN7 (após 6h da injeção única de U0126), PN15 (após 24 h do final da administração de U0126 – PN7-14), PN30-32 e PN60-63. O preparo das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) foi realizado a partir de

hipocampo de ratos coletados nas idades PN1, PN4, PN7, PN10, PN14, PN21, PN30 e PN60 (PN= dias pós-natal). Os hipocampus foram homogeneizados em tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0; EDTA 1 mM; NaF 100 mM; PMSF 0,1 mM; Na₃VO₄ 2 mM; Triton X-100 1%; glycerol 10%; coquetel inibidor de proteases); a seguir o homogeneizado foi submetido a centrifugação (10.000 ×g) por 10 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram diluídos 1:1 (v/v) em tampão de amostra para eletroforese (Tris 100 mM pH 6,8; EDTA 4 mM; SDS 8%) e incubados por 5 minutos a 100°C. Sobre essa solução de amostra foi adicionado tampão de diluição na proporção de 1:4 (40% glicerol, 50 mM de Tris e azul de bromofenol) e β-mercaptoetanol na concentração final de 5% (v/v). As proteínas totais das amostras foram dosadas pelo método de Lowry modificado (Peterson, 1977). A separação de proteínas foi realizada por SDS-PAGE utilizando géis 10% acrilamida/bis-acrilamida e logo a seguir foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Cordova et al, 2004; Leal et al, 2007). As membranas de nitrocelulose foram cortadas nas posições correspondentes às massas moleculares das proteínas de interesse. A seguir foram incubadas com anticorpos específicos contra formas fosforiladas ou totais conforme listado na **Tabela 1**. Primeiramente as membranas foram lavadas com solução salina tamponada com Tris (TBS; Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) e a seguir, sob temperatura ambiente (TA), foram bloqueadas por 1 h com leite desnatado 5% diluído em TBS. Então as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%; Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) e incubadas com os anticorpos de interesse (Tabela 1) “*overnight*” a 4° C sob agitação constante. Após 3 lavagens de 5 min com TBS-T incubaram-se as membranas por 1 h a TA com o anticorpo

secundário anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado à peroxidase. Por fim as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS, e reveladas por quimioluminescência. A densitometria das bandas foi determinada utilizando o programa Scion Image® versão Beta 3 (Frederick, MD, EUA). A expressão de fosforilação é dada como a razão da DO (densidade óptica) da forma fosforila/DO do conteúdo total, das respectivas MAPKs. O conteúdo total foi obtido pela razão da DO do conteúdo total/DO da β -actina. Os dados representam média \pm E.P.M. e foram expressos como % do controle (veículo; DMSO 1%).

3.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para verificar as alterações na estrutura sináptica após a administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) no período de intensa sinaptogênese no SNC de ratos (PN7-14), amostras de hipocampo foram preparadas para análise por microscopia eletrônica de transmissão em colaboração com o laboratório da Professora Dra. Ana Lúcia de Paul, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidad Nacional de Córdoba (Projeto CAPES/MINCYT). No estudo da ação *in vivo* do U0126 (5 mg/kg; i.p) o hipocampo foi coletado ao final dos tratamentos nas idades: PN15 e PN30. O hipocampo dos ratos foi fixado por imersão na solução de Karnovsky, contendo 2 % (v/v) de glutaraldeído e 4 % (v/v) de paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato (pH 7,3) com 7 % de sacarose. Após a fixação, as amostras de hipocampo foram lavadas com 0,1 M de tampão cacodilato (pH 7,3) e pós-fixadas com 1 % de tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) em 0,1 M de tampão cacodilato (pH 7,3) por 1h e 30 min sob agitação constante a temperatura ambiente. Em seguida, os hipocampos foram desidratados com um

gradiente crescente de acetonas (50 %-100 %) e incluídos em resina Araldita (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Após a inclusão em resina, os hipocampos foram cortados com lâmina de diamante em JEOL JUM-7 ultra micrótomo (Nikon, Tokyo, Japão). E os cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo, e analisados usando um microscópio eletrônico Zeiss equipado com uma câmera digital Megaview III (Oberkochen, Alemanha).

3.3.4 Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais foram conduzidos entre 9 h-13 h, a fim de evitar a influência do ciclo circadiano nos testes analisados. Os animais foram aclimatados na sala de comportamento por, no mínimo, 1 h antes do início dos procedimentos experimentais. Os animais foram manipulados pelo mesmo experimentador. Uma bateria de testes comportamentais foi realizada nos grupos de animais (n= 5-10), começando com do menos para o mais aversivo, com intervalo de um dia entre os testes. Para avaliar os possíveis efeitos causados pela administração de U0126 (5 mg/kg, i.p.) durante o período PN7-14 sobre o comportamento dos animais, os mesmos foram submetidos a testes comportamentais em três momentos específicos: (1) num período bem precoce (PN15); (2) durante o período da adolescência (PN30); (3) na vida adulta dos ratos (PN60) (Figura 5). Para isso, foram utilizados testes previamente padronizados para avaliação de parâmetros de atividade locomotora, comportamento social, ansiedade e cognição dos animais. Os testes comportamentais foram realizados em uma sala com atenuado som e sob baixa intensidade de luz (12 lx), monitorados através de uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato experimental e as imagens

analisadas; e em uma sala adjacente, um experimentador que desconhecia o grupo experimental dos animais testados analisou os testes. Os parâmetros comportamentais avaliados foram analisados utilizando o programa ANY-maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA).

3.3.4.1 “Homing test”

O “homing test” (do inglês) é considerado um indicador válido da preferência social em roedores neonatos (Allewaert & Bignami, 1986). Para verificar a capacidade dos animais neonatos em reconhecer a maravalha familiar, como indicador da capacidade desses animais de reconhecer estímulos olfatórios maternos, foi utilizado o “homing test” (do inglês). No 15º dia pós-natal (PN15) os ratos foram isolados em uma caixa limpa por 30 min a temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Após foram colocados individualmente em uma caixa (36 cm x 22,5 cm, com paredes de 10 cm de altura) com um metade da caixa com maravalha limpa (não familiar) e a outra metade com maravalha da caixa familiar. Os animais foram colocados do lado oposto ao familiar, e então analisado o tempo (em segundos) para alcançar o lado familiar da caixa (tempo total: 5 min) (Macri et al, 2010).

3.3.4.2 Teste do Campo Aberto

A atividade locomotora espontânea foi avaliada no teste do campo aberto, usando os métodos descritos previamente (Prediger et al, 2008). Para o teste do campo aberto foi utilizado o aparato, feito de madeira coberto com fórmica impermeável com piso cinza e paredes cinza com 40 cm de altura com uma referência visual em uma das paredes do campo aberto: para os animais jovens (PN30) no tamanho de 40 cm x 40 cm, e

para os animais adultos (PN60) no tamanho de 100 cm × 100 cm. Os ratos foram colocados individualmente no centro da arena de madeira e deixados ali para explorarem o campo aberto por um período de 15 min durante 2 dias consecutivos. A distância total percorrida (em metros) e a velocidade média (metros/segundo), foram avaliados pelo software ANYmaze® (Stoelting, EUA). Após o final do teste e antes de iniciar o teste com o animal subsequente, a arena foi cuidadosamente limpa com solução de etanol 10% e seca com papel toalha.

3.3.4.3 Teste de interação social

O protocolo do teste de interação social foi adaptado de estudos anteriores (Koros et al, 2007). A habituação à caixa de teste (40 x 40 x 40 cm) foi realizada em dois dias consecutivos, nos quais os animais exploraram a caixa durante 10 min por dia. No dia do teste, dois ratos de ninhadas diferentes, que tinham recebido o mesmo tratamento e que não haviam sido previamente familiarizados entre si foram colocados simultaneamente no interior da caixa de teste em cantos opostos. Os comportamentos de interação social foram avaliados durante 10 min e, em seguida, os animais foram devolvidos às gaiolas moradia de origem. Para evitar a presença de pistas olfatórias, ao final de cada teste, o equipamento foi limpo com uma solução de etanol 10% e seco com papel toalha. Os comportamentos sociais avaliados durante o teste incluíram: cheirar, seguir, montar, pular sobre e rastejar por baixo do parceiro. O tempo gasto por cada rato da dupla realizando os comportamentos descritos acima foi somado para gerar o tempo de interação social da dupla de animais (Matheus et al, 2015).

3.3.4.4 Realocação de Objetos

O teste de realocação de objetos tem sido utilizado como um modelo comportamental de memória dependente do hipocampo (Assini et al, 2009). Foram avaliados os efeitos da administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a memória de curta duração (do inglês “*short-term memory*”). O aparato, feito de madeira coberto com fórmica impermeável com piso cinza de 100 cm × 100 cm e paredes cinza com 40 cm de altura com uma pista em uma das paredes do campo aberto. Os objetos foram dois cilindros idênticos (12 cm x 7 cm x 5cm) colocados a distância de 40 cm entre eles, e 20 cm da borda do campo aberto. O procedimento consistiu em um período de treino (3 min), na qual o animal foi colocado na caixa e explorava-a livremente; e após o treino, os animais foram colocados em outra caixa e aguardaram até o momento do teste (intervalo). Após um intervalo de 30 min, os animais foram submetidos a uma sessão de teste (3 min). No momento do teste os animais foram colocados novamente no aparato com os dois objetos, porém um dos objetos foi realocado para o lado oposto (Figura 6). Os comportamentos de cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância foram considerados como exploração do objeto. Os resultados foram avaliados pelo software ANYmaze® (Stoelting, EUA). Após o final do teste e antes de iniciar o teste com o animal subsequente, a arena foi cuidadosamente limpa com solução de etanol 10% e seca com papel toalha.

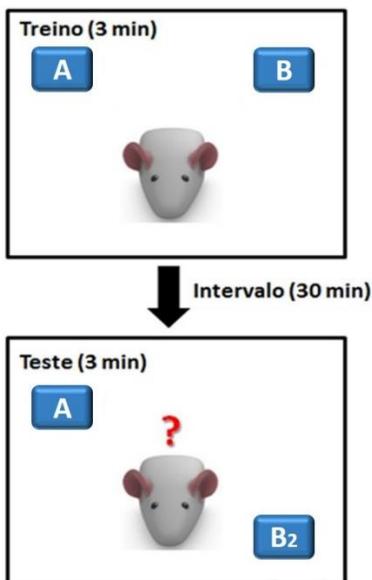


Figura 6: Esquema ilustrativo do teste de realocação de objetos. No teste de realocação de objetos, foi contabilizado o tempo total de investigação dos objetos na sessão de treino (3 min) e o tempo gasto explorando dois objetos idênticos A e B. O índice de realocação (%) dos animais foi calculado a partir do tempo de investigação no teste. No período do teste, o objeto B foi realocado (agora representado como B₂; figura 6), enquanto o objeto A permaneceu na mesma posição e é referido como A. A porcentagem de tempo gasto explorando o objeto realocado relacionada com o tempo total de exploração foi calculada usando a fórmula do índice de reconhecimento ($B_2 \cdot 100 / B_2 + A$) (Assini et al, 2009).

3.3.4.5 Labirinto em cruz elevado

Um dos modelos mais amplamente utilizados na análise da ansiedade em ratos e camundongos é o labirinto em cruz elevado, que é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. O teste baseia-se na premissa que ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de

aproximação/esquiva. Os padrões comportamentais observados representam uma análise da combinação de atividades exploratórias, movimentos de esquiva e comportamento motor de forma geral. O aparato consistiu de um labirinto de madeira recoberto por fórmica preta composto de dois braços abertos opostos (50 cm x 10 cm) cercados por uma borda de acrílico de 1 cm, e dois braços fechados (50 cm x 10 cm x 40 cm), elevados a 50 cm do solo por um suporte de madeira. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) era de 10 cm x 10 cm (Carobrez & Bertoglio, 2005). Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato voltado para um dos braços fechados sendo permitido explorar livremente o aparato durante 5 min. Os experimentos foram gravados permitindo a leitura posterior dos comportamentos realizados pelo animal (Lister, 1987). O aparato foi limpo com uma solução de etanol (10%) e seco com toalhas de papel após cada ensaio para evitar o odor de impregnação. O número de entradas (definida pela colocação das quatro patas num braço) e o tempo de permanência gasto nos braços abertos e fechados foram registrados. A porcentagem do número de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência nos braços abertos foram calculados pelo número de entradas nos braços abertos dividido pelo número total de entradas nos braços. O número de entradas do braço fechado foi utilizado como uma medida da atividade locomotora (Cruz et al, 1994; Dawson & Tricklebank, 1995).

3.3.4.6 Avaliação da coordenação motora utilizando Rotarod

O rotarod foi utilizado para avaliar os efeitos da administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período crítico do desenvolvimento

neural (PN7-14) sobre a coordenação motora. O aparelho rotarod (Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), consiste em um cilindro de metal com 6 cm de diâmetro, elevado a uma altura de 16 cm e separado por compartimentos com largura de 9 cm. Primeiro foi realizada uma sessão de habituação, em que cada um dos ratos permaneceu sobre o aparelho (sem rotação) durante 30s. Foram permitidas tantas tentativas quanto necessário para atingir este critério. Em seguida, uma sessão de treinamento foi realizada, em que os animais tiveram 3 tentativas para permanecer por 90s sobre o aparelho em rotação (5 rpm). Somente os animais que foram capazes de executar por 90s durante a sessão de treino foram escolhidos para o teste. O teste foi realizado 30 minutos após o treino. Cada animal foi posicionado no aparelho em movimento e seu tempo de latência para cair do cilindro foi contabilizado. A velocidade de partida foi de 5 rpm e foi aumentada em 0,1 rotações por segundo ao longo de um período máximo de 300 segundos (Aguiar et al, 2009).

3.3.5 Imunoistoquímica

Para determinação da proliferação celular, através das células positivas para Ki-67 (marcador endógeno de proliferação celular); e imunoconteúdo de proteína glial fibrilar foram realizadas imunoistoquímica a partir de amostras de hipocampo de ratos na vida adulta (PN63). Os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral (40%), e em seguida perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina (NaCl 0,9%), seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M (pH 7,4). Após a perfusão, os cérebros foram removidos e pós-fixados na mesma solução fixadora durante 24 h à temperatura ambiente e crioprotetidos por imersão em

solução de sacarose 30% em PBS 0,1 M a 4°C até saturarem. Após, os cérebros foram congelados por imersão em isopentano resfriado e armazenados em congelador (-80°C) para as análises posteriores. Cortes coronais (30 µM) em série de hipocampo foram obtidos com um criostato (Leica) a -25°C. O imunoconteúdo de GFAP foi avaliado por imunofluorescência. Os cortes foram primeiramente bloqueados com 5% de soro de cavalo, diluído em PBS 0,1 M contendo 2% de Triton X-100, durante 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados overnight a 4 °C com o anticorpo de camundongo anti-GFAP, em 1% de soro de cavalo diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100. Após três lavagens em PBS 0,1 M, os cortes de tecido foram incubados com o anticorpo anti-camundongo Alexa fluor 488 em 1% de soro de cavalo diluído em PBS 0,1 M contendo 0,5% de Triton X-100, durante 2 horas à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes com PBS 0,1 M durante 10 minutos. Por fim, os cortes foram novamente lavados três vezes com PBS 0,1 M e montados em lâminas com meio de montagem CC/mount e cobertos com lamínulas. As imagens dos cortes de hipocampo foram capturadas em um microscópio confocal Olympus FVi-10 e examinadas com o software Image J.

Para a determinação da proliferação celular, foi realizada imunistoquímica para Ki-67 (marcador endógeno do ciclo celular). Ki-67 é um marcador mitótico que é expresso durante todas as fases do ciclo celular (G₁, S, G₂ e M) (Scholzen & Gerdes, 2000). Uma série separada de fatias do hipocampo foi incubada com ácido cítrico (TCA 10 mM) por 5 min (duas vezes) a 95°C, para desnaturar e abrir a dupla fita de DNA (técnica de exposição do antígeno). Após três lavagens com TBS 0,1 M; as fatias foram transferidas para uma solução contendo: peróxido de

hidrogênio (3 %) e metanol (10 %), em TBS 0,1 M por 10 min a temperatura ambiente (TA). Os cortes foram bloqueados com solução de bloqueio 5 % (soro de cabra 5 % com Triton X-100 em TBS 0,1 M) e incubadas com o anticorpo primário anti-Ki-67 (rabbit polyclonal anti-Ki67; 1:400; Vector; VP-K451) por 48 h a 4°C. Após três lavagens em TBS 0,1 M, os cortes de tecido foram incubados com o anticorpo secundário anti-coelho biotilado (biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG; 1:200; Sigma-Aldrich) em solução de bloqueio 5 % a TA por 2 h. Após as lavagens, foram incubados com um complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit PK4000, Vector Laboratories) por 1 h e lavados três vezes com TBS 0,1 M. Como substrato para a reação com a peroxidase, os cortes de tecido foram expostos ao DAB (2,2-diaminobenedina; DAB; Sigma-Aldrich) por 10-15 min. Os cortes de tecido foram lavados com TBS 0,1 M; montados em lâminas gelatinizadas (2 %) e desidratadas com uma série crescente de álcoois, seguido de xilol (5 min cada incubação). Por fim, os cortes de tecidos foram montados em lâminas com meio Permount e cobertos com lamínulas. As imagens dos cortes de hipocampo foram capturadas em um microscópio convencional Olympus BX51 e examinadas com o software Image J.

3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.), os gráficos foram confeccionados utilizando o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). As análises estatísticas foram executadas no software Statistica 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). No estudo referente ao perfil de fosforilação de

MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal (PN1-60) os resultados foram analisados através de ANOVA de uma via, seguido pelo teste posthoc de Tukey, quando apropriado. Nos estudos neuroquímicos e comportamentais, relativos à ação do inibidor de MEK/ERK (U0126) administrado no período PN7-14, as análises foram realizadas pelo Teste t não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Observa-se que a possível diferença entre os controles: salina (NaCl 0,9%), DMSO 1% ou naive foi analisada através da ANOVA de uma via seguida pelo teste posthoc de Tukey quando apropriado. A avaliação não mostrou diferença significativa entre esses controles (dados não mostrados).

4 RESULTADOS

4.1 Perfil de fosforilação das MAPKs no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal

Diversos estudos têm demonstrado a modulação das vias das MAPKs na regulação de processos fundamentais durante o desenvolvimento do SNC (Cheng et al, 2013; Jeanneteau et al, 2010; Qu et al, 2013). As principais MAPKs são: ERK 1/2, JNK 1/2/3 e p38^{MAPK} (Chang & Karin, 2001; Chen et al, 2001; Thomas & Huganir, 2004). Entretanto, não tem sido estabelecido um perfil da modulação/expressão dessas cinases no hipocampo durante o desenvolvimento pós-natal do SNC em ratos Wistar.

O perfil de ativação das MAPKs no desenvolvimento pós-natal foi analisado por western blotting no hipocampo de ratos em oito idades específicas do desenvolvimento do SNC. Foram elas: 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 e 60 dias após o nascimento (PN). Os resultados da fosforilação e da forma total das MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal no hipocampo de ratos apresentou uma regulação bastante distinta entre as proteínas analisadas (ERK 1/2, JNK p54/p46 e p38^{MAPK}).

A análise da fosforilação de JNK p54/p46 por western blotting no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal (PN1-60) é apresentada na Figura 7. A fosforilação de JNK p54/p46 na idade de um dia pós-natal (PN1) foi normalizada em 100% para estabelecer a comparação de conteúdo e fosforilação dessa proteína com a demais idades analisadas. Notavelmente, as isoformas de JNK analisadas não apresentaram alterações de fosforilação significativas (Figura 7B e 7D) no período de desenvolvimento avaliado (JNK p54: $F(7,48)=0,64$;

$p=0,716$ e JNK p46: $F(7,48)=1,50$; $p=0,192$). Entretanto, a forma total de JNK p54 variou de forma significativa nas idades PN4, PN10 a PN14 que corresponde ao período de rápido crescimento cerebral pós-natal em ratos ($F(7,48)=3,41$; $p=0,004$) (Figura 7C). A forma total de JNK p46 não a apresentou variações durante o período pós-natal analisado ($F(7,48)=1,21$; $p=0,314$) conforme demonstrado na Figura 7E.

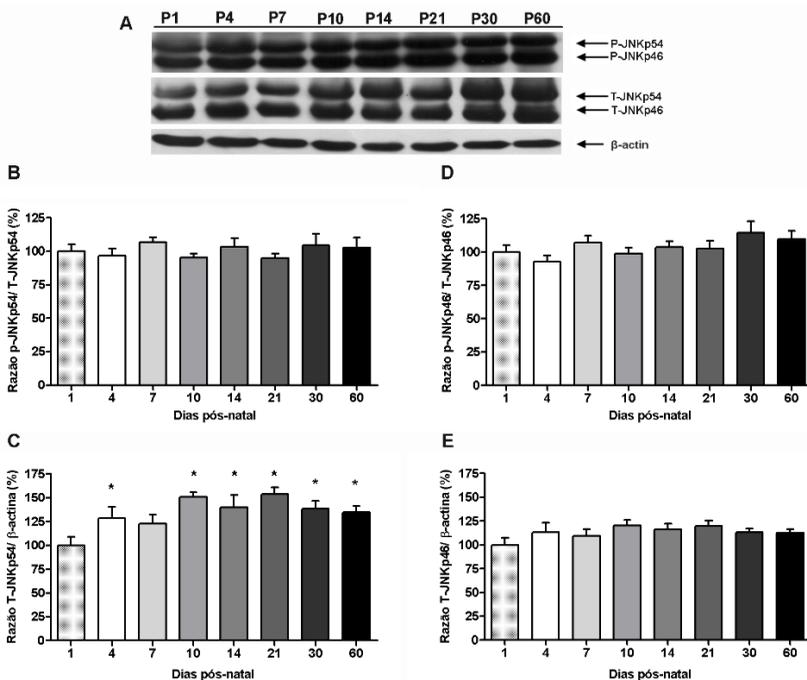


Figura 7. Análise por western blotting da fosforilação JNK p54/p46 e de seu conteúdo total durante o desenvolvimento pós-natal no hipocampo de ratos. (A) Immunoblotting representativo de p-JNK p54/p46, total-JNK p54/p46 e β -actina de ratos nas idades: 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 e 60 dias pós-natal (PN). (B) Quantificação da fosforilação de JNK p54. (C) Quantificação do conteúdo total de JNK p54. (D) Quantificação da fosforilação de JNK p46. (E) Quantificação do conteúdo total de JNK p46. A fosforilação foi determinada pela razão entre a densidade ótica (DO) da forma fosforilada e total, e o conteúdo total pela razão entre a DO da forma total e β -actina. Os resultados representam a média \pm erro

padrão e são expressos como percentuais relativos ao 1º dia pós-natal (PN1 = 100%); n = 7; *p < 0,05 em relação a PN1; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

A fosforilação das isoformas da cinase regulada por sinal extracelular, ERK 1 e ERK 2, apresentou um aumento dependente da idade no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal (PN1-60) (ERK 1: $F(7,56)=8,52$; $p=0,0000005$ e ERK 2: $F(7,56)=3,53$; $p=0,003$) como demonstrado na Figura 8. A fosforilação de ERK 1 exibiu um aumento significativo em PN4 ($p=0,014$). Esse aumento na fosforilação de ERK 1 é significativamente amplificado em idades posteriores, aproximadamente duas vezes, quando comparado a PN1 (Figura 8B). Diferentemente, a fosforilação de ERK 2 é relativamente elevada em PN1 (quando comparada com ERK 1) e se mantém constante até PN10, apresentando um aumento significativo na sua fosforilação mais tardio, observado a partir de PN14 ($p=0,039$) e se mantendo constante até PN60 ($p=0,0005$, comparado a PN1) (Figura 8D). Os resultados também demonstraram uma diferença significativa na forma total de ERK 1 e ERK 2 durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos (ERK 1: $F(7,56)=2,38$; $p=0,033$ e ERK 2: $F(7,56)=4,38$; $p=0,0006$) (Figura 8C e 8E). A forma total de ERK 1 apresentou um aumento significativo nas idades PN10, PN21 e PN60; enquanto a forma total de ERK 2 aumentou a partir de PN10, e se manteve elevada, até PN60.

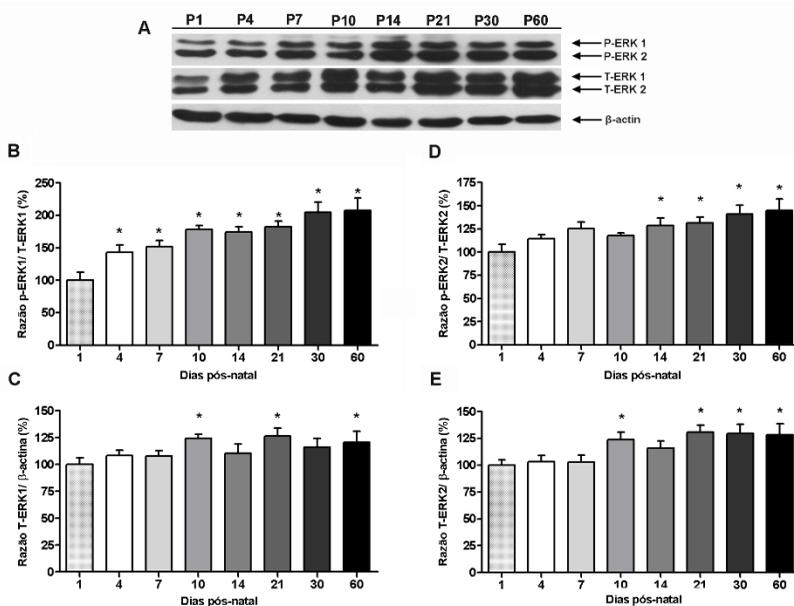


Figura 8. Análise por western blotting da fosforilação ERK 1/2 e de seu conteúdo total durante o desenvolvimento pós-natal no hipocampo de ratos. (A) Immunoblotting representativo de p-ERK 1/2, total-ERK 1/2 e β -actina de ratos nas idades: 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 e 60 dias pós-natal (PN). (B) Quantificação da fosforilação de ERK 1. (C) Quantificação do conteúdo total de ERK 1. (D) Quantificação da fosforilação de ERK 2. (E) Quantificação do conteúdo total de ERK 2. A fosforilação foi determinada pela razão entre a densidade ótica (DO) da forma fosforilada e total, e o conteúdo total pela razão entre a DO da forma total e β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressos como percentuais relativos ao 1º dia pós-natal (PN1 = 100%); n = 7; *p < 0,05 em relação a PN1; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

A fosforilação de p38^{MAPK} durante o período pós-natal (PN1-60) exibiu uma regulação do tipo bimodal ($F(7,48)=3,91$; $p=0,002$) (Figura 9). Os resultados apresentados demonstram um aumento significativo na fosforilação de p38^{MAPK} em PN4 ($p=0,036$), quando comparado com PN1. Esse aumento retorna aos níveis iniciais de fosforilação em PN7 ($p=0,510$). Contudo, a fosforilação de p38^{MAPK} se apresenta novamente aumentada de forma significativa em P10 ($p=0,032$) com um gradual

decréscimo em PN14 ($p=0,165$). Em continuidade da avaliação do perfil de fosforilação de $p38^{MAPK}$ observa-se aumento significativo em PN21 ($p=0,011$) e que se mantém significativo, comparado a PN1, durante o restante do período (PN30, $p=0,025$; PN60, $p=0,007$) (Figura 9B). A forma total de $p38^{MAPK}$ não apresentou alterações significativas comparada com a expressão de β -actina durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos nas idades analisadas ($F(7,56)=1,23$; $p=0,301$) (Figura 9C). Deve ser salientado que o conteúdo de β -actina não apresentou modificação durante desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos nas idades analisadas ($F(7,56)=1,34$; $p=0,250$).

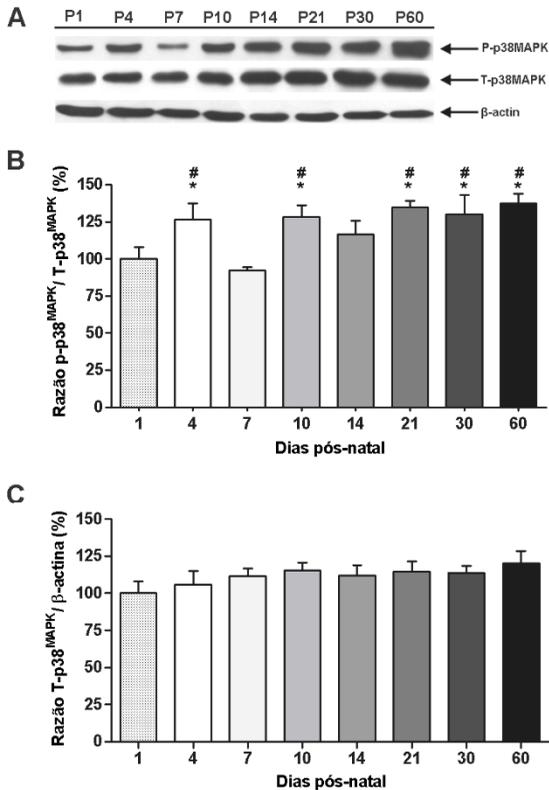


Figura 9. Análise por western blotting da fosforilação p38^{MAPK} e de seu conteúdo total durante o desenvolvimento pós-natal no hipocampo de ratos. (A) Immunoblotting representativos de p-p38^{MAPK}, total-p38^{MAPK} β -actina de ratos nas idades: 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 e 60 dias pós-natal (PN). (B) Quantificação da fosforilação de p38^{MAPK}. (C) Quantificação do conteúdo total de p38^{MAPK}. A fosforilação foi determinada pela razão entre a densidade ótica (DO) da forma fosforilada e total e o conteúdo total pela razão entre a DO da forma total e β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressos como percentuais relativos ao 1º dia pós-natal (PN1 = 100%); n = 7; *p < 0,05 em relação a PN1 e #p < 0,05 em relação ao PN7; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

4.2 Inibição de MEK 1/2 em período específico do desenvolvimento do sistema nervoso central

O desenvolvimento cerebral pós-natal é um período crítico para a formação das conexões sinápticas, uma vez que eventos como a proliferação celular, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose, são importantíssimos nessa distinta janela do desenvolvimento do SNC (Dobbing & Sands, 1979; Rice & Barone, 2000; Watson et al, 2006).

A ativação de ERK 1/2 através da cascata de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK em resposta a fatores de crescimento e neurotransmissores pode modular a expressão gênica, controlando processos essenciais para o desenvolvimento do SNC, incluindo a proliferação celular e diferenciação, embriogênese, morte e sobrevivência celular bem como regulação da neuroplasticidade (Cheng et al, 2013; Li et al, 2012). Portanto, nesse estudo foram verificados possíveis danos neuroquímicos e comportamentais advindos da inibição de MEK 1/2 (obtido pela administração de U0126; 5 mg/kg; i.p.), durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14). Os parâmetros avaliados incluíram: a ativação de proteínas envolvidas na plasticidade sináptica, alterações na estrutura das sinapses no hipocampo e proliferação celular, medidos na vida adulta; bem como parâmetros comportamentais avaliados nas idades pós-natal PN15, PN30 e PN60 de ratos Wistar.

4.2.1 Inibição da fosforilação de ERK 1 após a administração de inibidor de MEK 1/2.

Recentemente foi demonstrado que a fosforilação de ERK 1/2 durante o período crítico do desenvolvimento pós-natal é requerida para

o refinamento adequado das funções do SNC (Yufune et al, 2015). No hipocampo de roedores, muitas das conexões alcançam a maturidade por volta do final da segunda semana de vida pós-natal, seguindo um perfil aparentemente comum a uma grande variedade de espécies, incluindo humanos e roedores (Rice & Barone, 2000). Notavelmente, MAPKs e seus alvos têm sido implicados na regulação da plasticidade e desenvolvimento do hipocampo (Thomas & Huganir, 2004).

Para verificar o envolvimento da cascada de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK no desenvolvimento do SNC de ratos durante um período crítico (PN7-14), foi investigado, primeiramente, se a administração de U0126 (inibidor de MEK 1/2) seria capaz de alterar a fosforilação de ERK 1/2. Dessa forma, os animais foram injetados intraperitonealmente em PN7 com U0126 (5 mg/kg) e o nível de fosforilação de ERK 1/2 analisado 6 h após a injeção do inibidor em amostras de hipocampo (Figura 10). Notavelmente, a administração do U0126 provocou uma diminuição de aproximadamente 15 % na fosforilação de ERK 1 (Teste t: $p=0,027$) comparada ao controle (DMSO 1 %). No entanto, não houve uma inibição significativa na fosforilação de ERK 2 (Teste t: $p=0,092$) quando comparada ao controle. O conteúdo total de ERK 1/2 não foi alterado após a administração de U0126 em PN7 (ERK 1: $p=0,684$; ERK 2: $p=0,842$). Resultados similares (dados não mostrados) foram encontrados utilizando outro inibidor de MEK1/2, SL327, nas mesmas condições testadas com U0126.

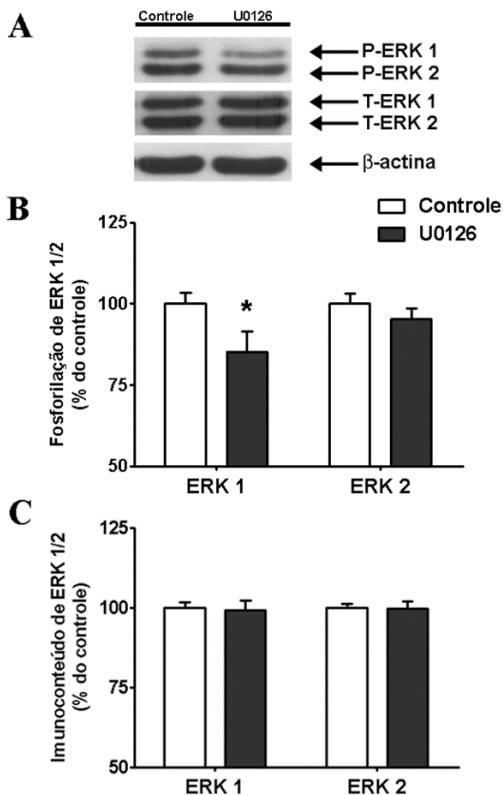


Figura 10. Análise por western blotting da fosforilação ERK 1/2 e de seu conteúdo total após administração única de U0126 (5 mg/kg; i.p.) em PN7. (A) Immunoblotting representativos de p-ERK 1/2, T-ERK 1/2 e β -actina de amostras de hipocampo de ratos após 6h da administração única de U0126 (5 mg/kg; i.p.) em PN7. (B) Quantificação da fosforilação de ERK 1/2. (C) Quantificação do conteúdo total de ERK 1/2. A fosforilação foi determinada pela razão entre a densidade ótica (DO) da forma fosforilada e total, e o conteúdo total pela razão entre a DO da forma total e β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressos como percentuais relativos ao controle (DMSO 1% = 100%); n = 7; *p < 0,05 em relação ao controle; Teste t.

A partir do resultado anterior o inibidor de MEK1/2, U0126, foi selecionado para os estudos posteriores, entretanto, sendo administrado diariamente durante a segunda semana de vida pós-natal (PN7-14) na

dose de 5 mg/kg. Os resultados mostraram que, apesar da eficiência de U0126 em inibir significativamente a fosforilação de ERK1 cerca de 6 h após sua administração (Figura 10); este efeito não foi verificado 24 h após a última injeção de U0126 (PN15: ERK 1: $95,51 \% \pm 7,00$; $p=0,398$; ERK 2: $96,04 \% \pm 4,38$; $p=0,248$) e em períodos tardios (PN30 e PN60) do desenvolvimento pós-natal (Figura 11B e 11D). Além disso, observa-se que as formas totais de ERK 1/2 não apresentaram alterações, após a administração de U0126 durante o período de PN7-14, em nenhuma das idades avaliadas (PN15, PN30 ou PN60; Figura 11C e 11E).

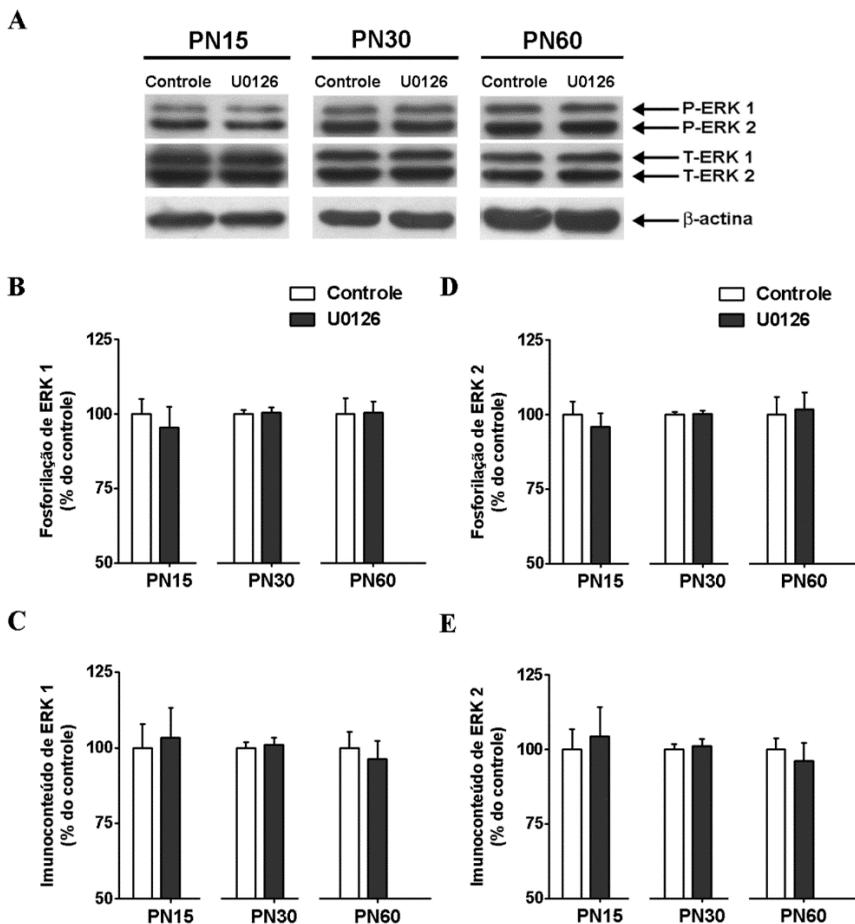


Figura 11. Análise por western blotting da fosforilação ERK 1/2 e de seu conteúdo total após administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14. (A) Immunoblotting representativos de p-ERK 1/2, T-ERK 1/2 e β -actina de ratos nas idades: 15, 30 e 60 dias pós-natal (PN) após administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14. (B) Quantificação da fosforilação de ERK1. (C) Quantificação do conteúdo total de ERK1. (D) Quantificação da fosforilação de ERK2. (E) Quantificação do conteúdo total de ERK2. A fosforilação foi determinada pela razão entre a densidade ótica (DO) da forma fosforilada e total, e o conteúdo total pela razão entre a DO da forma total e β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressos como percentuais relativos ao controle (DMSO 1 %); n = 8; Teste t.

Os níveis de fosforilação e expressão de outras proteínas envolvidas na regulação da sinaptogênese e plasticidade neural também foram avaliados após administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) no período PN7-14 além de ERK1/2. Nesse sentido, foram verificadas as seguintes proteínas: sinapsina I, CaMKII α/β , CREB e BDNF; nas idades de PN15 (24 h após a última administração de U0126) e PN30, como demonstrado nas figuras 12, 13 e 14. Os resultados mostraram apenas uma tendência na diminuição nos níveis de fosforilação da sinapsina I (p-Ser62/67) em PN15 (U0126: 90,04 % \pm 6,94; p=0,09; Figura 12) e PN30 (U0126: 93,52 % \pm 3,74; p= 0,07; Figura 14). Enquanto as formas totais e fosforilada de CaMKII e CREB não foram alteradas, assim como o conteúdo de BDNF tanto em PN15 como em PN30.

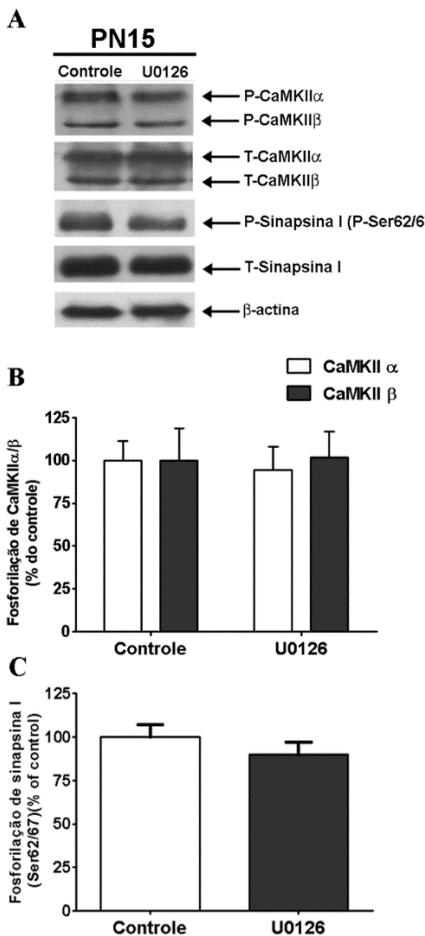


Figura 12. Avaliação da fosforilação de CaMKII α/β (p-Ser286) e sinapsina I (p-Ser 62/67) medida em PN15 em resposta à administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14. (A) Immunoblotting representativos de p-CaMKII α/β (p-Ser 286), T-CaMKII α/β , p-sinapsina I (p-Ser 62/67), T-sinapsina I e β -actina de amostras de hipocampo 24 h (PN15) após a última administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14 em ratos. (B) Quantificação da fosforilação de CaMKII α/β . (C) Quantificação da fosforilação de sinapsina I (Ser 62/67). A fosforilação foi determinada pela razão entre a densidade ótica (DO) da forma fosforilada e total, e o conteúdo total pela razão entre a DO da forma total e β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressos como percentuais relativos ao controle (DMSO 1 % = 100%); n = 8; Teste t.

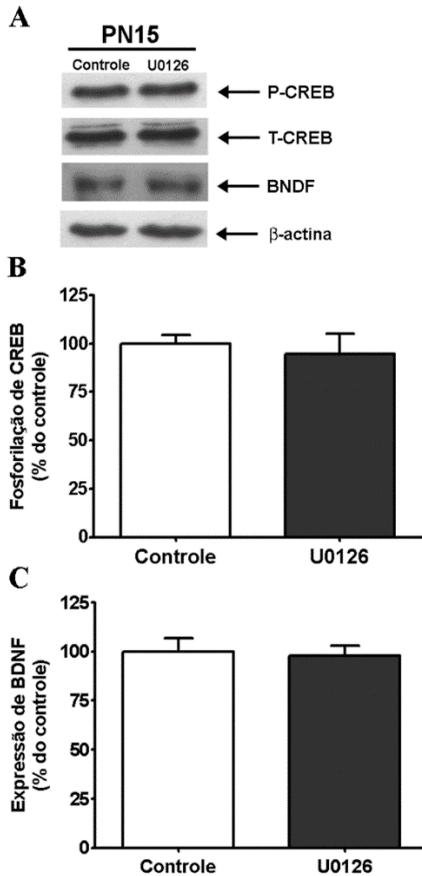


Figura 13. Avaliação da fosforilação de CREB e expressão de BDNF medida em PN15 em resposta à administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14. (A) Immunoblotting representativos de p-CREB, T-CREB, BDNF e β -actina de amostras de hipocampo 24 h após a última administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14 em ratos. (B) Quantificação da fosforilação de CREB. (C) Quantificação da expressão de BDNF. A fosforilação foi determinada pela razão entre a densidade ótica (DO) da forma fosforilada e total, e o conteúdo total pela razão entre a DO da forma total e β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressos como percentuais relativos ao controle (DMSO 1 % = 100%); n = 8; Teste t.

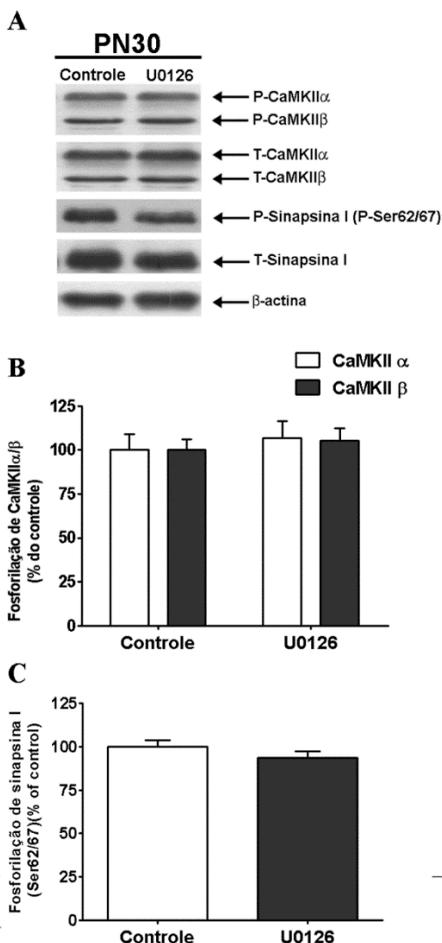
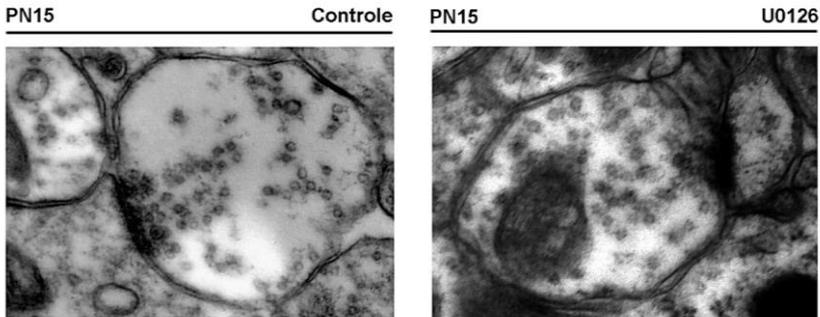


Figura 14. Avaliação da fosforilação de CaMKII α/β (p-Ser286) e sinapsina I (p-Ser 62/67) medida em PN30 em resposta à administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14. (A) Immunoblotting representativos de p-CaMKII α/β (p-Ser286), T-CaMKII α/β , p-sinapsina I (p-Ser 62/67), T-sinapsina I e β -actina de amostras de hipocampo avaliadas no PN30 em ratos controle ou tratados com U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14. (B) Quantificação da fosforilação de CaMKII α/β . (C) Quantificação da fosforilação de sinapsina I (Ser 62/67). A fosforilação foi determinada pela razão entre a densidade ótica (DO) da forma fosforilada e total, e o conteúdo total pela razão entre a DO da forma total e β -actina. Os resultados representam a média \pm erro padrão e são expressos como percentuais relativos ao controle (DMSO 1 % = 100%); n = 8; Teste t.

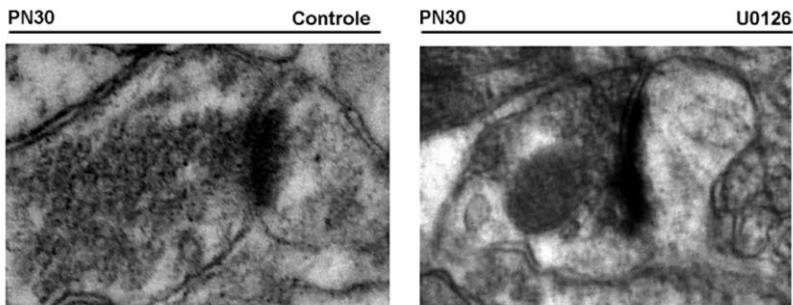
4.2.3 Modificações na estrutura sináptica no hipocampo de ratos após a administração de U0126 no período específico do desenvolvimento do sistema nervoso central.

Baseado no papel de ERK1/2 na modulação da sinaptogênese e da tendência na alteração de sinapsina I em resposta ao U0126, foi também verificado, através de microscopia eletrônica de transmissão, a morfologia e conteúdo de vesículas sinápticas nos terminais nervosos hipocampais a partir de amostras controle ou tratadas com U0126 e obtidos em PN15 e PN30 (Figura 15).

A



PN15	DPS (nm)	Diâmetro da vesícula sináptica (nm)	Número de vesículas por sinapse
Controle	63,3 ± 3,5	36,3 ± 0,7	44 ± 2
U0126	58,0 ± 3,0	36,0 ± 0,6	43 ± 1

B

PN30	DPS (nm)	Diâmetro da vesícula sináptica (nm)	Número de vesículas por sinapse
Controle	68,6 ± 2,4	31,3 ± 0,8	56 ± 4
U0126	54,0 ± 1,7*	37,2 ± 0,6	25 ± 2*

DPS: tamanho da densidade pós-sináptica. * $p < 0,05$ comparado controle (teste T).

Figura 15. Microscopia eletrônica do hipocampo de ratos após administração de U0126 durante o desenvolvimento (PN7-14). (A) Imagens representativas e características morfológicas da sinapse e das vesículas sinápticas na região CA1 do hipocampo de ratos na idade: 15 dias pós-natal (PN) após administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14 (aumento 36.000x). (B) Imagens representativas e características morfológicas da sinapse e das vesículas sinápticas na região CA1 do hipocampo de ratos na idade: 30 dias pós-natal (PN) após administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14 (aumento 36.000x). Os animais foram tratados com salina 0,9% (controle) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14). Os dados são de dois grupos independentes ($n = 2$ animais por grupo, 25-35 imagens foram analisadas por amostra) e estão expressos como a média ± E.P.M. dos parâmetros descritos acima; * $p < 0,05$ em relação ao controle; Teste t.

4.2.4 Inibição de MEK1/2 durante um período crítico do desenvolvimento neural causa alterações comportamentais na vida adulta de ratos.

Para avaliar os possíveis efeitos causados pela administração de U0126 (5 mg/kg, i.p.) durante o período PN7-14 sobre o comportamento

dos animais, os mesmos foram submetidos a testes comportamentais em três momentos específicos: (1) num período bem precoce (PN15); (2) durante o período da adolescência (PN30); (3) na vida adulta dos ratos (PN60). Para isso, foram utilizados testes previamente padronizados para avaliação de parâmetros de atividade locomotora, comportamento social e cognição (vide Figura 5; na seção metodologia para detalhes do protocolo).

A utilização do “*homing test*” é considerada um indicador válido da preferência social em roedores neonatos (Allewaert & Bignami, 1986). A capacidade desses animais de reconhecer estímulos olfatórios maternos, evidenciou a preferência pelo compartimento familiar pelos ratos jovens (PN15) estatisticamente indistinguíveis entre os animais administrados com U0126 (5 mg/kg; i.p.) quando comparado ao controle (DMSO 1%). Como demonstrado na figura 16 a porcentagem de tempo gasto no compartimento familiar foi significativamente maior em todos os grupos analisados ($p < 0,001$).

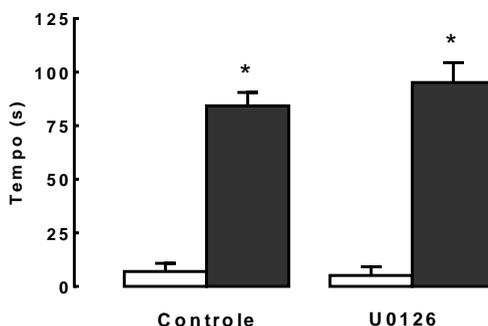


Figura 16. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a preferência social (“homing test”) em ratos machos jovens (PN15). Os animais foram tratados com controle (DMSO 1%) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do tempo gasto na área familiar; n=10 animais por grupo; * $p < 0,001$; ANOVA de duas vias; teste de comparações múltiplas.

O nocaute condicional de ERK 2 no SNC de camundongos causa alterações do comportamento social (Sato et al, 2011a). Para avaliar se a administração de U0126 (5 mg/kg, i.p.), durante um período específico do desenvolvimento pós-natal de ratos (PN7-14), poderia resultar em alterações na capacidade de interação social dos ratos, os mesmos foram submetidos ao teste de interação social em PN30. Os resultados obtidos demonstram que a administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) não alterou o comportamento social dos ratos em PN30 ($F(2,12) = 0,54$; $p = 0,598$) quando comparado ao controle (Figura 17). Da mesma forma os resultados obtidos na avaliação da atividade locomotora dos animais em PN30, após inibição de MEK1/2 durante o período de PN7-14, não apresentam diferenças significativas entre os grupos ($F(2,27) = 0,81$; $p = 0,451$), como apresentado na Figura 18.

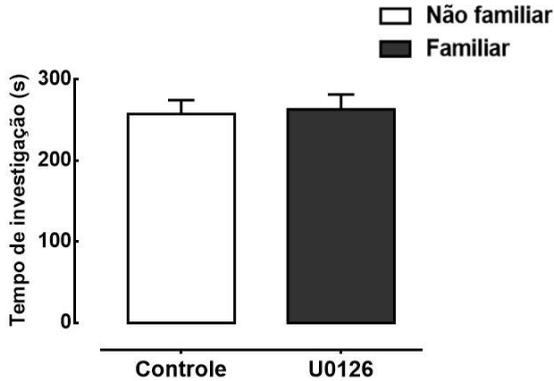


Figura 17: Efeito da administração de U0126 durante o desenvolvimento (PN7-14) sobre o comportamento social (teste de interação social) em ratos machos (PN30). Os animais foram tratados com controle (DMSO 1%) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do tempo de investigação; n= 5 animais por grupo; Teste t.

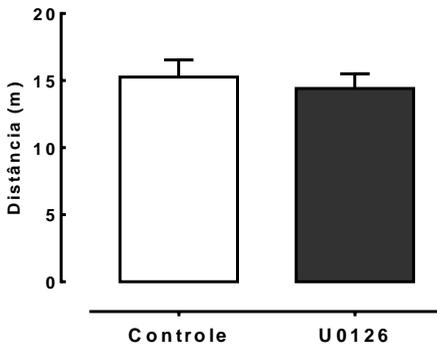


Figura 18. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a atividade locomotora (teste do campo aberto) em ratos machos adultos (PN30). Os animais foram tratados com controle (DMSO 1%) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. da distância percorrida (m) registrados no campo aberto no período de 15 min; n= 10 animais por grupo; Teste t.

A atividade locomotora dos animais na vida adulta (PN55-63), após inibição de MEK1/2 durante o período de PN7-14 é mostrada na Figura 19. Como pode ser observado não há alterações na atividade locomotora dos animais expostos ao U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14), quando comparado ao controle. Da mesma forma os animais não apresentaram diferenças significativas na distância total percorrida no campo aberto (Controle: $50,7 \pm 4,3$; U0126: $51,2 \pm 2,9$; $p= 0,916$), bem como, também não houve diferença significativa na velocidade média dos animais no teste do campo aberto (Controle: $0,069 \pm 0,005$; U0126: $0,066 \pm 0,004$; $p= 0,545$). Quando avaliada a coordenação motora dos animais injetados com U0126, não foram observadas alterações sobre o tempo médio de latência para a queda dos animais no Rotarod (Controle: $130,2 \pm 14,5$; U0126: $132,0 \pm 14,0$; $p= 0,283$) (Figura 20). Dessa forma, apesar do reconhecimento da segunda semana pós-natal representar um período crítico para o desenvolvimento do SNC de roedores, apresentando intensa sinaptogênese, e sendo um período susceptível a acometimentos (Rice & Barone, 2000), os parâmetros comportamentais motores não foram alterados pela inibição de MEK/ERK por U0126.

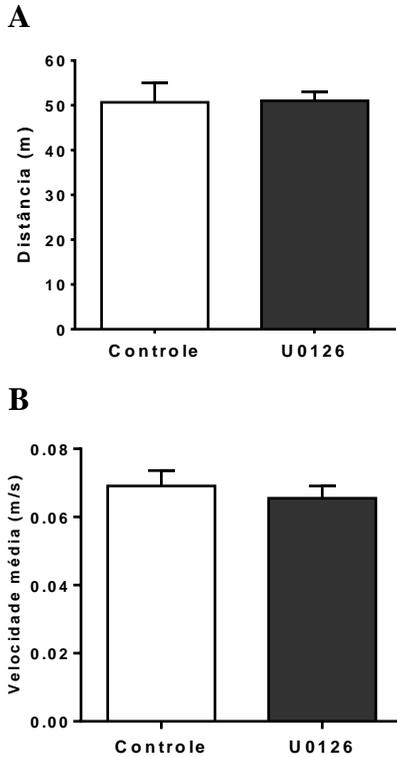


Figura 19. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a atividade locomotora (teste do campo aberto) em ratos machos adultos (PN55-63). Os animais foram tratados com DMSO 1% (controle) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. da (A) **distância percorrida (m)** e (B) **velocidade média (m/s)** registrados no campo aberto no período de 15 min; n= 10 animais por grupo; Teste t.

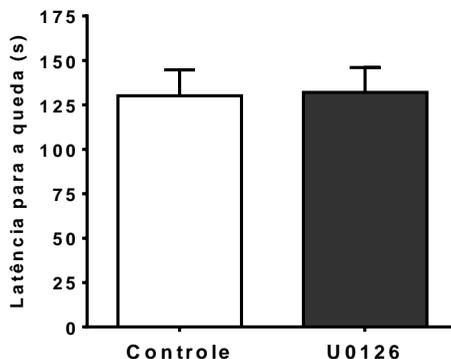


Figura 20. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a atividade coordenação motora (teste Rotarod) em ratos machos adultos (PN55-63). Os animais foram tratados com DMSO 1% (controle) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do tempo de latência para a queda (s) dos animais registrados no Rotarod de aceleração por 5 min; n= 10 animais por grupo; Teste t.

Como próximo passo na avaliação comportamental na vida adulta dos ratos administrados com U0126 (5 mg/kg, i.p.) durante o período PN7-14, foram investigadas as respostas de emocionalidade dos animais, através do teste do labirinto em cruz elevado. O labirinto em cruz elevado é o teste mais utilizado para avaliar o comportamento do “tipo ansioso” em roedores. Os resultados obtidos não demonstraram alterações no número total de cruzamentos nos braços fechados (Controle: $21,7 \pm 1,2$; U0126: $20,8 \pm 1,6$; $p= 0,516$) entre os animais expostos ao U0126 (5 mg/kg; i.p.) no período de PN7-14, quando comparado ao controle (DMSO 1%) (Figura 21A). Também não foram observadas diferenças significativas, entre os grupos no parâmetro que reflete o comportamento de resposta ao risco, através do tempo de permanência nos braços abertos

(Controle: 28,4 % \pm 3,7; U0126: 26,3 % \pm 4,0; $p= 0,880$) e número de entradas nos braços abertos (Controle: 38 % \pm 2; U0126: 40 % \pm 3; $p= 0,309$), expressos como porcentagem da soma total de tempo nos braços abertos e fechados, e entradas nos braços abertos e fechados, respectivamente (Figura 21B e 21C).

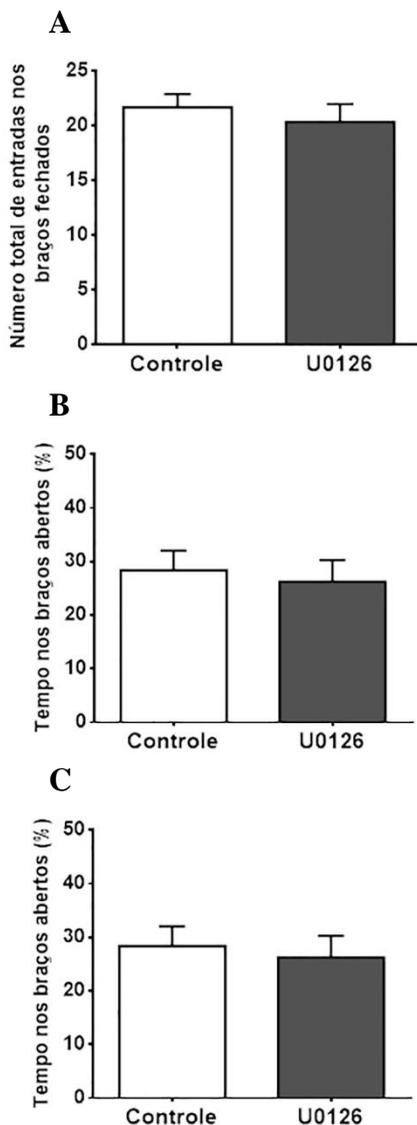


Figura 21. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre o comportamento “tipo ansioso” (teste do labirinto em cruz elevado) em ratos machos adultos (PN55-63). Os animais foram tratados com DMSO 1% (controle) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do (A) número total de entradas nos braços fechados, (B) entradas nos braços abertos (%) e (C) tempo de permanência nos braços abertos (%) dos animais registrados no

labirinto em cruz elevado durante 5 min. A percentagem de entradas nos braços abertos foi calculada pelo número de entradas nos braços abertos dividido pelo número total de entradas nos braços. A percentagem do tempo gasto no braço aberto foi calculada pelo tempo gasto no braço aberto, dividido pelo tempo total despendido nos braços. O número total de entradas nos braços fechados foi usado para medir a atividade da locomotora. n= 10 animais por grupo; Teste t.

A memória de curto prazo foi avaliada por meio do teste comportamental de realocação do objeto (Assini et al, 2009; Murai et al, 2007). No presente estudo foi avaliada a capacidade mnemônica dos animais no teste de realocação de objetos. O intervalo de tempo utilizado entre o treino e o teste foi de 30 min. Como demonstrado na Figura 22A, durante a sessão de treino os animais apresentaram o mesmo desempenho na tarefa, despenderam o mesmo tempo de investigação nos objetos A e B, com ausência de preferência por um objeto específico (Teste t; Controle: $p=0,211$; U0126: $p=0,159$). Na sessão de teste, a administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período de PN7-14, resultou em um índice de realocação de objeto menor que 50% (Teste t; U0126: $p=0,033$) comparado ao grupo controle (DMSO 1%: índice de realocação de objetos superior a 50%; Test t; $p=0,014$). Os animais administrados com U0126 (5 mg/kg; i.p.) apresentaram declínio da função cognitiva, através do prejuízo na memória de curto prazo, demonstrado pela incapacidade dos animais em discriminarem o objeto realocado na nova posição no teste de realocação de objeto (Teste t; Controle vs. U0126: $p=0,002$) (Figura 22B).

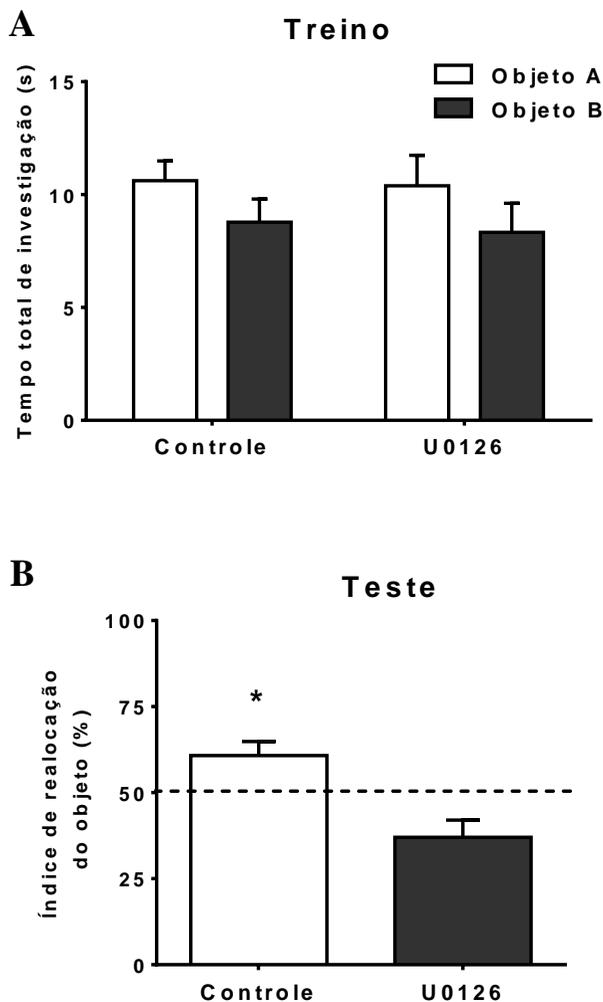


Figura 22. Efeito da administração de U0126 durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) sobre a memória de curto prazo (teste de realocação de objetos) em ratos machos adultos (PN55-63). Os animais foram tratados com controle (DMSO 1%) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do (A) tempo total de investigação dos objetos (s) na sessão de treino. O tempo gasto explorando dois objetos idênticos A e B foi contabilizado durante a sessão de 3 min. (B) índice

de reconhecimento (%) dos animais registrados na sessão teste, realizada 30 min após o treino. Um novo objeto C substituiu o objeto B, enquanto o objeto A permaneceu e é referido como A2. A porcentagem de tempo gasto explorando o objeto novo relacionada com o tempo total de exploração foi calculada usando a fórmula do índice de reconhecimento ($C*100/C+A2$). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M; n= 10 por grupo. *p< 0,05 em relação ao controle; Teste t.

4.2.5 Alterações nos níveis de fosforilação de ERK 1/2 em período crítico do desenvolvimento do SNC diminui a proliferação celular e aumenta a expressão de GFAP na vida adulta de ratos.

Diversos estudos já demonstraram que a neurogênese e a função cognitiva dependentes de hipocampo têm uma forte relação de dependência (Winocur et al, 2006). Diminuição na capacidade de proliferação e diferenciação de células progenitoras neurais estão correlacionadas com disfunção na memória em humanos (Coras et al, 2010). Além disso, em outras espécies, a estimulação direta ou indireta da neurogênese pode melhorar a função cognitiva (Sahay et al, 2011).

A partir dos resultados obtidos nos testes comportamentais, que demonstraram um prejuízo na memória de curto prazo nos animais administrados com U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante PN7-14, quando avaliados na vida adulta (PN55-63), buscou-se determinar a quantidade de células positivas para Ki-67 (marcador endógeno de proliferação celular). O giro denteado (GD) do hipocampo foi analisado quanto à capacidade de neurogênese e os resultados obtidos (Figura 23) demonstraram uma diminuição nas células positivas para Ki-67 no giro denteado (Controle: 333 ± 87 Ki-67⁺/GD; U0126: 61 ± 18 Ki-67⁺/GD; p= 0,047) dos animais administrados com U0126 (5 mg/kg; i.p.) quando comparado ao controle.

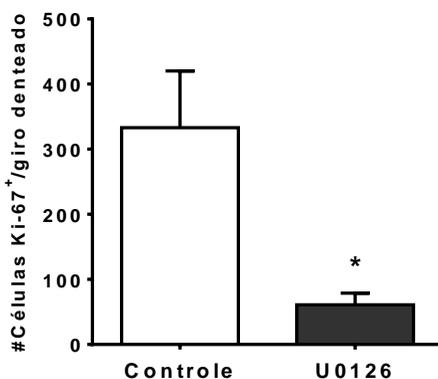
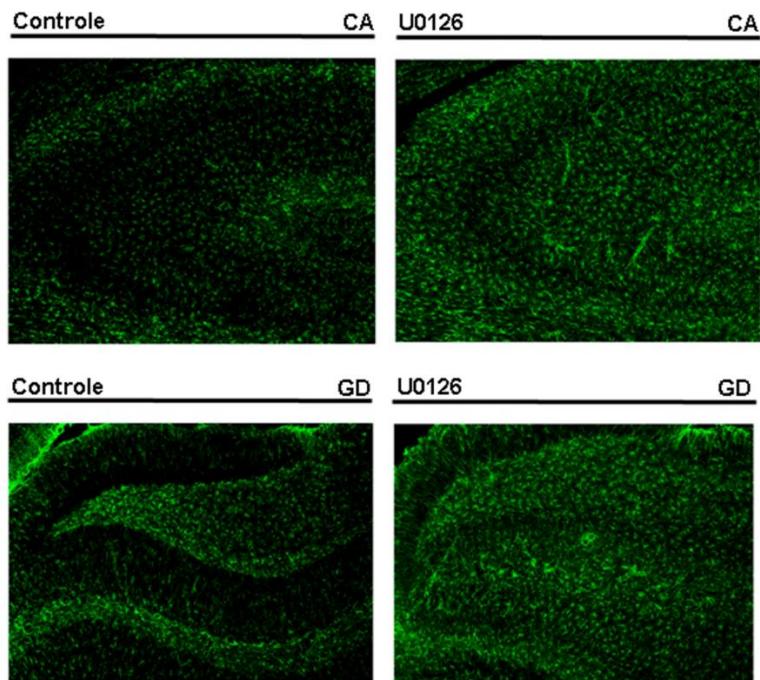


Figura 23. Efeitos da administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante um período crítico do desenvolvimento do SNC (PN7-14) na proliferação celular no giro denteado do hipocampo em ratos adultos (PN63). Os animais foram injetados com DMSO 1% (controle) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. da quantidade de células positivas para Ki-67 por giro denteado (Ki-67⁺/GD). A proliferação celular foi analisada por imunistoquímica para Ki-67 (proteína endógena do ciclo celular); n= 6 por grupo; *p<0,05 vs. Controle; Teste t.

Além disso, foi avaliado a expressão de GFAP, um conhecido marcador de ativação de astrócitos (Eng et al, 2000), no hipocampo dos animais administrados com U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante PN7-14. As amostras de hipocampo foram analisadas por imunistoquímica no período da vida adulta (PN55-63). Os resultados obtidos da análise da expressão de GFAP estão demonstrados na Figura 24.



U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14)	GFAP	
Giro denteado (GD)	11,77% ± 2,54*	p= 0,012
Região CA3	7,68 ± 4,77	p= 0,212
Hipocampo total (HT)	9,73 ± 2,23*	p= 0,014

Figura 24. Expressão de GFAP no hipocampo após a administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período crítico do desenvolvimento do SNC (PN7-14). Os animais foram tratados com DMSO 1% (Controle) ou U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante PN7-14. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. da densidade fluorescência de GFAP nas regiões do hipocampo de ratos (região CA3 e giro denteado); n= 4 por grupo. Os valores apresentados mostram o aumento percentual (%) da imunoreatividade para GFAP no grupo tratado com U0126 comparado ao controle (DMSO 1%= 100 %). *p<0,05 vs. controle (DMSO 1%); Teste t.

Os nossos resultados demonstram que a ativação da ERK1/2 e p38^{MAPK} são dinamicamente reguladas durante o período crítico (PN1-14) do neurodesenvolvimento. Além disso, a correlação temporal de ativação das diversas MAPKs com períodos críticos para a morte celular programada e sinaptogênese sugerem um papel importante para estas enzimas em eventos fisiológicos específicos do desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos. Por fim, os achados sugerem que o uso de inibidor seletivo de MEK/ERK, U0126, acarreta uma inibição temporária de ERK1/2 durante o período crítico do desenvolvimento do SNC e causa modificação na estrutura sináptica, diminuição da proliferação celular e aumento da expressão de GFAP no hipocampo. Além disso, induz danos cognitivos aparentemente permanentes, observados na vida adulta dos ratos.

5 DISCUSSÃO

Nos mamíferos, a cascata de sinalização das MAPKs regula importantes processos celulares, incluindo expressão de genes, proliferação celular, sobrevivência e morte celular (Chang & Karin, 2001). Há um crescente aumento na compreensão das diferentes vias de sinalização dependentes de MAPKs e seus papéis cruciais no desenvolvimento de vertebrados. Em nosso estudo demonstramos: (1) uma regulação dinâmica e transitória da ativação de p38^{MAPK} e ERK1/2 durante desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos (PN1-60); (2) uma correlação temporal de ativação de MAPKs com períodos críticos para morte celular programada e sinaptogênese; (3) inibição sutil, mas significativa, da via MEK/ERK1/2 através da administração de U0126 (5 mg/kg, i.p.), em período crítico do desenvolvimento (PN7-14), levando a consequências relevantes na vida adulta (PN55-63) dos animais. Essas alterações incluem: (i) modificações na estrutura sináptica no hipocampo; (ii) danos permanentes na memória de curta duração; (iii) diminuição na proliferação celular no giro denteado do hipocampo; e (iv) aumento na expressão de GFAP no hipocampo dos ratos.

O desenvolvimento pós-natal do sistema nervoso central (SNC), período conhecido como “*brain growth spurt*” (do inglês, rápido crescimento do cérebro), é consideravelmente crítico para o estabelecimento das corretas funções e conexões neurais durante o desenvolvimento, e acontece nos dez primeiros dias de vida pós-natal nos ratos (PN1-10). Nesse período ocorrem importantes alterações na conectividade sináptica, uma vez que a proliferação celular, migração,

diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose, se sobrepõem de forma significativa nesta fase (Dobbing & Sands, 1979).

Estudos recentes demonstram avanços no entendimento das etapas e mecanismos envolvidos no desenvolvimento do cérebro em mamíferos. Diversos estudos têm correlacionado a modulação das vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) na regulação de processos fundamentais durante o desenvolvimento do SNC (Cheng et al, 2013; Jeanneteau et al, 2010; Qu et al, 2013). As principais MAPKs identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2), c-Jun amino-terminal-cinase 1-3 (JNK 1/2/3) e p38^{MAPK} (Chang & Karin, 2001; Chen et al, 2001; Thomas & Huganir, 2004).

O envolvimento das MAPKs e seus reguladores nos processos de desenvolvimento do SNC são bem descritos na literatura (Cheng et al, 2013; Jeanneteau et al, 2010; Qu et al, 2013). Sabendo disso, possíveis alterações na via de sinalização das MAPKs podem ser responsáveis por afetar negativamente o desenvolvimento neural (Pucilowska et al, 2012). Apesar da consistente importância da via de sinalização das MAPKs, não há muitos estudos disponíveis de abordagem sistemática do perfil ontogenético da ativação e conteúdo total das MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal de ratos (Oliveira et al, 2008). Contudo, tal compreensão é fundamental visto que a via das MAPKs pode ser um alvo envolvido em inúmeras alterações no curso do neurodesenvolvimento em resposta a fatores ambientais.

Primeiramente, como modelo experimental descritivo, foi analisado por western blotting as formas fosforiladas e conteúdo total das MAPKs (p38^{MAPK}, ERK 1/2 e JNK p54/p46) no hipocampo de ratos em idades relacionadas a alterações conhecidas no cérebro durante o

desenvolvimento pós-natal (PN: 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30, 60). Interessantemente, como sumarizado na Figura 25, as variações no perfil temporal das MAPKs foi bastante diferente durante o período de 1 a 10 dias pós-natal (PN1-10) no hipocampo de ratos, conhecido como “*brain growth spurt*” (Dobbing & Sands, 1979).

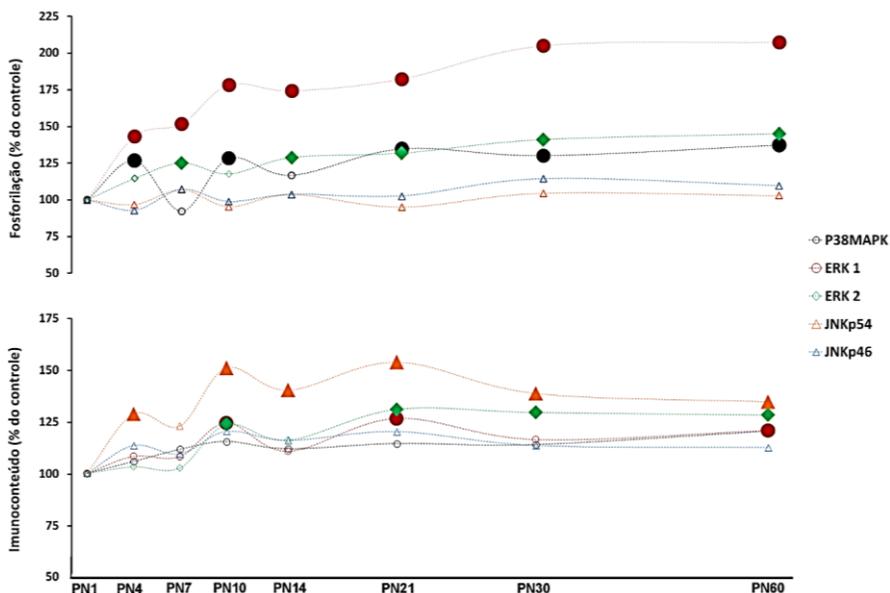


Figura 25. Perfil de ativação e conteúdo total das MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal em hipocampo de ratos. (A) Curva de fosforilação de MAPK durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos e (B) Conteúdo total de MAPKs nas idades desenvolvimento analisadas (PN1-60). O nível de fosforilação foi determinado por densitometria óptica (D.O.) como uma razão entre a forma fosforilada e conteúdo total, e o conteúdo total como a razão entre o conteúdo total e β -actina. Os dados são expressos como percentagem do controle (PN1 considerado como 100%). Os valores são apresentados como média \pm E.P.M. derivados de 7 experimentos independentes. Os círculos cheios são utilizados para evidenciar o ponto de tempo estatisticamente diferente quando comparado a PN1 ($p < 0,05$).

As cinases c-Jun N-terminal (JNK 1/2/3) são fortemente expressas no sistema nervoso e apresentam funções importantes no desenvolvimento neural, migração neuronal, polarização dos neurônios durante o desenvolvimento; e durante as fases de aprendizagem e memória (Haeusgen et al, 2009). Kuan e colaboradores (1999) foram os primeiros a demonstrar que JNK 1 e JNK 2 são indispensáveis para o desenvolvimento normal do sistema nervoso. Nesse estudo inicial indicaram que o duplo nocaute de JNK 1 e JNK 2 causam prejuízo no fechamento do tubo neural e demonstram papéis compensatórios para JNK 1 e JNK 2 na sobrevivência neuronal e apoptose durante períodos precoces do desenvolvimento (Kuan et al, 1999). Adicionalmente, outro estudo utilizando camundongos nocaute para *jnk2* e/ou *jnk3* não demonstraram alterações óbvias no desenvolvimento; porém, camundongos nocaute para *jnk1* apresentaram anormalidade na formação da comissura anterior e integridade axonal (Kuan et al, 1999; Sabapathy et al, 1999), bem como alterações na citoarquitetura dos dendritos (Bjorkblom et al, 2005). Estes estudos sugerem que a via de sinalização da JNK pode estar envolvida de maneira mais consolidada em processos do desenvolvimento neural durante o período embrionário, principalmente no fechamento do tubo neural (Chang et al, 2003). Com base nos dados da literatura, nossos resultados não demonstraram alterações significativas na forma fosforilada de JNK p54/p46 e no conteúdo total de JNK p46 no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal, nas idades analisadas (PN1-60), corroborando com estudos prévios que demonstram uma função mais proeminente para JNK 1 durante o período embrionário do desenvolvimento neural em roedores (Figura 7). A manutenção do

conteúdo total de JNK p46 pode estar correlacionada ao fato de JNK 1 ser constitutivamente ativa no cérebro normal, no qual é requerida para a manutenção da integridade do citoesqueleto das células neuronais durante o desenvolvimento, não apresentando períodos de maior ou menor ativação durante o desenvolvimento pós-natal do hipocampo (Qu et al, 2013). Contudo, foi observado alterações no conteúdo total de JNK p54 nas idades de PN4, PN10 a PN60. Analisando os resultados obtidos, o conteúdo total de JNK p54 apresentou o mesmo perfil que a forma fosforilada de p38^{MAPK}. JNK p54 pode representar a isoforma de JNK 2 e/ou JNK 3 que apresentam peso molecular de 54 kDa (Brecht et al, 2005). Dessa forma, baseado no possível papel dessas isoformas durante o desenvolvimento (Sabapathy et al, 1999), pode-se especular que o aumento no conteúdo total de JNK p54 pode estar relacionada, pelo menos em parte, a ocorrência de apoptose no hipocampo no período do desenvolvimento neural pós-natal. Além disso, JNK pode estar envolvida em atividades de migração celular, que são eventos característicos da primeira semana do desenvolvimento pós-natal em ratos (Waetzig & Herdegen, 2004; Waetzig et al, 2006).

A fosforilação de ERK 1 e ERK 2 foi regulada de maneira que o aumento de fosforilação de ambas isoformas de ERK foi crescente com o aumento da idade dos ratos (PN1-60). As cinases ativadas por sinal extracelular (ERK 1/2) são importantes componentes da via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK que medeiam a transdução de estímulos intracelular e expressão gênica. ERK 1 (44 kDa) e ERK 2 (42 kDa) compartilham 84 % de homologia na sequência de aminoácidos, e são subtipos da família das ERKs; as quais, participam na regulação de uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação celular,

migração e diferenciação (Cheng et al, 2013). No nosso estudo, a fosforilação de ambas as isoformas de ERK (ERK 1 e ERK 2) no hipocampo de ratos durante o desenvolvimento pós-natal (PN1-60) apresentou uma regulação idade dependente. A fosforilação de ERK 1 foi mais baixa na idade PN1, aumentando significativamente a partir de PN4 até PN60 (Figura 8). Em relação a fosforilação de ERK2 observa-se que ela permaneceu estável no período PN1-10, apresentando um aumento significativo de fosforilação, em comparação com PN1, a partir de PN14 e que se mantém até PN60. Além disso, é interessante observar que a fosforilação basal de ERK 2 no hipocampo se apresenta mais elevada nas fases iniciais do desenvolvimento pós-natal (PN1-PN14) quando comparada a ERK 1. Sugere-se que esse aumento de ERK 1/2 durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal em roedores está correlacionado com períodos de intensa proliferação celular e sinaptogênese (Rice & Barone, 2000). ERK 1 e ERK 2 são muito estudadas no desenvolvimento neural (Samuels et al, 2008) e parecem apresentar um padrão de regulação espacial e temporal. Nesse sentido foi demonstrado que durante a embriogênese de camundongos ERK 1/2 são ativadas em resposta ao FGF (Corson et al, 2003). Além disso, papéis específicos para cada isoforma também tem sido inferido utilizando camundongos nocaute. Por exemplo, animais nocaute para ERK 1 (*Erk1*^{-/-}) apresentaram alterações na proliferação e maturação de tímócitos, apesar da expressão de ERK 2 (Pages et al, 1999), enquanto camundongos sem ERK 1 manifestam respostas anormais de sinalização celular, as quais são relacionadas à “*upregulation*” de ERK 2 no cérebro (Mazzucchelli et al, 2002). Além disso, estudo recente em neurônios sensoriais mostrou, através de nocautes seletivos ou duplos, que alguns

papéis de ERK 1 e ERK 2 são distintos, enquanto outros são redundantes em relação a sensibilização periférica, sensibilidade ao frio e sobrevivência dos neurônios sensoriais (O'Brien et al, 2015). Em estudos no SNC, foi demonstrado que a sinalização de ERK 1/2 é requerida para a manutenção da mielina e suporte axonal dos oligodendrócitos, e a supressão destas enzimas acarreta diminuição na expressão gênica para formação de mielina, levando a degeneração axonal em períodos tardios, acompanhados de astrogliose, ativação microglial, e perda parcial de oligodendrócitos e mielina (Ishii et al, 2014). Adicionalmente, Pucilowska e colaboradores (2012) mostraram que alterações na sinalização de ERK 1/2 durante o desenvolvimento cortical podem ter como consequências, alterações importantes na proliferação de células progenitoras neurais, ocasionando anormalidades na formação da citoarquitetura do cérebro durante o desenvolvimento pós-natal.

Diferentemente de ERK 1/2, a fosforilação de p38^{MAPK} durante o período pós-natal (PN1-60) exibiu uma regulação que conduziu uma ativação transitória da enzima em idades específicas quando comparado a fosforilação em PN1. Dessa forma foi verificado, no hipocampo de ratos, um aumento significativo da fosforilação de p38^{MAPK} em PN4, retornando aos níveis basais em PN7, seguido por um segundo aumento em PN10. Esse aumento está relacionado, de forma temporal, com períodos de intensas modificações nas estruturas cerebrais, sinaptogênese, gliogênese, mielinização; e reestruturação dos circuitos neurais, através do refinamento das sinapses estabelecidas; acompanhado de intensa morte celular programada. Interessantemente, um perfil pós-natal de p38^{MAPK} similar, com dois picos de ativação, em coincidência com intensa morte celular programada foi também observado na retina de

ratos Long-Evans (Oliveira et al, 2008). O desenvolvimento adequado do SNC exige a ocorrência de apoptose em determinados períodos, removendo sistematicamente um elevado número de células que foram produzidas inadequadamente durante o desenvolvimento neural ou células que não estabeleceram os contatos sinápticos (Kim & Sun, 2011). Para tal finalidade, a apoptose ocorre de forma mais proeminente em dois momentos no desenvolvimento do SNC, um durante o período pré-natal, na região das zonas proliferativas; e um segundo no período pós-natal, nas células pós-mitóticas, tanto com características neuronais, como gliais (Nikolic et al, 2013; Rice & Barone, 2000). A morte celular programada é mais acentuada nos neurônios pós-mitóticos durante o período pós-natal de sinaptogênese (Kim & Sun, 2011). Sabe-se que a apoptose ocorre de forma fisiológica durante o terceiro trimestre de gestação e se estende até o terceiro ano de vida em humanos. Em roedores, esse processo ocorre durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal, período de intensa neurogênese e sinaptogênese. Ou seja, há uma sobreposição constante de eventos durante o desenvolvimento neural, momentos de intensa proliferação celular e morte, que acontece de forma simultânea nas diversas regiões do cérebro (Dekkers & Barde, 2013). Então, a partir dos resultados obtidos nesse trabalho podemos especular que o aumento da fosforilação de p38^{MAPK} observado nas idades de PN4 e PN10 pode estar regulando processos de morte celular programada durante os períodos iniciais do desenvolvimento neural pós-natal. Essa possível regulação de apoptose através da ativação de p38^{MAPK} pode ser independente da ativação de Bax, visto que não houve um aumento significativo na expressão de Bax nas idades que apresentaram aumento significativo na fosforilação de p38^{MAPK} quando comparado a PN1;

contudo, em idades nas quais a fosforilação de p38^{MAPK} apresentou-se elevada (ex.: PN60), a expressão de Bax não acompanhou esse mesmo perfil (dados não demonstrados). Em conjunto esses dados sugerem uma possível independência nesses eventos durante o desenvolvimento neural. Dessa forma, será necessária uma investigação mais aprofundada e detalhada das vias apoptóticas, e da ativação de proteínas que possam estar envolvidas na cascata de sinalização de morte, para poder relacionar de forma consistente o aumento da fosforilação de p38^{MAPK} nas idades de PN4 e PN10 com o fenômeno de morte celular.

Dentro deste panorama, cabe destacar que estudos relacionados a neurotoxicidade durante o desenvolvimento pós-natal do SNC indicam que a apoptose induzida por anestésicos é mais proeminente quando a exposição ocorre entre os dias PN6-7 (Yon et al, 2005). Da mesma forma, a exposição de ratos ao metilmercúrio em PN7, pode ocasionar danos ao desenvolvimento do hipocampo, com diminuição da neurogênese (Obiorah et al, 2015). Nesse sentido deve ser salientado que no hipocampo de roedores, muitas das conexões alcançam a maturidade somente ao final da segunda semana de vida pós-natal (Dobbing & Sands, 1971), sendo esse período (PN7-14) muito crítico em relação a interferência sobre a sinaptogênese. Portanto o período de PN7-14 pode ser representativo de um período de grande vulnerabilidade do SNC de roedores frente à exposição a agentes ou situações com potencial deletério (Rice & Barone, 2000).

Considerando que a ativação de ERK 1/2 durante o período crítico do desenvolvimento pós-natal é requerida para o refinamento adequado das funções do SNC (Yufune et al, 2015); que as conexões no hipocampo alcançam a maturidade por volta do final da segunda semana de vida pós-

natal (Rice & Barone, 2000); que a deficiência de ERK 1/2 no SNC induz alterações no comportamento de roedores (Sato et al, 2011a; Wefers et al, 2012); no presente trabalho foi avaliado o efeito da inibição de MEK/ERK durante um período crítico do desenvolvimento neural (PN7-14) em relação à indução de alterações em parâmetros neuroquímicos e comportamentais na vida adulta de ratos Wistar (PN60). A inibição da cascata de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK foi realizada através da injeção intraperitoneal de um inibidor de MEK 1/2 (U0126; 5 mg/kg) durante o período de PN7-14. Como demonstrado na Figura 10, os animais injetados intraperitonealmente em PN7 com U0126 (5 mg/kg; i.p.) apresentaram uma inibição significativa na fosforilação de ERK 1, analisada 6 h após a injeção do inibidor em amostras de hipocampo. No entanto, não houve uma inibição significativa na fosforilação de ERK 2 quando comparada ao controle (DMSO 1 %) nas amostras de hipocampo analisadas após 6 h da injeção de U0126 em PN 7 (Figura 10). Resultados similares (dados não mostrados) foram encontrados utilizando outro inibidor de MEK1/2, SL327, nas mesmas condições testadas com U0126.

Para dar continuidade aos estudos de avaliação do efeito da inibição de MEK/ERK, durante um período crítico do desenvolvimento neural, os animais foram administrados diariamente durante a segunda semana de vida pós-natal (PN7-14) com U0126 (5 mg/kg; i.p.). Os resultados mostraram que, apesar da eficiência de U0126 em inibir significativamente a fosforilação de ERK 1 cerca de 6 h após sua administração em PN7 (Figura 8B), este efeito não foi verificado 24 h após a última injeção de U0126 (PN15) e em períodos tardios (PN30 e PN60) do desenvolvimento pós-natal em ratos (Figura 11B e 11D). Esses achados sugerem que a diminuição na fosforilação de ERK 1, pelo

U0126, ocorre de forma limitada, e sendo mais restrita a fase inicial do período crítico do desenvolvimento neural (PN7), sendo reestabelecida posteriormente. Nesse sentido deve ser salientado que os estudos em roedores relatam que a permeabilidade da barreira hematoencefálica diminui significativamente durante as primeiras semanas de vida pós-natal em ratos (Watson et al, 2006). Yufune e colaboradores (2015) demonstraram que o uso de inibidor de MEK/ERK em alta concentração (SL327; 50 mg/kg) promove inibição transitória na fosforilação de ERK1/2 no SNC de camundongos, observada nitidamente em PN6, mas não em PN14. Além disso, demonstraram um aumento robusto no processo de apoptose no hipocampo, bem como efeitos deletérios na funcionalidade neural, resultando em prejuízos cognitivos e no comportamento social na vida adulta (Yufune et al, 2015). Considerando esses estudos observamos que nosso protocolo, que utilizou uma dose relativamente baixa de inibidor, concorda com as ações desses compostos sobre o SNC, ressaltando uma eficiência da inibição bem maior nos primeiros dias da vida pós-natal e que se torna limitada com o desenvolvimento da barreira hematoencefálica. Dessa forma, as consequências dessa inibição transitória na fosforilação de ERK 1/2 durante o período crítico de sinaptogênese (PN7-14) nos ratos foi avaliada através de parâmetros neuroquímicos e comportamentais realizados na vida adulta.

Sinapsinas são uma família de fosfoproteínas neuronais envolvidas na modulação e liberação de neurotransmissores no terminal pré-sináptico, por mediar a ligação reversível entre vesículas sinápticas e o citoesqueleto de actina. No entanto, muitos estudos recentes sugerem outras funções importantes na fisiologia da sinapse para a família de

sinapsinas, principalmente para a sinapsina I, tais como ancoramento, fusão e reciclagem das vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico (Cesca et al, 2010). As sinapsinas são substrato para importantes proteínas cinases, incluindo PKA, CaMKs e MAPK/ERK, as quais são responsáveis por modular fortemente suas propriedades bioquímicas (Jovanovic et al, 2001). ERK1 e ERK2 estão presentes e ativas no terminal sináptico, sugerindo que esta via de sinalização pode ter importantes funções em distintos compartimentos celulares durante a plasticidade da memória de curto e longo prazo, atuando através da fosforilação de alvos sinápticos, incluindo as sinapsinas (Giachello et al, 2010; Sweatt, 2004).

Considerando a hipótese de que alterações transitórias na fosforilação de ERK 1/2 após a administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.), durante um período crítico de intensa sinaptogênese durante o desenvolvimento neural em ratos, podem acarretar alterações na formação das sinapses, os níveis de fosforilação e expressão de outras proteínas envolvidas na regulação da sinaptogênese e plasticidade neural também foram avaliados, incluindo: sinapsina I, CaMKII α/β , CREB e BDNF. Nossos resultados mostraram apenas uma tendência na diminuição nos níveis de fosforilação da sinapsina I (p-Ser62/67) em PN15 (Figura 12) e PN30 (Figura 14). Enquanto as formas totais e fosforilada de CaMKII e CREB não foram alteradas tanto em PN15 como em PN30, assim como o conteúdo de BDNF. Estudos com inúmeros dados experimentais evidenciam o envolvimento das sinapsinas no desenvolvimento neuronal, nos quais a fosforilação de sinapsina I no sítio Ser62/67, é dependente de ERK, sendo essencial para a formação de sinapses (Giachello et al, 2010). No entanto, estudos também enfatizam

que a razão entre a fosforilação e a defosforilação de sinapsina I parece ser mais importante para a formação da sinapse do que os níveis absolutos da proteína (Perlini et al, 2011). Em nosso estudo avaliamos o conteúdo de sinapsina I e o estado de fosforilação do sítio p-Ser62/67 em resposta a administração do inibidor de MEK/ERK, U0126, durante o período PN7-14. Os resultados não indicaram diminuição significativa na fosforilação de sinapsina I (p-Ser62/67) em PN15 e PN30. Contudo, a administração do inibidor pode ocasionar alterações na morfologia das sinapses. Estudos recentes demonstram que a administração de inibidor de MEK1/2 em PN6 causou uma profunda supressão de LTP (potenciação de longa duração), produzida através da ativação da via colateral de Schaffer em fatias de hipocampo de camundongos, quatro semanas após a administração do inibidor, indicando alterações permanentes importantes na funcionalidade da sinapse (Yufune et al, 2015).

A fim de verificar possíveis alterações na morfologia das sinapses, amostras de hipocampo (região CA1) de ratos expostos ao U0126 (5 mg/kg, i.p.) no período PN7-14, foram avaliadas nas idades de PN15 e PN30 por microscopia eletrônica de transmissão em colaboração com o laboratório da Professora Dra. Ana Lúcia de Paul, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidad Nacional de Córdoba (Projeto CAPES/MINCYT). Os parâmetros morfológicos avaliados nas sinapses incluíram: tamanho das densidades pós-sinápticas (DPS), diâmetro das vesículas sinápticas e número de vesículas por terminal sináptico. Os resultados evidenciaram uma diminuição no DPS nas sinapses do hipocampo de ratos em PN30 quando comparado ao controle (salina), porém, não houve diferença significativa entre os grupos em PN15. Além disso, observou-se uma diminuição no número de vesículas por sinapse,

em ratos após a administração de U0126 durante o desenvolvimento (PN7-14), na idade de PN30. Enquanto o diâmetro da vesícula sináptica não foi alterado, tanto em PN15 como em PN30 (Figura 15).

A espessura da DPS apresenta-se sensível à insultos ambientais que alteram a organização subcelular das proteínas constituintes (Hu et al, 1998; Tao-Cheng et al, 2007). Alterações na DPS podem interferir na eficiência da transmissão sináptica, desempenhando um papel essencial na formação do circuito neural, durante a formação e maturação das sinapses, no período de desenvolvimento do SNC (Clarke et al, 2012). Os resultados obtidos de diminuição da DPS e no número de vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico em PN30 no hipocampo de ratos após administração de U0126 (PN7-14), estão de acordo com estudos recentes que demonstram a correlação direta entre a redução na densidade pós-sináptica com o número de vesículas no terminal pré-sináptico (Harris & Weinberg, 2012). Além disso, os achados estão em concordância com estudos que demonstram uma diminuição significativa na DPS refletindo alterações na função sináptica e prejuízos na memória em camundongos (Nasuti et al, 2014; Price et al, 2014).

Alterações comportamentais são observadas em animais com deficiência em ERK 1/2 no SNC (Satoh et al, 2011a; Wefers et al, 2012; Yufune et al, 2015). Para avaliar se a administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.), em um período específico do desenvolvimento pós-natal (PN7-14), poderia acarretar alterações no comportamento desses animais na vida adulta, os mesmos foram submetidos a testes comportamentais em três momentos específicos: (1) num período bem precoce (PN15); (2) durante o período da adolescência (PN30); (3) na vida adulta dos ratos (PN60). Para isso, foram utilizados testes previamente padronizados para

avaliação de parâmetros de atividade locomotora, comportamento social e memória de curta duração (ou curto prazo) (vide Figura 5; na seção metodologia para detalhes do protocolo).

Os resultados obtidos no teste comportamental denominado “*homing test*” em PN15 após a inibição de MEK 1/2 durante um período crítico do desenvolvimento do SNC em ratos (PN7-14) demonstraram a capacidade inata dos animais de reconhecer estímulos olfatórios maternos (Figura 16). Os animais administrados com U0126 não apresentaram diferenças significativas a curto prazo (PN15) na latência de reconhecimento do espaço familiar no período do teste, quando comparado ao grupo controle (DMSO 1 %). A utilização do “*homing test*” é considerado um indicador válido de preferência social em roedores neonatos (Allewa & Bignami, 1986). Estudos apresentam alterações no comportamento de preferência social em roedores a curto prazo como prejuízos relacionados à transtornos do neurodesenvolvimento, principalmente aos transtornos de espectro autista, conhecidamente com prejuízos no comportamento social (Desbonnet et al, 2014; Macri et al, 2010).

Sabe-se que o nocaute para ERK 2 no SNC em camundongos causa alterações no comportamento social dos animais (Satoh et al, 2011a) e a redução nos níveis de ERK 2 durante o desenvolvimento neural têm importantes consequências, como por exemplo, atraso no desenvolvimento do SNC, prejuízos nas funções cognitivas, bem como, possíveis alterações na regulação do comportamento social em camundongos (Samuels et al, 2008; Satoh et al, 2011a; Yufune et al, 2015). Nosso objetivo por meio do teste de interação social entre os grupos em PN30, foi avaliar prováveis danos ao comportamento social

dos animais após a administração de U0126 (PN7-14). No entanto, não houve diferença significativa no comportamento social, avaliado através do teste de interação social, entre animais tratados com U0126 comparado ao grupo controle (DMSO 1 %) (Figura 17). Da mesma forma os resultados obtidos na avaliação da atividade locomotora dos animais em PN30, após inibição de MEK1/2 durante o período de PN7-14, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, como apresentado na Figura 18.

A maioria dos transtornos do neurodesenvolvimento têm o surgimento de suas alterações neuroquímicas e comportamentais na infância e adolescência, e essas alterações tornam-se permanentes, contribuindo para a gênese de neuropatologias na vida adulta (Yu et al, 2014; Yufune et al, 2015). Quando avaliados na vida adulta, os animais apresentaram resultados importantes nos testes comportamentais (PN55-63) após a inibição de MEK 1/2 durante o período de PN7 a PN14. Com relação a atividade locomotora dos animais, os mesmos foram avaliados no teste do campo aberto, e não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados, corroborando com resultados de estudos prévios (Yufune et al, 2015). Os resultados obtidos da análise da distância total percorrida no campo aberto não foram significativamente diferentes entre os animais administrados com U0126 (PN7-14) e o grupo controle (DMSO 1 %) (Figura 19). Da mesma forma, não houve diferença significativa na velocidade média dos animais entre os grupos no teste do campo aberto. Quando avaliada a coordenação motora dos animais injetados com U0126 (PN7-14), não foram observadas alterações sobre o tempo médio de latência para a queda dos animais no teste do rotarod comparado ao controle (DMSO 1 %) (Figura 20).

Comportamentos relacionados à ansiedade também foram realizados nos animais tratados com U0126 (PN7-14) e os resultados obtidos não demonstraram alterações no número total de cruzamentos nos braços fechados, bem como não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no parâmetro que reflete o comportamento de resposta ao risco, através do tempo de permanência nos braços abertos; e no número de entradas nos braços abertos (Figura 21). Evidências da literatura apresentam controvérsias com relação ao comportamento do tipo ansioso após a inibição, seja por interferência genética ou através da administração de inibidores, da via Ras-Raf-MEK-ERK. Demonstrando um aumento da porcentagem no tempo de permanência dos animais nos braços abertos comparados ao grupo controle (DMSO 1 %), indicando uma diminuição na ansiedade dos camundongos após 4 semanas da administração do inibidor de MEK 1/2 (PN6) (Yufune et al, 2015). Como também, a indução de camundongos nocaute para *Braf* na adolescência resultando em comportamento do tipo ansioso em camundongos avaliados na vida adulta (Wefers et al, 2012).

Além das ações originalmente descritas para a via ERK1/2 na regulação da divisão e proliferação celular, muitos estudos relatam sua importante função na plasticidade sináptica e nos processos de aprendizado e memória (Thomas & Huganir, 2004). Dentro desse paradigma, foi avaliado se o tratamento com U0126 (5 mg/kg; i.p.) no período de PN7-14 poderia levar a alterações na memória de curta duração de maneira tardia, durante a vida adulta dos ratos. A memória de curta duração dos animais foi avaliada através do teste de realocação de objetos, utilizado como modelo comportamental de memória dependente do hipocampo (Assini et al, 2009). Os resultados obtidos apresentaram

alterações importantes na memória dos animais administrados com U0126 (PN7-14) avaliados na vida adulta (PN55-63) (Figura 22). Corroborando com estudos prévios que demonstraram esse perfil de déficit cognitivo em animais que sofreram algum tipo de inibição, através de interferências genéticas ou administração de inibidores, da via de sinalização envolvendo ERK1/2 durante períodos iniciais do desenvolvimento pós-natal de ratos (Samuels et al, 2008; Yufune et al, 2015).

Prejuízos em testes comportamentais dependentes do hipocampo (Assini et al, 2009; Winocur et al, 2006) podem ser um indício de prejuízos importantes na capacidade de neurogênese desses animais (Deng et al, 2010). Para analisar tal correlação entre prejuízo na memória de curta duração, acarretados pela administração de U0126 (5 mg/kg, i.p.) durante uma janela específica do desenvolvimento neural (PN7-14), na capacidade de produção de novos neurônios na vida adulta, foram realizados experimentos de imunistoquímica para Ki-67, um marcador endógeno de proliferação celular, no giro dentado do hipocampo dos ratos. Os resultados apresentaram uma diminuição significativa nas células positivas para Ki-67, corroborando com os dados da literatura que afirmam uma correlação positiva entre a proliferação celular e a função cognitiva em roedores (Kotagiri et al, 2014; Sahay et al, 2011) (Figura 23). Sabe-se de estudos prévios que a inibição na sinalização de ERK durante o desenvolvimento cortical resulta em alterações na proliferação das células progenitoras neurais (Pucilowska et al, 2012), como também uma significativa diminuição na neurogênese na vida adulta em camundongos (Satoh et al, 2011b), evidenciando o papel fundamental da

via de sinalização MEK-ERK na manutenção da neurogênese adulta (Vithayathil et al, 2015).

Além da capacidade de produzir novas células, foi avaliado no hipocampo dos animais administrados com U0126 (PN7-14) a expressão de GFAP, na vida adulta. Estudos recentes mostram que alterações no neurodesenvolvimento podem estar relacionados com aumento de astrogliose na vida adulta, com possíveis efeitos de predisposição à doenças neurodegenerativas (Cardoso et al, 2015; Peres et al, 2015; Rodricks et al, 2010). Observando os resultados obtidos pode-se afirmar um aumento na expressão GFAP, um conhecido marcador da ativação de astrócitos em situações de insulto (Eng et al, 2000) (Figura 24).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam um perfil característico da atividade das MAPKs durante o desenvolvimento pós-natal. Da mesma forma indicam que alteração, mesmo que sutil, da atividade de uma via como MEK/ERK, em períodos específicos do desenvolvimento pós-natal, levam a alterações celulares e comportamentais em períodos tardios da vida pós-natal.

Dessa forma enumeramos abaixo os principais pontos de conclusão:

i. O perfil de fosforilação e conteúdo total de cada um das MAPKs analisada (JNK p54/p46, ERK 1/2 e p38^{MAPK}) no hipocampo foi distinto durante o desenvolvimento pós-natal do sistema nervoso central (SNC) em ratos;

ii. A ativação de p38^{MAPK} e ERK 1/2 apresentou uma regulação dinâmica e transitória durante o período do desenvolvimento pós-natal do hipocampo de ratos (PN1-60);

iii. A ativação diferencial de p38^{MAPK} e ERK 1/2 durante as primeiras semanas de vida pós-natal em ratos, sugere uma correlação temporal da ativação dessas MAPKs no hipocampo, com períodos críticos de morte celular programada e sinaptogênese no SNC em ratos;

iv. Injeção intraperitoneal de U0126 (5 mg/kg) em PN7 causou inibição transitória significativa na fosforilação de ERK 1 em amostras de hipocampo obtida 6 h após a administração do inibidor. Resultados similares foram encontrados utilizando outro inibidor de MEK1/2, SL327, nas mesmas condições testadas com U0126;

v. A administração de U0126 em um período crítico do desenvolvimento pós-natal do SNC em ratos (PN7-14) resultou em importantes alterações neuroquímicas e comportamentais na vida adulta;

vi. Administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.) durante o período crítico PN7-14 acarretou em modificações na estrutura sináptica no hipocampo de ratos em PN30, incluindo: diminuição na densidade pós-sináptica e diminuição no número de vesículas no terminal pré-sináptico; sem alterar significativamente proteínas envolvidas na transmissão sináptica (sinapsina I e CaMKII);

vii. Administração de U0126 (5 mg/kg; i.p.; PN7-14) resultou em danos permanentes na memória de curta duração na vida adulta. Paralelamente, causou inibição da proliferação celular no giro dentado do hipocampo bem como aumento na expressão de GFAP.

Em conjunto esses achados colaboram para a compreensão de possíveis eventos em nível molecular que poderiam participar na etiologia de transtornos associados à alterações do desenvolvimento neural, incluindo: autismo, déficit de atenção e hiperatividade, dislexia, entre outros prejuízos cognitivos que afetam milhões de crianças no mundo. Estas observações têm implicações clínicas importantes, pois reforçam a noção de que alterações da sinalização celular por fatores genéticos ou insultos ambientais no início na vida podem levar a um conjunto de alterações neurais ao longo da vida. Os estudos atuais, em relação aos distúrbios neurológicos e psiquiátricos, revelam que em grande parte das vezes há um componente do desenvolvimento envolvido nos transtornos, que podem decorrer de acometimentos durante o período intrauterino ou pós-natal. Portanto, compreender a sequência e modulação dos eventos do neurodesenvolvimento, bem como as alterações decorrentes dos

acometimentos durante a fase perinatal representa um desafio que envolve uma profunda compreensão da ontogenia das vias de sinalização.

7 REFERÊNCIAS

Adams F (1939) The Genuine works of Hippocrates. *Baltimore: Williams and Wilkins*

Aguiar AS, Jr., Araujo AL, da-Cunha TR, Speck AE, Ignacio ZM, De-Mello N, Prediger RD (2009) Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain Res Bull* **79**: 452-457

Alleva E, Bignami G (1986) Prenatal benzodiazepine effects in mice: postnatal behavioral development, response to drug challenges, and adult discrimination learning. *Neurotoxicology* **7**: 303-317

Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *The Journal of comparative neurology* **136**: 269-293

Altman J, Bayer SA (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *The Journal of comparative neurology* **301**: 365-381

Anda RF, Felitti VJ, Bremner JD, Walker JD, Whitfield C, Perry BD, Dube SR, Giles WH (2006) The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* **256**: 174-186

Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN (2009) Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Res* **204**: 206-211

Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 14108-14113

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB (2005) A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* **65**: 1873-1887

Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *The Journal of comparative neurology* **190**: 115-134

Bayer SA (1983) 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Experimental brain research* **50**: 329-340

Bjorkblom B, Ostman N, Hongisto V, Komarovski V, Filen JJ, Nyman TA, Kallunki T, Courtney MJ, Coffey ET (2005) Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *J Neurosci* **25**: 6350-6361

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. *Nature neuroscience* **3**: 1107-1112

Breasted J (1930) The Edwin Smith Surgical Papyrus. *Chicago, IL: University of Chicago Press*

Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willeßen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearse D, Kuan CY, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell RA, Davis RJ, Herdegen T (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *The European journal of neuroscience* **21**: 363-377

Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* **9**: 110-122

Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, McGavern DB, Brites D (2015) Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *Journal of neuroinflammation* **12**: 82

Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* **29**: 1193-1205

- Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F (2010) The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Progress in neurobiology* **91**: 313-348
- Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M (2003) JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* **4**: 521-533
- 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**: 2449-2476
- Cheng P, Alberts I, Li X (2013) The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **31**: 783-789
- Clarke GL, Chen J, Nishimune H (2012) Presynaptic Active Zone Density during Development and Synaptic Plasticity. *Frontiers in molecular neuroscience* **5**: 12
- Coras R, Siebzehnrubl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, Villmann C, Hahnen E, Neuhuber W, Weigel D, Buchfelder M, Stefan H, Beck H, Steindler DA, Blumcke I (2010) Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain : a journal of neurology* **133**: 3359-3372
- Cordova FM, Rodrigues AL, Giacomelli MB, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR, Leal RB (2004) Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* **998**: 65-72
- Corson LB, Yamanaka Y, Lai KM, Rossant J (2003) Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* **130**: 4527-4537

Costa LG, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin OP (2004) Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual review of pharmacology and toxicology* **44**: 87-110

Cruz AP, Frei F, Graeff FG (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **49**: 171-176

Dawson GR, Tricklebank MD (1995) Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in pharmacological sciences* **16**: 33-36

Dekkers MP, Barde YA (2013) Developmental biology. Programmed cell death in neuronal development. *Science* **340**: 39-41

Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* **11**: 339-350

Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF (2014) Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular psychiatry* **19**: 146-148

Dobbing J, Sands J (1971) Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol Neonate* **19**: 363-378

Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* **3**: 79-83

Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research* **25**: 1439-1451

Giachello CN, Fiumara F, Giacomini C, Corradi A, Milanese C, Ghirardi M, Benfenati F, Montarolo PG (2010) MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. *Journal of cell science* **123**: 881-893

- Grandjean P, Landrigan PJ (2014) Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology* **13**: 330-338
- Haeusgen W, Boehm R, Zhao Y, Herdegen T, Waetzig V (2009) Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain. *Neuroscience* **161**: 951-959
- Harris KM, Weinberg RJ (2012) Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**
- Hayashi K, Kubo K, Kitazawa A, Nakajima K (2015) Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Frontiers in neuroscience* **9**: 135
- Hu BR, Park M, Martone ME, Fischer WH, Ellisman MH, Zivin JA (1998) Assembly of proteins to postsynaptic densities after transient cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**: 625-633
- Hyde RA, Strowbridge BW (2012) Mnemonic representations of transient stimuli and temporal sequences in the rodent hippocampus in vitro. *Nature neuroscience* **15**: 1430-1438
- Innocenti GM, Price DJ (2005) Exuberance in the development of cortical networks. *Nature reviews Neuroscience* **6**: 955-965
- Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R (2014) Role of ERK1/2 MAPK signaling in the maintenance of myelin and axonal integrity in the adult CNS. *J Neurosci* **34**: 16031-16045
- Jansen A, Andermann E (2005) Genetics of the polymicrogyria syndromes. *J Med Genet* **42**: 369-378
- Jeanneteau F, Deinhardt K, Miyoshi G, Bennett AM, Chao MV (2010) The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. *Nature neuroscience* **13**: 1373-1379
- Jovanovic JN, Sihra TS, Nairn AC, Hemmings HC, Jr., Greengard P, Czernik AJ (2001) Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca²⁺-dependent glutamate release in isolated nerve

terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 7944-7953

Kim WR, Sun W (2011) Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system. *Development, growth & differentiation* **53**: 225-235

Koehl M (2015) Gene-environment interaction in programming hippocampal plasticity: focus on adult neurogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience* **8**: 41

Kolb B, Gibb R (2011) Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Academie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent* **20**: 265-276

Kolb B, Mychasiuk R, Williams P, Gibb R (2011) Brain plasticity and recovery from early cortical injury. *Developmental medicine and child neurology* **53 Suppl 4**: 4-8

Koros E, Rosenbrock H, Birk G, Weiss C, Sams-Dodd F (2007) The selective mGlu5 receptor antagonist MTEP, similar to NMDA receptor antagonists, induces social isolation in rats. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **32**: 562-576

Kotagiri P, Chance SA, Szele FG, Esiri MM (2014) Subventricular zone cytoarchitecture changes in autism. *Developmental neurobiology* **74**: 25-41

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**: 667-676

Kyriakis JM, Avruch J (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *The Journal of biological chemistry* **271**: 24313-24316

Leal RB, Posser T, Rigon AP, Oliveira CS, Goncalves CA, Gelain DP, Dunkley PR (2007) Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27

phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology* **234**: 34-43

Lenroot RK, Giedd JN (2006) Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **30**: 718-729

Li X, Newbern JM, Wu Y, Morgan-Smith M, Zhong J, Charron J, Snider WD (2012) MEK Is a Key Regulator of Gliogenesis in the Developing Brain. *Neuron* **75**: 1035-1050

Macri S, Biamonte F, Romano E, Marino R, Keller F, Laviola G (2010) Perseverative responding and neuroanatomical alterations in adult heterozygous reeler mice are mitigated by neonatal estrogen administration. *Psychoneuroendocrinology* **35**: 1374-1387

Matheus FC, Rial D, Real JI, Lemos C, Takahashi RN, Bertoglio LJ, Cunha RA, Prediger RD (2015) Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. *Molecular neurobiology*

Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**: 807-820

Murai T, Okuda S, Tanaka T, Ohta H (2007) Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiol Behav* **90**: 116-124

Nasuti C, Fattoretti P, Carloni M, Fedeli D, Ubaldi M, Ciccocioppo R, Gabbianelli R (2014) Neonatal exposure to permethrin pesticide causes lifelong fear and spatial learning deficits and alters hippocampal morphology of synapses. *Journal of neurodevelopmental disorders* **6**: 7

Nikolic M, Gardner HA, Tucker KL (2013) Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience* **254**: 369-378

O'Brien DE, Alter BJ, Satomoto M, Morgan CD, Davidson S, Vogt SK, Norman ME, Gereau GB, Demaro JA, 3rd, Landreth GE, Golden JP, Gereau RWt (2015) ERK2 Alone Drives Inflammatory Pain But Cooperates with ERK1 in Sensory Neuron Survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**: 9491-9507

Obiorah M, McCandlish E, Buckley B, DiCicco-Bloom E (2015) Hippocampal developmental vulnerability to methylmercury extends into prepubescence. *Front Neurosci* **9**: 150

Oliveira CS, Rigon AP, Leal RB, Rossi FM (2008) The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **26**: 355-362

Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* **286**: 1374-1377

Peres TV, Eyng H, Lopes SC, Colle D, Goncalves FM, Venske DK, Lopes MW, Ben J, Bornhorst J, Schwerdtle T, Aschner M, Farina M, Prediger RD, Leal RB (2015) Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. *Neurotoxicology* **50**: 28-37

Perlini LE, Botti F, Fornasiero EF, Giannandrea M, Bonanomi D, Amendola M, Naldini L, Benfenati F, Valtorta F (2011) Effects of phosphorylation and neuronal activity on the control of synapse formation by synapsin I. *Journal of cell science* **124**: 3643-3653

Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356

Prediger RD, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, Da Silva CB, Carradore RS, Machado MS, Cechinel-Filho V, Costa-Campos L (2008) Effects of acute administration of the hydroalcoholic

extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *Journal of ethnopharmacology* **120**: 465-473

Price KA, Varghese M, Sowa A, Yuk F, Brautigam H, Ehrlich ME, Dickstein DL (2014) Altered synaptic structure in the hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease with soluble amyloid-beta oligomers and no plaque pathology. *Molecular neurodegeneration* **9**: 41

Pucilowska J, Puzerey PA, Karlo JC, Galan RF, Landreth GE (2012) Disrupted ERK signaling during cortical development leads to abnormal progenitor proliferation, neuronal and network excitability and behavior, modeling human neuro-cardio-facial-cutaneous and related syndromes. *J Neurosci* **32**: 8663-8677

Pucilowska J, Vithayathil J, Tavares EJ, Kelly C, Karlo JC, Landreth GE (2015) The 16p11.2 deletion mouse model of autism exhibits altered cortical progenitor proliferation and brain cytoarchitecture linked to the ERK MAPK pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**: 3190-3200

Qu C, Li W, Shao Q, Dwyer T, Huang H, Yang T, Liu G (2013) c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) is required for coordination of netrin signaling in axon guidance. *The Journal of biological chemistry* **288**: 1883-1895

Reiss AL, Abrams MT, Singer HS, Ross JL, Denckla MB (1996) Brain development, gender and IQ in children. A volumetric imaging study. *Brain : a journal of neurology* **119** (Pt 5): 1763-1774

Rice D, Barone S, Jr. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* **108 Suppl 3**: 511-533

Rodricks CL, Gibbs ME, Castillo-Melendez M, Miller SL (2010) The effect of hypoxia on the functional and structural development of the chick brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **28**: 343-350

Roth TL, Sweatt JD (2011) Annual Research Review: Epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive

periods of development. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* **52**: 398-408

Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF (1999) Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* **89**: 115-124

Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* **472**: 466-470

Samuels IS, Karlo JC, Faruzzi AN, Pickering K, Herrup K, Sweatt JD, Saitta SC, Landreth GE (2008) Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 6983-6995

Satoh Y, Endo S, Nakata T, Kobayashi Y, Yamada K, Ikeda T, Takeuchi A, Hiramoto T, Watanabe Y, Kazama T (2011a) ERK2 contributes to the control of social behaviors in mice. *J Neurosci* **31**: 11953-11967

Satoh Y, Kobayashi Y, Takeuchi A, Pages G, Pouyssegur J, Kazama T (2011b) Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS causes cortical abnormalities and neonatal lethality: Erk1 deficiency enhances the impairment of neurogenesis in Erk2-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 1149-1155

Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* **182**: 311-322

Schwarzbold ML, Rial D, De Bem T, Machado DG, Cunha MP, dos Santos AA, dos Santos DB, Figueiredo CP, Farina M, Goldfeder EM, Rodrigues AL, Prediger RD, Walz R (2010) Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *J Neurotrauma* **27**: 1883-1893

Spennath MA, Clarke ME, Kutcher S (2011) The science of brain and biological development: implications for mental health research, practice and policy. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent*

Psychiatry = Journal de l'Academie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent **20**: 298-304

Stiles J, Jernigan TL (2010) The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* **20**: 327-348

Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current opinion in neurobiology* **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 to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **7**: 1099-1111

Tao-Cheng JH, Gallant PE, Brightman MW, Dosemeci A, Reese TS (2007) Structural changes at synapses after delayed perfusion fixation in different regions of the mouse brain. *The Journal of comparative neurology* **501**: 731-740

Thomas GM, Haganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**: 173-183

Vithayathil J, Pucilowska J, Goodnough LH, Atit RP, Landreth GE (2015) Dentate Gyrus Development Requires ERK Activity to Maintain Progenitor Population and MAPK Pathway Feedback Regulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**: 6836-6848

Waetzig V, Herdegen T (2004) Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neuroscience letters* **361**: 64-67

Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T (2006) The bright side of JNKs- Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol* **80**: 84-97

Watson RE, Desesso JM, Hurtt ME, Cappon GD (2006) Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **77**: 471-484

Wefers B, Hitz C, Holter SM, Trumbach D, Hansen J, Weber P, Putz B, Deussing JM, de Angelis MH, Roenneberg T, Zheng F, Alzheimer C, Silva A, Wurst W, Kuhn R (2012) MAPK signaling determines anxiety in the juvenile mouse brain but depression-like behavior in adults. *PLoS one* **7**: e35035

Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S (2006) Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* **16**: 296-304

World Health Organization W (2012) Child and adolescent mental health policies and plans. *Geneva: World Health Organization*

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326-1331

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 research* **1085**: 68-76

Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2005) Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* **135**: 815-827

Yu Q, Teixeira CM, Mahadevia D, Huang Y, Balsam D, Mann JJ, Gingrich JA, Ansorge MS (2014) Dopamine and serotonin signaling during two sensitive developmental periods differentially impact adult aggressive and affective behaviors in mice. *Molecular psychiatry* **19**: 688-698

Yufune S, Satoh Y, Takamatsu I, Ohta H, Kobayashi Y, Takaenoki Y, Pages G, Pouyssegur J, Endo S, Kazama T (2015) Transient Blockade of ERK Phosphorylation in the Critical Period Causes Autistic Phenotypes as an Adult in Mice. *Scientific reports* **5**: 10252

Zhen X, Du W, Romano AG, Friedman E, Harvey JA (2001) The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in associative learning in rabbits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 5513-5519

Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* **110**: 443-455

ANEXOS

**1 Artigo submetido ao periódico *Neurochemical Research*:
“Differential activation of mitogen-activated protein kinases,
ERK 1/2, p38MAPK and JNK p54/p46 during postnatal
development of rat hippocampus”.**

Ms. No.: NERE-D-15-00566R1

Title: Differential activation of mitogen-activated protein kinases, ERK 1/2, p38MAPK and JNK p54/p46 during postnatal development of rat hippocampus.

Authors: Ana Paula Costa, Mark William Lopes, Débora K. Rieger, Sabrina Gionava Rocha Barbosa, Filipe Marques Gonçalves, João Carlos Xikota, Roger Walz, Rodrigo B. Leal

Neurochemical Research

Corresponding Author: Dr. Rodrigo Bainy Leal

Differential activation of mitogen-activated protein kinases, ERK 1/2, p38^{MAPK} and JNK p54/p46 during postnatal development of rat hippocampus

Ana Paula Costa ^{a,b}, Mark William Lopes ^b, Débora K. Rieger ^b, Sabrina Giovana Rocha Barbosa ^b, Filipe Marques Gonçalves ^b, João Carlos Xikota ^c, Roger Walz ^{a,c}, Rodrigo B. Leal ^{a,b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040–900, Brazil.

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040–900, Brazil.

^c Departamento de Clínica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.

* Corresponding author: Rodrigo Bainy Leal, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil. Phone: +55 48 37211-5045; Fax +55 48 3721-9672; E-mail address: rbleal@gmail.com

Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a group of serine-threonine kinases, including p38^{MAPK}, ERK 1/2 and JNK p54/p46, activated by phosphorylation in response to extracellular stimuli. The early postnatal period is characterized by significant changes in brain structure as well as intracellular signaling. In the hippocampus MAPKs have been involved in the modulation of development and neural plasticity. However the temporal profile of MAPK activation throughout the early postnatal development is incomplete. An understanding of this profile is important since slight changes in the activity of these enzymes, in response to environmental stress in specific developmental windows, might alter the course of development. The present study was undertaken to investigate the hippocampal differential activation of MAPK during postnatal period. MAPK activation and total content were evaluated by Western blotting of hippocampal tissue obtained from male Wistar rats at postnatal days (P) 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 and 60. The total content and phosphorylation of each MAPK was expressed as mean \pm S.E.M and then calculates as a percentile compared to P1 (set at 100%). The results showed: (i) phosphorylation peaks of p38^{MAPK} at PN4 ($p=0.036$) and PN10 to PN60; (ii) phosphorylation of ERK1 and ERK2 were increased with age (ERK1 $p=0.0000005$ and ERK2 $p=0.003$); (iii) phosphorylation profile of JNK p54/p46 was not changed during the period analyzed (JNKp56 $p=0.716$ and JNKp46 $p=0.192$). Therefore, the activity profile of ERK 1/2 and p38^{MAPK} during postnatal development of rat hippocampus are differentially regulated. Our results demonstrate that ERK 1/2 and p38^{MAPK} are dynamically regulated during postnatal neurodevelopment, suggesting temporal correlation of MAPK activity

with critical periods when programmed cell death and synaptogenesis are occurring. This suggests an important role for these MAPKs in postnatal development of rat hippocampus.

Keywords: Mitogen-activated protein kinase, neurodevelopment, rat hippocampus, postnatal brain development.

Introduction

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a group of serine-threonine kinases activated by dual phosphorylation of a threonine and a tyrosine residue by an upstream kinase(s) in response to extracellular stimuli (Chen & Cobb, 2001). Typical MAPK cascades are composed of three enzymes, which are sequentially activated by phosphorylation: a MAPK kinase kinase (MAPKKK); a MAPK kinase (MAPKK); and a MAPK (Chang & Karin, 2001; Thomas & Huganir, 2004). Therefore, MAPKs can amplify and integrate signals originating from a variety of extracellular stimuli ending in phosphorylation with high efficiency and specificity of a variety of cellular proteins including transcription factors and other protein kinases (Kim & Choi, 2010).

The foremost enzymes studied in the MAPK family include the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK 1/2), c-Jun amino-terminal-kinase 1-3 (JNK 1/2/3) and p38^{MAPK} (α , β , γ e δ) (Cargnello & Roux, 2011; Chang & Karin, 2001; Johnson & Lapadat, 2002; Waetzig & Herdegen, 2004).

The activation of ERK 1/2 via Ras-Raf-MEK signaling pathway in response to growth factors can modulate gene expression and in this way essential processes such as cell proliferation and differentiation, embryogenesis, cell death and survival, as well as neuroplasticity (Li et al, 2012; Zsarnovszky & Belcher, 2004). p38^{MAPK} and JNK 1/2/3 were primarily described as enzymes stimulated by environment stressors and inflammatory signals, then recognized as stress-activated protein kinases (SAPK) which play role in the mechanism of inflammation, stress responses and cell death (Cowan & Storey, 2003). However, JNK and p38^{MAPK} also regulate central nervous system (CNS) development and neuroplasticity (Waetzig & Herdegen, 2004; Waetzig et al, 2006) and have been implicated in cell migration (Huang et al, 2004).

The normal ontogeny of neural development in rodents involves a substantial postnatal development while humans have considerably more prenatal maturation of the CNS (Dobbing & Sands, 1971; Rice & Barone, 2000; Watson et al, 2006). Therefore, postnatal brain development is a critical period for the progress of synaptic connectivity in rodents, since cell proliferation, migration, differentiation, synaptogenesis, myelination and apoptosis take place in this period (Dobbing & Sands, 1971; Dobbing & Sands, 1979; Rice & Barone, 2000). In the hippocampus, many of the connections reach maturity by the end of the second postnatal week, following an identifiable developmental progression that appears to be common for a wide range of species.

In spite of the extensive studies concerning the biochemical mechanisms that regulate the activity of MAPKs as well as their physiological and pathological roles in the modulation of the CNS function, the ontogenetic profile of MAPKs activity, especially in specific

structures and during the postnatal period, is not well described. Although human studies are critical in shedding light on the biological basis of neural function, development and disorders, they encompass significant intrinsic limitations. Thus, animal models are required to define the normal developmental trajectory of the brain, and to identify critical periods in organization that might represent points of great vulnerability to environmental perturbation. Therefore, an understanding of temporal patterning of the phosphorylation and total levels of MAPKs (p38^{MAPK}, ERK 1/2 and JNK p54/p46) throughout the early postnatal development is important. This approach has been applied to understand the role of these enzymes and the transcription factor CREB in the postnatal development of the rat visual system, which display a significant developmental plasticity (Oliveira et al, 2008; Vierci et al, 2013).

Hippocampus is a structure fundamental for cognition, memory acquisition and retrieval, but it is also involved in stress-related mental disorders such as major depressive and anxiety disorders (Guan et al, 2013). Noteworthy, MAPKs and their downstream targets have been implied in the regulation of physiological and pathological hippocampal plasticity and development (Thomas & Huganir, 2004) and rat hippocampus has been largely used in all these studies. However, surprisingly little is known about the differential activation of MAPKs during postnatal development of rat hippocampus. Furthermore, recent studies demonstrating the spatial and temporal patterns of MAPK signaling are focalized in the embryony period, while the postnatal studies have been undertaken in genetically modified mice with deletion of specific MAPK isoforms (Corson et al, 2003; Wefers et al, 2012).

In order to determine this feature we investigated the ontogenetic profile of phosphorylation and total levels of MAPKs (p38^{MAPK}, ERK 1/2 and JNK p54/p46) in the rat hippocampus during postnatal development (P1-60). Our results demonstrate that the activation of ERK 1/2 and p38^{MAPK} is dynamically regulated during specific neurodevelopmental windows. Moreover, the temporal correlation of MAPK activation with critical periods for programmed cell death and synaptogenesis reinforce the role of these enzymes in the postnatal development of rat hippocampus.

Materials and Methods

Chemicals

HEPES, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS), acrylamide, and bis-acrylamide, were obtained from GE Healthcare Life Science (Piscataway, NJ, USA). Glycine, Tris, TEMED, Protease Inhibitor Cocktail (M222) and β -mercaptoethanol were obtained from Amresco Life Science (Solon, OH, USA). Bovine serum albumin (BSA) was obtained from Inlab (São Paulo, SP, Brazil). Immobilon nitrocellulose, goat anti-mouse IgG HRP (horseradish peroxidase)-conjugated (AP308P), goat anti-rabbit IgG HRP (AP132P) were obtained from Millipore (Billerica, MA, USA). Ammonium persulfate (APS), rabbit anti-total-ERK 1/2, anti-total-JNK1/2/3, anti-phospho and anti-total-p38^{MARK} were obtained from the Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Lumi-GLO reagent (luminal chemiluminescent substrate), rabbit anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-JNK1/2/3 antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti- β actin (sc-

47778) antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). All other reagents were of analytical grade.

Animal procedures

Male Wistar rats of different ages (postnatal day (P): 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 e 60) were obtained from the Federal University of Santa Catarina breeding colony. The animals were maintained in an air conditioned room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12 h light/dark cycle with water and food available *ad libitum*. All procedures used in the present study complied with the “Guide for the care and use of laboratory animals” (NIH publication, 8th edition, 2011) and were approved by the local Ethical Committee for Animal Research of The Federal University of Santa Catarina for the use of animals (CEUA/UFSC; www.ceua.com.br; Permit Number: PP00772). All efforts were made to minimize the number of animals used and animal suffering.

Western Blot analysis

For quantification of MAPK activation and total levels Western blotting analysis was performed as previously described (Cordova et al, 2013; Leal et al, 2002; Lopes et al, 2013). Animals were killed by decapitation, brains were excised from the skull and hippocampus was dissected (4°C) into “cutting solution” (sucrose 110 mM, NaCl 60 mM, KCl 3 mM, KH_2PO_4 1.25 mM, CaCl_2 0.5 mM, Mg_2SO_4 7 mM, glucose 5 mM; HEPES 25 mM pH 7.4), and placed in liquid nitrogen and then stored at -80°C until use. Samples were prepared as previously described by (Lopes et al, 2012). Briefly, samples were mechanically homogenized in 400 μL of Tris 50 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0.1

mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glycerol 10%, AMRESCO Protease Inhibitor Cocktail (M222). Lysates were centrifuged (10,000 x g for 10 min; at 4°C) to eliminate cellular debris. The supernatants were diluted 1/1 (v/v) in Tris 100 mM pH 6.8, EDTA 4 mM, and 8% SDS and boiled for 5 min. Thereafter, sample dilution solution (40% glycerol, 100 mM Tris, bromophenol blue, pH 6.8) in the ratio 25:100 (v/v) and β-mercaptoethanol (final concentration 8%) were added to the samples. Protein content was estimated by the method described by (Peterson, 1977). The same amount of protein (70 µg per lane) for each sample was electrophoresed in 10% SDS- PAGE minigels and transferred to nitrocellulose membranes using a semidry blotting apparatus (1.2 mA/cm²; 1.5 h). To verify transfer efficiency, membranes were stained with Ponceau Stain. The membranes were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline (TBS) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5). MAPKs phosphorylated and total levels were detected after overnight incubation with specific antibodies diluted in TBS-T containing 2% BSA in the dilutions of 1:1000: anti-phospho-JNK 1/2/3 (Sigma-Aldrich), 1:2000 anti-phospho-ERK 1/2 (Sigma-Aldrich), 1:5000 (anti-total-JNK 1/2 (Sigma-Aldrich), 1:10000 antiphospho-p38^{MAPK} (Millipore), anti-total-p38^{MAPK} (Sigma-Aldrich); and 1:40000 anti-total-ERK 1/2 (Sigma-Aldrich). Moreover, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti rabbit antibody for detection of phosphorylated and total forms of each MAPK. The reactions developed by chemiluminescence substrate (LumiGLO). All blocking and incubation steps were followed by three times washing (5 min) with TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5). All membranes were incubated with mouse anti-β-actin (1:2000)

antibody to verify that equal amounts of proteins were loaded on the gel. The phosphorylation levels of MAPKs were determined as a ratio of OD of phosphorylated band/OD of total band of the respective MAPK. Moreover, the total forms of each MAPK were determined as ratio of OD of the total MAPK band/OD of β -actin band. The bands were quantified using the Scion Image® software, which is a derivative of NIH Image (Frederick, MD, USA). 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 established ERK isoforms, ERK1 and ERK2. Anti-p38^{MAPK} detected a single band of approximately 38 kDa, anti-JNK1/2/3 detected two bands, one at approximately 54 kDa and the second at approximately 46 kDa, corresponding to the established JNK isoforms 1/2/3.

Statistical analysis

The total content and the level of phosphorylation of each protein were expressed as percentage comparative to P1 (set as 100%) and the data represent the mean \pm S.E.M. Statistical significance of the phosphorylation of MAPKs during experimental periods were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's *post-hoc* test when appropriate. Analyses were performed with STATISTICA™ 5.1 '98 Edition (StatSoft, Tulsa, OK, USA). A value of $p \leq 0.05$ was considered to be significant.

Results

Western blot analysis of phosphorylated JNK p54/p46 during postnatal development of the rat hippocampus did not show changes at

the ages analyzed (JNKp54: $F(7,48)=0.64$; $p=0.716$ and JNKp46: $F(7,48)=1.50$; $p=0.192$) (Figure 1). However, the immunocontent of JNKp54 increased at P4, and P10 to P60 during postnatal development of the rat hippocampus ($F(7,48)=3.41$; $p=0.004$) (Figure 1C). Differently, the total form of JNKp46 was not changed in the ages analyzed ($F(7,48)=1.21$; $p=0.314$) (Figure 1C).

The phosphorylation of ERK1 and ERK2 isoforms in the rat hippocampus during postnatal development (P1-60) was regulated with increasing age (ERK1: $F(7,56)=8.52$; $p=0.0000005$ and ERK2: $F(7,56)=3.53$; $p=0.003$) as shown at Figure 2. The results showed that ERK1 phosphorylation was increased at P4 ($p=0.014$) and this increment was amplified significantly at later ages (approximately 2 times) as compared to P1 (Figure 2B). ERK2 phosphorylation was relatively constant between P1 and P10, then increased at P14 ($p=0.039$) through P60 ($p=0.0005$) (Figure 2D). The immunocontent of ERK1 and ERK2 was changed during postnatal development of the rat hippocampus (ERK1: $F(7,56)=2.38$; $p=0.033$ and ERK2: $F(7,56)=4.38$; $p=0.0006$) as shown in Figure 2C and 2E. ERK1 exhibited a significant increase of its content in aged P10, P21 and P60 ($p<0.05$); while ERK2 content was increased from P10, and remained high until P60 ($p<0.05$).

The phosphorylation of p38^{MAPK} revealed a bimodal regulation during postnatal development ($F(7,48)=3.91$; $p=0.002$) (Figure 3) as compared to the P1 (set as 100%). It can be observed that in P4 the phosphorylation of p38^{MAPK} was increased ($p=0.036$), returning to the initial level at P7 ($p=0.510$). Moreover, p38^{MAPK} activity was increased again at P10 ($p=0.032$), decreasing at P14 ($p=0.165$). Finally, p38^{MAPK} phosphorylation was increased in P21 ($p=0.011$), remaining in a similar

level through P30 ($p=0.025$) and P60 ($p=0.007$) (Figure 3B). Notably, the total level of p38^{MAPK} did not change significantly during postnatal development of the rat hippocampus at the ages analyzed ($F(7,56)=1.23$; $p=0.301$) (Figure 3C).

Discussion

MAPK signaling have been implicated in brain development and their upstream and downstream regulators have a key role in many fundamental processes occurring during brain development (Cheng et al, 2013; Jeanneteau et al, 2010; Qu et al, 2013). Disruption of MAPK signaling adversely affects brain development and is associated with several neurodevelopmental disorders (Qu et al, 2013; Yufune et al, 2015). In spite of this, a systematic study addressing the postnatal profile of MAPKs content and their activation in specific areas of the CNS is scarce (Oliveira et al, 2008). Hippocampus is an area that displays remarkable neuroplasticity and is involved in learning, memory formation and memory retrieval. Beyond, hippocampus may participate in cognitive disorders as well as major depressive and anxiety disorders. Concerning the molecular mechanisms, MAPKs and their downstream targets have been indicated to play a major role in these physiological and pathological processes that take place in the hippocampus (Reul, 2014; Thomas & Huganir, 2004). Therefore, the study of the profile of MAPKs activity, named ERK1/2, JNK and p38^{MAPK}, during the postnatal development in the hippocampus is important, since disruption in signaling pathways during a critical period of development, may play a role in some psychiatric illnesses in adulthood (Hayashi & Takagi, 2015; Yufune et al, 2015).

In the present study we analyzed, by western blotting, changes of the phosphorylation and total levels of MAPKs (p38^{MAPK}, ERK 1/2 and JNK p54/p46) in the rat hippocampus throughout the postnatal period P1-60. Interestingly, as summarized in Fig. 4, the temporal patterns of postnatal changes in MAPKs were quite different during P1 to P10 period that is recognized as a rapid brain growth in the rat, also known as the brain growth spurt (Davison, 1968).

The c-Jun N-terminal kinases (JNK 1/2/3) are strongly expressed in the nervous system and play crucial roles in neural development, neuronal migration, polarity, as well as learning and memory (Haeusgen et al, 2009). Mammalian JNKs are encoded by three distinct genes (*jnk1*, *jnk2*, and *jnk3*), giving rise to at least 10 different splice variants (isoforms). All variants share an epitope that needs to be dually phosphorylated for JNK activation (phospho-JNK). In the mouse hippocampus, JNK1 is mainly expressed as a 46 kDa band, while JNK2 is mainly expressed as a 54 kDa band. JNK3 is expressed as both isoforms: 46 and 54 kDa (Brecht et al, 2005). JNK isoforms exhibit various differences concerning the response to stimulus, specificity toward substrates and regulation by upstream kinases (Brecht et al, 2005; Waetzig et al, 2005; Zhao & Herdegen, 2009). Initial studies indicated compensatory roles for JNK1 and JNK2 in neuronal survival and apoptosis during early brain development (Kuan et al, 1999; Sabapathy et al, 1999). However, other studies demonstrated that *jnk2* and/or *jnk3* knockout mice have no obvious brain defects, while *jnk1*-deficient mice displayed abnormality in the anterior commissure formation, in the axonal microtubule integrity (Chang et al, 2003) and in the dendritic architecture (Bjorkblom et al, 2005). Therefore, it has been suggested that JNK1 is

constitutively active in the normal brain, since it is required for the phosphorylation of MAP2 and to maintain the cytoskeletal integrity, neuronal migration, axonal-dendritic architecture as well as synaptic function during brain development (Coffey, 2014). Moreover, it was demonstrated that JNKp46 activity in the first postnatal week (P4) may be involved in neurite growth (Rice & Barone, 2000). In our study, phosphorylation and total content of JNKp46 showed no changes during postnatal development of the rat hippocampus. However, the immunocontent of JNKp54 displayed an age-dependent increase from P4 to P60 (Figure 1). The increment in the total level of JNKp54 was accompanied by a parallel increase in phosphorylation as the JNKp54. Noteworthy, JNK actions take place during specific development stages and an “apoptotic” role for JNK1 and JNK2 has been suggested for postnatal brain development in rodents (Kuan et al, 1999). Hence, the increase in the levels of JNKp54 (at P4 and P10) might be involved in the physiological occurrence of cell death in the early postnatal period in rats, and accompanying the p38^{MAPK} activation in this period (Figure 3).

Extracellular signal regulated kinases (ERKs) are important components of the Ras-Raf-MEK signaling pathway that mediate the transduction of intracellular stimuli and gene expression. ERK1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa) share 84% sequence identity and are homologous subtypes of the ERK family, which participates in the regulation of a variety of cell activities, including cell proliferation, migration and differentiation (Cheng et al, 2013). The phosphorylation of both ERK isoforms, ERK1 and ERK2, in the rat hippocampus during postnatal development (P1-60) was steadily increased with increasing of age. ERK1 phosphorylation was low at P1, and increased significantly from

P4 to P60. However, ERK2 phosphorylation was stable from P1 to P10, and increased from P14 to P60. Moreover, it is interesting to note that in contrast with ERK1 the phosphorylation of ERK2 in the hippocampus was markedly higher in the early phase of postnatal development (P1-14). ERK 1/2 are the central elements of a prominent signaling pathway intensively studied in neural development (Samuels et al, 2009). Although ERK1 and ERK2 are expressed throughout the brain, genetic inactivation of ERK1 has only subtle phenotypic effects, whereas ERK2 inactivation results in early embryonic lethality (Aouadi et al, 2006). Studies demonstrated that mutations affecting ERK signaling are a significant genetic cause of neurodevelopment disorders in humans (Pucilowska et al, 2012). Previous studies reported dysfunction of progenitor generation and proliferation deficits when ERK2 was inactivated, suggesting that ERK2 is required for neural cell fate determination (Samuels et al, 2008). The role of ERK2 in neural development was studied by conditional deletion of ERK2 and there was a decreased proliferation of neural progenitors cells resulting in a reduced number of astroglial cells (Imamura et al, 2010; Imamura et al, 2008). Significantly, ERK1 is incapable of compensating for ERK2 function in *erk2*^{-/-} mice, suggesting that the observed effect is ERK2 specific and cannot be rescued by ERK1 (Krens et al, 2006). Our study detected an initial increase of the ERK1 at P4, which is temporally correlated with the critical period for cell proliferation (Rice & Barone, 2000). In contrast ERK2 phosphorylation was stable and relatively higher than ERK1 from P1-14, subsequently displaying an increment only after P14 a developmental window of intense synaptogenesis. These results reinforce the notion that although ERK1 and ERK2 isoforms share an apparently

identical pattern for translocation to the nucleus upon stimulation and phosphorylate common substrates; their 17% divergence in amino acid sequence leads to differences in functional specificity and spatio-temporal activation pattern.

p38^{MAPK} activation displayed a bimodal regulation during postnatal development with a first increment at P4, returning to the initial levels at P7, then followed by a second increase at P10. In the rat hippocampus the peaks of p38^{MAPK} phosphorylation at P4 and P10 occur in parallel with periods of brain growth in which programmed cell death process take place (Kim et al, 2009; Rice & Barone, 2000). Proper development of the central nervous system requires apoptosis that systematically removes large number of neurons in some structures in which the cells were produced in excess during development (Kim & Sun, 2011). Therefore, apoptosis occurs during pre- and postnatal development of the CNS in two waves. The first wave occurs in proliferative zones; the second occurs in post-mitotic cells that display both neuronal and glial phenotype (Nikolic et al, 2013; Rice & Barone, 2000). The most prominent programmed cell death occurs during postnatal synaptogenesis of post-mitotic neurons (Kim et al, 2009). Programmed cell death for the rodent neocortex peaks between around P4 and P7, reducing neuronal numbers by approximately 20-30% and this occurs concurrently with the peak synaptogenesis period from P0-14 (Gohlke et al, 2004). Apoptosis occurs physiologically in humans in the start of the 3rd trimester of gestation and ends by the third year of life, while in rodents this occurs during the first two weeks of postnatal life, a period of intense neurogenesis and synaptogenesis (Dekkers & Barde, 2013; Ikonomidou, 2009). It is therefore possible that the activation profile of p38^{MAPK}

pathway observed in our study might be involved this physiological occurrence of cell death in the early postnatal period in rats.

Taken together, our approach permitted the detection of relative small biochemical changes in the level of protein phosphorylation and protein content in the hippocampus in specific periods of the postnatal development. However, it was not characterized the hippocampal subregion or cell type (like neurons or astrocytes) where the changes in the MAPK activity have occurred. Therefore, future studies applying other approaches, such as immunohistochemistry, confocal microscopy might be useful to determine these features. Moreover, our results will support future studies regarding the physiological role of the observed changes in MAPK activity. Since knowing the developmental profile of each enzyme activity it will be possible to produce a transient inhibition, in a specific period, for later morphological and behavioral evaluation (ex. adulthood period).

Conclusion

The present study discloses a dynamic and transient regulation of the activation of p38^{MAPK} and ERK 1/2 during postnatal development of rat hippocampus (P1-60). It suggests a temporal correlation of p38^{MAPK} activation with critical periods for programmed cell death and synaptogenesis during specific periods of postnatal development. These observations have important implications since subtle alterations of kinase activity by environment or genetic factors in specific periods early in life might lead to malformed or misconnected neuronal assembly associated with lifelong deleterious outcomes. Birth dating of many neurological or psychiatric disorders reveals that they are induced by

insults in uterus or during early postnatal periods (P7-14). Determining how these developmental sequences are generated and altered by insults is therefore a challenge that involves a greater comprehension of the profile of these signaling pathways during neurodevelopment.

Acknowledgements: The authors wish to thank Professor Peter Dunkley for critical review of the manuscript and helpful suggestions. This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Brazil (#308459/2013-0); National Coordination for the Training and Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; #249/14); Santa Catarina State Research Foundation (FAPESC/PRONEX Program – NENASC project; #1262/2012-9), INCT-National Institute of Science and Technology; Santa Catarina Program for the Training for Special Education (PROESP/CAPES; #1509/2009). RW and RBL are recipient of Research Scholarship from CNPq. APC received a fellowship from CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil. The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of Interest statement: The authors declare that they have no conflict of interest.

Legend of figures

Figure 1. Western Blot analysis of phosphorylation and content of JNK p54/p46 during postnatal development of the rat hippocampus.

The panel A shows a representative blot of hippocampus immunoreactivity of the phospho-JNK p54/p46, total-JNK p54/p46 and anti- β -actin (used as load control) of rats at postnatal days (P) 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 and 60. The panel B shows the hippocampus quantification of phospho-JNKp54 and panel D the quantification of phospho-JNKp46. The phosphorylation level of each protein was determined by computer-assisted densitometry as a ratio of the O.D. of the phosphorylated band over the O.D. of the total band. The panel C and E show, respectively, the total content of JNKp54 and JNKp46, which was determined by computer-assisted densitometry as a ratio of the O.D. of the total- JNKp54 (C) or total- JNKp46 (E) band over the O.D. of the total band of β -actin. All data are expressed as percentage of P1 (set as 100%). The values are presented as mean \pm S.E.M. derived from 7 independent experiments. * $p < 0.05$ when compared to P1 level.

Figure 2. Western Blot analysis of phosphorylation and content of ERK 1/2 during postnatal development of the rat hippocampus.

The panel A shows a representative blot of hippocampus immunoreactivity of the phospho-ERK 1/2, total-ERK 1/2 and anti- β -actin (used as load control) of rats at postnatal days (P) 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 and 60. The panel B shows the hippocampus quantification of phospho-ERK1 and panel D the quantification of phospho-ERK2. The phosphorylation level of each protein was determined by computer-assisted densitometry as a

ratio of the O.D. of the phosphorylated band over the O.D. of the total band. The panel C and E show, respectively, the total content of ERK1 and ERK2, which was determined by computer-assisted densitometry as a ratio of the O.D. of the total-ERK1 (C) or total-ERK2 (E) band over the O.D. of the total band of β -actin. All data are expressed as percentage of P1 (set as 100%). The values are presented as mean \pm S.E.M. derived from 7 independent experiments. * $p < 0.05$ when compared to P1 level.

Figure 3. Western Blot analysis of phosphorylation and content of p38^{MAPK} during postnatal development of the rat hippocampus. The panel A shows a representative blot of hippocampus immunoreactivity of the phospho-p38^{MAPK}, total-p38^{MAPK} and anti- β -actin (used as load control) of rats at postnatal days (P) 1, 4, 7, 10, 14, 21, 30 and 60. The panel B shows the hippocampus quantification of phospho-p38^{MAPK}. The phosphorylation level of each protein in was determined by computer-assisted densitometry as a ratio of the O.D. of the phosphorylated band over the O.D. of the total band of p38^{MAPK}. The panel C shows the total content of p38^{MAPK}, which was determined by computer-assisted densitometry as a ratio of the O.D. of the total-p38^{MAPK} band over the O.D. of the total band of β -actin. All data are expressed as percentage of P1 (set as 100%). The values are presented as mean \pm S.E.M. derived from 7 independent experiments. * $p < 0.05$ when compared to P1 level and # $p < 0.05$ when compared to P7 level.

Figure 4. Schematic profile of MAPKs activation and content during postnatal development of rat hippocampus. The curves were drawn in order to directly compare the data plotted in Fig.1 for JNK p54/p46, Fig.

2 for ERK 1/2, and Fig. 3 for p38^{MAPK}. The panel A demonstrates the curve of phosphorylation of MAPKs and panel B shows the immunocontent of MAPKs during postnatal development of rat hippocampus considering from P1-60. Filled circles are used to indicate the time points statistically different when compared to P1 level ($p < 0.05$).

References

Adams F (1939) The Genuine works of Hippocrates. Baltimore: Williams and Wilkins

Aguiar AS, Jr., Araujo AL, da-Cunha TR, Speck AE, Ignacio ZM, De-Mello N, Prediger RD (2009) Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain Res Bull* 79: 452-457

Alleva E, Bignami G (1986) Prenatal benzodiazepine effects in mice: postnatal behavioral development, response to drug challenges, and adult discrimination learning. *Neurotoxicology* 7: 303-317

Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *The Journal of comparative neurology* 136: 269-293

Altman J, Bayer SA (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *The Journal of comparative neurology* 301: 365-381

Anda RF, Felitti VJ, Bremner JD, Walker JD, Whitfield C, Perry BD, Dube SR, Giles WH (2006) The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 256: 174-186

Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F (2006) Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 88: 1091-1098

Assini FL, Duzzioni M, Takahashi RN (2009) Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav Brain Res* 204: 206-211

Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 14108-14113

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB (2005) A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology* 65: 1873-1887

Bayer SA (1980) Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *The Journal of comparative neurology* 190: 115-134

Bayer SA (1983) 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Experimental brain research* 50: 329-340

Bjorkblom B, Ostman N, Hongisto V, Komarovski V, Filen JJ, Nyman TA, Kallunki T, Courtney MJ, Coffey ET (2005) Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *J Neurosci* 25: 6350-6361

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. *Nature neuroscience* 3: 1107-1112

Breasted J (1930) *The Edwin Smith Surgical Papyrus. Chicago, IL: University of Chicago Press*

Brecht S, Kirchhof R, Chromik A, Willeßen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearse D, Kuan CY, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell RA, Davis RJ, Herdegen T (2005) Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *The European journal of neuroscience* 21: 363-377

Bystron I, Blakemore C, Rakic P (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci* 9: 110-122

Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, McGavern DB, Brites D (2015) Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *Journal of neuroinflammation* 12: 82

Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 50-83

Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1193-1205

Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F (2010) The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Progress in neurobiology* 91: 313-348

Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M (2003) JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* 4: 521-533

Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40

Chen Z, Cobb MH (2001) Regulation of stress-responsive mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways by TAO2. *The Journal of biological chemistry* 276: 16070-16075

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101: 2449-2476

Cheng P, Alberts I, Li X (2013) The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 31: 783-789

Clarke GL, Chen J, Nishimune H (2012) Presynaptic Active Zone Density during Development and Synaptic Plasticity. *Frontiers in molecular neuroscience* 5: 12

Coffey ET (2014) Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci* 15: 285-299

Coras R, Siebzehnruhl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, Villmann C, Hahnen E, Neuhuber W, Weigel D, Buchfelder M, Stefan H, Beck H, Steindler DA, Blumcke I (2010) Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory

dysfunction in humans. *Brain : a journal of neurology* 133: 3359-3372

Cordova FM, Aguiar AS, Jr., Peres TV, Lopes MW, Goncalves FM, Pedro DZ, Lopes SC, Pilati C, Prediger RD, Farina M, Erikson KM, Aschner M, Leal RB (2013) Manganese-exposed developing rats display motor deficits and striatal oxidative stress that are reversed by Trolox. *Archives of toxicology* 87: 1231-1244

Cordova FM, Rodrigues AL, Giacomelli MB, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR, Leal RB (2004) Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res* 998: 65-72

Corson LB, Yamanaka Y, Lai KM, Rossant J (2003) Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* 130: 4527-4537

Costa LG, Aschner M, Vitalone A, Syversen T, Soldin OP (2004) Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual review of pharmacology and toxicology* 44: 87-110

Cowan KJ, Storey KB (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* 206: 1107-1115

Cruz AP, Frei F, Graeff FG (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 49: 171-176

Davison AN, Dobbins, J. (1968) *Applied Neurochemistry*. pp 178-221, 253-316. Oxford: Blackwell

Dawson GR, Tricklebank MD (1995) Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends in pharmacological sciences* 16: 33-36

Dekkers MP, Barde YA (2013) Developmental biology. Programmed cell death in neuronal development. *Science* 340: 39-41

Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11: 339-350

Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF (2014) Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular psychiatry* 19: 146-148

Dobbing J, Sands J (1971) Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol Neonate* 19: 363-378

Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3: 79-83

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research* 25: 1439-1451

Giachello CN, Fiumara F, Giacomini C, Corradi A, Milanese C, Ghirardi M, Benfenati F, Montarolo PG (2010) MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. *Journal of cell science* 123: 881-893

Gohlke JM, Griffith WC, Faustman EM (2004) The role of cell death during neocortical neurogenesis and

synaptogenesis: implications from a computational model for the rat and mouse. *Brain research Developmental brain research* 151: 43-54

Grandjean P, Landrigan PJ (2014) Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The Lancet Neurology* 13: 330-338

Guan L, Jia N, Zhao X, Zhang X, Tang G, Yang L, Sun H, Wang D, Su Q, Song Q, Cai D, Cai Q, Li H, Zhu Z (2013) The involvement of ERK/CREB/Bcl-2 in depression-like behavior in prenatally stressed offspring rats. *Brain research bulletin* 99: 1-8

Haeusgen W, Boehm R, Zhao Y, Herdegen T, Waetzig V (2009) Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain. *Neuroscience* 161: 951-959

Harris KM, Weinberg RJ (2012) Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4

Hayashi H, Takagi N (2015) Endogenous Neuroprotective Molecules and Their Mechanisms in the Central Nervous System. *Biological & pharmaceutical bulletin* 38: 1104-1108

Hayashi K, Kubo K, Kitazawa A, Nakajima K (2015) Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Frontiers in neuroscience* 9: 135

Hu BR, Park M, Martone ME, Fischer WH, Ellisman MH, Zivin JA (1998) Assembly of proteins to postsynaptic densities after transient cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18: 625-633

Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004) MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117: 4619-4628

Hyde RA, Strowbridge BW (2012) Mnemonic representations of transient stimuli and temporal sequences in the rodent hippocampus in vitro. *Nature neuroscience* 15: 1430-1438

Ikonomidou C (2009) Triggers of apoptosis in the immature brain. *Brain Dev* 31: 488-492

Imamura O, Pages G, Pouyssegur J, Endo S, Takishima K (2010) ERK1 and ERK2 are required for radial glial maintenance and cortical lamination. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 15: 1072-1088

Imamura O, Satoh Y, Endo S, Takishima K (2008) Analysis of extracellular signal-regulated kinase 2 function in neural stem/progenitor cells via nervous system-specific gene disruption. *Stem cells* 26: 3247-3256

Innocenti GM, Price DJ (2005) Exuberance in the development of cortical networks. *Nature reviews Neuroscience* 6: 955-965

Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R (2014) Role of ERK1/2 MAPK signaling in the maintenance of myelin and axonal integrity in the adult CNS. *J Neurosci* 34: 16031-16045

Jansen A, Andermann E (2005) Genetics of the polymicrogyria syndromes. *J Med Genet* 42: 369-378

Jeanneteau F, Deinhardt K, Miyoshi G, Bennett AM, Chao MV (2010) The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates

BDNF-induced axon branching. *Nature neuroscience* 13: 1373-1379

Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912

Jovanovic JN, Sihra TS, Nairn AC, Hemmings HC, Jr., Greengard P, Czernik AJ (2001) Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca²⁺-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 7944-7953

Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 396-405

Kim WR, Park OH, Choi S, Choi SY, Park SK, Lee KJ, Rhyu IJ, Kim H, Lee YK, Kim HT, Oppenheim RW, Sun W (2009) The maintenance of specific aspects of neuronal function and behavior is dependent on programmed cell death of adult-generated neurons in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 29: 1408-1421

Kim WR, Sun W (2011) Programmed cell death during postnatal development of the rodent nervous system. *Development, growth & differentiation* 53: 225-235

Koehl M (2015) Gene-environment interaction in programming hippocampal plasticity: focus on adult neurogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience* 8: 41

Kolb B, Gibb R (2011) Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *Journal of the Canadian Academy of Child*

and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Academie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent 20: 265-276

Kolb B, Mychasiuk R, Williams P, Gibb R (2011) Brain plasticity and recovery from early cortical injury. *Developmental medicine and child neurology* 53 Suppl 4: 4-8

Koros E, Rosenbrock H, Birk G, Weiss C, Sams-Dodd F (2007) The selective mGlu5 receptor antagonist MTEP, similar to NMDA receptor antagonists, induces social isolation in rats. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32: 562-576

Kotagiri P, Chance SA, Szele FG, Esiri MM (2014) Subventricular zone cytoarchitecture changes in autism. *Developmental neurobiology* 74: 25-41

Krens SF, Spaink HP, Snaar-Jagalska BE (2006) Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett* 580: 4984-4990

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22: 667-676

Kyriakis JM, Avruch J (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *The Journal of biological chemistry* 271: 24313-24316

Leal RB, Cordova FM, Herd L, Bobrovskaya L, Dunkley PR (2002) Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol* 178: 44-51

Leal RB, Posser T, Rigon AP, Oliveira CS, Goncalves CA, Gelain DP, Dunkley PR (2007) Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology* 234: 34-43

Lenroot RK, Giedd JN (2006) Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 30: 718-729

Li X, Newbern JM, Wu Y, Morgan-Smith M, Zhong J, Charron J, Snider WD (2012) MEK Is a Key Regulator of Gliogenesis in the Developing Brain. *Neuron* 75: 1035-1050

Lopes MW, Soares FM, de Mello N, Nunes JC, Cajado AG, de Brito D, de Cordova FM, da Cunha RM, Walz R, Leal RB (2013) Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. *Exp Brain Res* 226: 153-163

Lopes MW, Soares FM, de Mello N, Nunes JC, de Cordova FM, Walz R, Leal RB (2012) Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Res* 37: 1868-1878

Macri S, Biamonte F, Romano E, Marino R, Keller F, Laviola G (2010) Perseverative responding and neuroanatomical alterations in adult heterozygous reeler mice are mitigated by neonatal estrogen administration. *Psychoneuroendocrinology* 35: 1374-1387

Matheus FC, Rial D, Real JI, Lemos C, Takahashi RN, Bertoglio LJ, Cunha RA, Prediger RD (2015) Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. *Molecular neurobiology*

Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrengruber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34: 807-820

Murai T, Okuda S, Tanaka T, Ohta H (2007) Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiol Behav* 90: 116-124

Nasuti C, Fattoretti P, Carloni M, Fedeli D, Ubaldi M, Ciccocioppo R, Gabbianelli R (2014) Neonatal exposure to permethrin pesticide causes lifelong fear and spatial learning deficits and alters hippocampal morphology of synapses. *Journal of neurodevelopmental disorders* 6: 7

Nikolic M, Gardner HA, Tucker KL (2013) Postnatal neuronal apoptosis in the cerebral cortex: physiological and pathophysiological mechanisms. *Neuroscience* 254: 369-378

O'Brien DE, Alter BJ, Satomoto M, Morgan CD, Davidson S, Vogt SK, Norman ME, Gereau GB, Demaro JA, 3rd, Landreth GE, Golden JP, Gereau RWt (2015) ERK2 Alone Drives Inflammatory Pain But Cooperates with ERK1 in Sensory Neuron Survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 9491-9507

Obiorah M, McCandlish E, Buckley B, DiCicco-Bloom E (2015) Hippocampal developmental vulnerability to methylmercury extends into prepubescence. *Front Neurosci* 9: 150

Oliveira CS, Rigon AP, Leal RB, Rossi FM (2008) The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26: 355-362

Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auburger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286: 1374-1377

Peres TV, Eyng H, Lopes SC, Colle D, Goncalves FM, Venske DK, Lopes MW, Ben J, Bornhorst J, Schwerdtle T, Aschner M, Farina M, Prediger RD, Leal RB (2015) Developmental exposure to manganese induces lasting motor and cognitive impairment in rats. *Neurotoxicology* 50: 28-37

Perlini LE, Botti F, Fornasiero EF, Giannandrea M, Bonanomi D, Amendola M, Naldini L, Benfenati F, Valtorta F (2011) Effects of phosphorylation and neuronal activity on the control of synapse formation by synapsin I. *Journal of cell science* 124: 3643-3653

Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346-356

Prediger RD, Fernandes MS, Rial D, Wopereis S, Pereira VS, Bosse TS, Da Silva CB, Carradore RS, Machado MS, Cechinel-Filho V, Costa-Campos L (2008) Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *Journal of ethnopharmacology* 120: 465-473

Price KA, Varghese M, Sowa A, Yuk F, Brautigam H, Ehrlich ME, Dickstein DL (2014) Altered synaptic structure in the hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease with soluble amyloid-beta oligomers and no plaque pathology. *Molecular neurodegeneration* 9: 41

Pucilowska J, Puzerey PA, Karlo JC, Galan RF, Landreth GE (2012) Disrupted ERK signaling during cortical development leads to abnormal progenitor proliferation, neuronal and network excitability and behavior, modeling human neuro-cardio-facial-cutaneous and related syndromes. *J Neurosci* 32: 8663-8677

Pucilowska J, Vithayathil J, Tavares EJ, Kelly C, Karlo JC, Landreth GE (2015) The 16p11.2 deletion mouse model of autism exhibits altered cortical progenitor proliferation and brain cytoarchitecture linked to the ERK MAPK pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 3190-3200

Qu C, Li W, Shao Q, Dwyer T, Huang H, Yang T, Liu G (2013) c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) is required for coordination of netrin signaling in axon guidance. *The Journal of biological chemistry* 288: 1883-1895

Reiss AL, Abrams MT, Singer HS, Ross JL, Denckla MB (1996) Brain development, gender and IQ in children. A

volumetric imaging study. *Brain : a journal of neurology* 119 (Pt 5): 1763-1774

Reul JM (2014) Making memories of stressful events: a journey along epigenetic, gene transcription, and signaling pathways. *Frontiers in psychiatry* 5: 5

Rice D, Barone S, Jr. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3: 511-533

Rodricks CL, Gibbs ME, Castillo-Melendez M, Miller SL (2010) The effect of hypoxia on the functional and structural development of the chick brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 28: 343-350

Roth TL, Sweatt JD (2011) Annual Research Review: Epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive periods of development. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 52: 398-408

Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF (1999) Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 89: 115-124

Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R (2011) Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472: 466-470

Samuels IS, Karlo JC, Faruzzi AN, Pickering K, Herrup K, Sweatt JD, Saitta SC, Landreth GE (2008) Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 6983-6995

Samuels IS, Saitta SC, Landreth GE (2009) MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process. *Neuron* 61: 160-167

Satoh Y, Endo S, Nakata T, Kobayashi Y, Yamada K, Ikeda T, Takeuchi A, Hiramoto T, Watanabe Y, Kazama T (2011a) ERK2 contributes to the control of social behaviors in mice. *J Neurosci* 31: 11953-11967

Satoh Y, Kobayashi Y, Takeuchi A, Pages G, Pouyssegur J, Kazama T (2011b) Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS causes cortical abnormalities and neonatal lethality: Erk1 deficiency enhances the impairment of neurogenesis in Erk2-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 1149-1155

Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 182: 311-322

Schwarzbold ML, Rial D, De Bem T, Machado DG, Cunha MP, dos Santos AA, dos Santos DB, Figueiredo CP, Farina M, Goldfeder EM, Rodrigues AL, Prediger RD, Walz R (2010) Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *J Neurotrauma* 27: 1883-1893

Spennath MA, Clarke ME, Kutcher S (2011) The science of brain and biological development: implications for mental health research, practice and policy. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry = Journal de l'Académie canadienne de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent* 20: 298-304

Stiles J, Jernigan TL (2010) The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* 20: 327-348

Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current opinion in neurobiology* 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 to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7: 1099-1111

Tao-Cheng JH, Gallant PE, Brightman MW, Dosemeci A, Reese TS (2007) Structural changes at synapses after delayed perfusion fixation in different regions of the mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 501: 731-740

Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5: 173-183

Vierci G, Oliveira CS, Perera LR, Bornia N, Leal RB, Rossi FM (2013) Creb is modulated in the mouse superior colliculus in developmental and experimentally-induced models of plasticity. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 31: 46-52

Vithayathil J, Pucilowska J, Goodnough LH, Atit RP, Landreth GE (2015) Dentate Gyrus Development Requires ERK Activity to Maintain Progenitor Population and MAPK Pathway Feedback Regulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35: 6836-6848

Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK (2005) c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* 50: 235-246

Waetzig V, Herdegen T (2004) Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neuroscience letters* 361: 64-67

Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T (2006) The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol* 80: 84-97

Watson RE, Desesso JM, Hurtt ME, Cappon GD (2006) Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 77: 471-484

Wefers B, Hitz C, Holter SM, Trumbach D, Hansen J, Weber P, Putz B, Deussing JM, de Angelis MH, Roenneberg T, Zheng F, Alzheimer C, Silva A, Wurst W, Kuhn R (2012) MAPK signaling determines anxiety in the juvenile mouse brain but depression-like behavior in adults. *PLoS one* 7: e35035

Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S (2006) Inhibition of neurogenesis interferes with

hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16: 296-304

World Health Organization W (2012) Child and adolescent mental health policies and plans. *Geneva: World Health Organization*

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331

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 research* 1085: 68-76

Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2005) Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 135: 815-827

Yu Q, Teixeira CM, Mahadevia D, Huang Y, Balsam D, Mann JJ, Gingrich JA, Ansorge MS (2014) Dopamine and serotonin signaling during two sensitive developmental periods differentially impact adult aggressive and affective behaviors in mice. *Molecular psychiatry* 19: 688-698

Yufune S, Satoh Y, Takamatsu I, Ohta H, Kobayashi Y, Takaenoki Y, Pages G, Pouyssegur J, Endo S, Kazama T (2015) Transient Blockade of ERK Phosphorylation in the Critical Period Causes Autistic Phenotypes as an Adult in Mice. *Scientific reports* 5: 10252

Zhao Y, Herdegen T (2009) Cerebral ischemia provokes a profound exchange of activated JNK isoforms in brain

mitochondria. *Molecular and cellular neurosciences* 41: 186-195

Zhen X, Du W, Romano AG, Friedman E, Harvey JA (2001) The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in associative learning in rabbits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 5513-5519

Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110: 443-455

Zsarnovszky A, Belcher SM (2004) Spatial, temporal, and cellular distribution of the activated extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in the developing and mature rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 150: 199-209

2. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO

Ana Paula Costa

2012

1. RUSSI, M. A., VANDRESEN FILHO, S., Rieger, D.K., **COSTA, A. P.**, LOPES, M. W., CUNHA, R. M. S., TEIXEIRA, E. H., NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S., TASCIA, C.I., LEAL, R. B. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. *Neurochemical Research*, v.37, p.288 - 297, 2012.

2. BUDNI, J., LOBATO, K.R., BINFARÉ, R.W., FREITAS, A.E., **COSTA, A. P.**, SAAVEDRA, M.D., LEAL, R. B., LOPEZ, M.G., RODRIGUES, A. L. S. Involvement of PI3K, GSK-3 β and PPAR γ in the

antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *Journal of Psychopharmacology*, v.26, p.714 - 723, 2012.

3. NONES, JADER, **COSTA, ANA PAULA**, LEAL, RODRIGO BAINY, GOMES, FLÁVIA CARVALHO ALCANTARA, TRENTIN, ANDRÉA GONÇALVES. The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. *Cell & Tissue Research*, v.350, p.305 - 315, 2012.

2013

4. VIZUETE, ADRIANA FERNANDA, DE SOUZA, DANIELA FRAGA, GUERRA, MARIA CRISTINA, BATASSINI, CRISTIANE, DUTRA, MÁRCIO FERREIRA, BERNARDI, CAREN, **COSTA, ANA PAULA**, GONÇALVES, CARLOS-ALBERTO. Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. *Life Sciences*, v.92, p.923 - 928, 2013.

5. BIASIBETTI, REGINA, TRAMONTINA, ANA CAROLINA, **COSTA, ANA PAULA**, DUTRA, MÁRCIO FERREIRA, QUINCOZES-SANTOS, ANDRÉ, NARDIN, PATRÍCIA, BERNARDI, CAREN LUCIANE, WARTCHOW, KRISTA MINÉIA, LUNARDI, PAULA SANTANA, GONÇALVES, CARLOS-ALBERTO. Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia. *Behavioural Brain Research.*, v.236, p.186 - 193, 2013.

6. MENDES, C., **COSTA, A. P.**, OLIVEIRA, P. R., TAGLIARI, M.P., SILVA, M. A. S. Physicochemical and microbiological stability studies of extemporaneous antihypertensive pediatric suspensions for hospital use. *Pharmaceutical Development and Technology*, v.18, p.813 - 820, 2013.

7. GONÇALVES, FILIPE MARQUES, FREITAS, ANDIARA ESPÍNDOLA, PERES, TANARA VIEIRA, RIEGER, DÉBORA KURRLE, BEN, JULIANA, MAESTRI, MARIANA, **COSTA, ANA PAULA**, TRAMONTINA, ANA CAROLINA, GONÇALVES, CARLOS ALBERTO, RODRIGUES, ANA LÚCIA SEVERO, NAGANO, CELSO SHINITI, TEIXEIRA, EDSON HOLANDA, NASCIMENTO, KYRIA S., CAVADA, BENILDO SOUSA, LEAL, RODRIGO BAINY. Vatairea macrocarpa Lectin (VML) Induces Depressive-like Behavior and Expression of Neuroinflammatory Markers in Mice. *Neurochemical Research.*, v.38, p.2375 - 2384, 2013.

2014

8. RIEGER, DÉBORA K*., **COSTA, ANA PAULA***, BUDNI, JOSIANE, MORETTI, MORGANA, BARBOSA, SABRINA GIOVANA ROCHA, NASCIMENTO, KYRIA S., TEIXEIRA, EDSON H., CAVADA, BENILDO S., RODRIGUES, ANA LÚCIA S., LEAL, RODRIGO B. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.*, v.122, p.53 - 60, 2014.***autores colaboraram de igual forma para o trabalho.**

9. RIEGER, DÉBORA K., CUNHA, RODRIGO M. S., LOPES, MARK WILLIAM, **COSTA, ANA PAULA**, BUDNI, JOSIANI, RODRIGUES, ANA LÚCIA S., WALZ, ROGER, TEIXEIRA, EDSON H., NASCIMENTO, KYRIA S., CAVADA, BENILDO S., LEAL, RODRIGO B. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. *Journal of Molecular Recognition.*, v.27, p.746 - 754, 2014.

10. BRESSAN, RAUL BARDINI, MELO, FERNANDA ROSENE, ALMEIDA, PATRICIA ALVES DE, BITTENCOURT, DENISE AVANI, VISONI, SILVIA, JEREMIAS, TALITA SILVA, **COSTA, ANA PAULA**, LEAL, RODRIGO BAINY, TRENTIN, ANDREA GONÇALVES. EGF-FGF2 stimulates the proliferation and improves the neuronal commitment of mouse epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSCs). *Experimental Cell Research.*, v.327, p.37 - 47, 2014.

11. MACIEL, ÉRICA SANTOS, BIASIBETTI, REGINA, **COSTA, ANA PAULA**, LUNARDI, PAULA, SCHUNCK, REBECA VARGAS ANTUNES, BECKER, GABRIELA CURBETI, ARBO, MARCELO DUTRA, DALLEGRAVE, ELIANE, GONÇALVES, CARLOS ALBERTO, SALDIVA, PAULO H. NASCIMENTO, GARCIA, SOLANGE CRISTINA, LEAL, RODRIGO BAINY, LEAL, MIRNA BAINY. Subchronic Oral Administration of Benzo[a]pyrene Impairs Motor and Cognitive Behavior and Modulates S100B Levels and MAPKs in Rats. *Neurochemical Research.*, v.39, p.731 - 740, 2014.

2015

12. LOPES, MARK WILLIAM, LOPES, SAMANTHA CRISTIANE, COSTA, ANA PAULA, GONÇALVES, FILIPE MARQUES, RIEGER, DÉBORA KURRLE, PERES, TANARA VIEIRA, EYNG, HELENA, PREDIGER, RUI DANIEL, DIAZ, ALEXANDRE PAIM, NUNES, JEAN COSTA, WALZ, ROGER, LEAL, RODRIGO BAINY. Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochemistry International*, v.87, p.22 - 33, 2015.

13. BERNARDI, CAREN, TRAMONTINA, ANA CAROLINA, NARDIN, PATRÍCIA, BIASIBETTI, REGINA, COSTA,

ANA PAULA, VIZUETI, ADRIANA FERNANDA, BATASSINI, CRISTIANE, TORTORELLI, LUCAS SILVA, WARTCHOW, KRISTA MINÉIA, DUTRA, MÁRCIO FERREIRA, BOBERMIN, LARISSA, SESTERHEIM, PATRÍCIA, QUINCOZES-SANTOS, ANDRÉ, DE SOUZA, JAQUELINE, GONÇALVES, CARLOS ALBERTO. Treadmill Exercise Induces Hippocampal Astroglial Alterations in Rats. *Neural Plasticity (Online)*. Fator de Impacto(2013 JCR): 3,6080, 2013.

14. JUAREZ, ANDREA V., SOSA, LILIANA DEL V., DE PAUL, ANA L., COSTA, ANA PAULA, FARINA, MARCELO, LEAL, RODRIGO B., TORRES, ALICIA I., PONS, PATRICIA. Riboflavin acetate induces apoptosis in squamous carcinoma cells after photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology.*, v.153, p.445 - 454, 2015.