

**CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

CRISTIANE ROSA MAGALHÃES

**MODULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE
ERK E CREB POR GLUTAMATO E ÓXIDO
NÍTRICO NA RETINA DE EMBRIÃO DE
GALINHA**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
FLUMINENSE VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU
DE DOUTOR EM NEUROIMUNOLOGIA

Orientador: Roberto Paes de Carvalho

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Magalhães, Cristiane Rosa

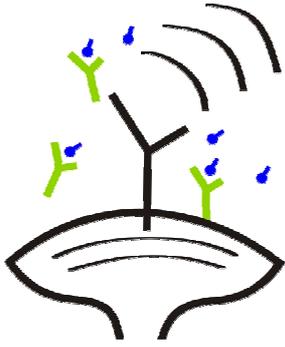
Modulação da fosforilação de erk e creb por glutamato e no na retina embrionária de galinha / Cristiane Rosa Magalhães. Niteroi: UFF, 2008. XIII, 112f.

Orientador: Prof. Roberto Paes de Carvalho

Tese (Doutorado) – UFF/ Programa de Pós-graduação em Neuroimunologia , 2008.

Referências Bibliográficas: 86f.

1. Glutamato . 2. CREB. 3. NO. 4. Retina. I. Paes-de-Carvalho, R. II. Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-graduação Neuroimunologia. III. Título.



**CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

CRISTIANE ROSA MAGALHÃES

**MODULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DE ERK E CREB
POR GLUTAMATO E ÓXIDO NÍTRICO NA RETINA
DE EMBRIÃO DE GALINHA**

Tese submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neuroimunologia

Aprovada por:

Prof. Dr. Marco Antônio Máximo Prado

Profa. Dra. Mariana Souza da Silveira

Profa. Dra. Ana Lúcia Marques Ventura

Profa. Dra. Elizabeth Giestal de Araujo

Prof. Dr. Roberto Paes-de-Carvalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Celular, pertencente ao Departamento de Neurobiologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense sob orientação do Prof. Roberto Paes de Carvalho e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pelo Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Roberto Paes-de-Carvalho, meu orientador, pelo acompanhamento acadêmico em todos os momentos. Admiro muito seu exemplo de serenidade e ao mesmo tempo sagacidade.

À minha família que sempre estimulou e torceu por mim incondicionalmente.

Às minhas irmãs Viviane e Luzeli que acompanharam tudo bem de perto.

Aos companheiros do laboratório (os Karinérgicos também!), dos mais antigos aos mais recentes, aos que passaram pouco tempo por aqui, mas também participaram desta história. Eles sabem a hora certa de erguer o braço em um brinde e também o momento de estendê-lo em auxílio. Contem comigo!

Ao aluno de Mestrado Renato Socodato pela sua colaboração estreita nesta tese.

À prof.^a Elizabeth Giestal de Araújo pela revisão cuidadosa deste trabalho.

Aos professores do curso, em especial a prof.^a Ana Ventura.

Aos colegas dos outros laboratórios.

Ao querido Rafael, com ele divido quase tudo. Dividimos a co-autoria do meu projeto mais importante: Francisco. Te amo muito!

Em fim, agradeço infinitamente a Deus por sua luz sobre nós em todos os dias.

SUMÁRIO

Abreviaturas

Resumo

Abstract

1- Introdução	1
1.1 Retina	1
1.1.1 Estrutura Morfofuncional	1
1.1.2 A retina em desenvolvimento	5
1.1.3 A retina como modelo de estudo	7
1.2 CREB (proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc)	9
1.2.1 CREB integra sinais de diversas vias de sinalização	12
1.2.1.1 A via do AMPc	13
1.2.1.2 O papel do Ca ⁺⁺	14
1.2.1.3 Envolvimento de outras cinases	16
1.3 ERK (cinase ativada por estímulos extracelulares)	17
1.4 NO (Óxido Nítrico)	18
1.4.1 As NOS (Óxido Nítrico Sintases)	19
1.4.2 Características fisicoquímicas e mecanismo de ação	20
1.4.4 NO e CREB	23
1.5 Glutamato	25
1.5.1 Receptores regulados por glutamato	26
1.5.1.1 mGluR	26
1.5.1.2 iGluRs	27
1.5.1.3 GluRs na retina	30

1.5.2 NO e glutamato: enfoque na retina	35
2- OBJETIVOS	37
3- MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1- Materiais	38
3.2-Culturas mistas de neurônios e células gliais:	38
3.3-Incubação com drogas	39
3.3.1 Culturas	39
3.3.2 Retina	40
3.4 Western Blotting	40
3.4.1 Preparo das amostras	40
3.4.2 Incubação da membrana com anticorpos específicos e revelação	41
3.5 Imunocitoquímica	42
3.6 Análise estatística	43
4- RESULTADOS	44
4.1 Cultura	44
4.2 Retina intacta	63
5- DISCUSSÃO	72
5.1 Cultura	72
5.2 Retina intacta	78
6- CONCLUSÕES	83
6.1 Cultura	83
6.2 Retina intacta	84
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do arranjo histológico da retina	4
Figura 2: Desenvolvimento	8
Figura 3: Membros da família de CREB	11
Figura 4: Regulação da atividade de CREB	15
Figura 5: As NOS	20
Figura 6: Mecanismos de ação do NO	25
Figura 7: Estrutura molecular dos receptores ionotrópicos de glutamato	29
Figura 8: Glutamato estimula a fosforilação de ERK e CREB de maneira dependente de dose e tempo.	45
Figura 9: A privação de soro ou o tratamento agudo com glutamato não provoca morte celular nas culturas mistas	47
Figura 10: O estímulo na fosforilação de ERK e CREB por glutamato é via receptores AMPA/Kainato.	48
Figura 11: O efeito do glutamato sobre ERK e CREB requer a produção de NO e a ativação da PKG	50
Figura 12: Cinética de fosforilação de ERK2 e CREB induzida por SNAP	52
Figura 13: SNAP promove a fosforilação de ERK2 e CREB através da via clássica NO/sGC/PKG	53
Figura 14: A fosforilação de CREB induzida por Glutamato e NO é dependente da ativação ERK2.	56
Figura 15: Diversas vias de sinalização estão envolvidas na fosforilação de CREB mediada por NO.	57
Figura 16: Glutamato aumenta a fosforilação da serina 133 de CREB	58

no núcleo das células.

- Figura 17: CREB é fosforilado em células gliais em resposta ao glutamato 60
- Figura 18: A fosforilação de CREB não é dependente da ativação de receptores TRK e nem da liberação vesicular de neurotransmissores 62
- Figura 19: Ontogênese de CREB no tecido retiniano 64
- Figura 20: Glutamato estimula a fosforilação de CREB de maneira dose dependente 67
- Figura 21: NO estimula a fosforilação de CREB e ERK na retina E8 pela via do GMPC 68
- Figura 22: Glutamato estimula a fosforilação de CREB na retina E11 por um mecanismo envolvendo NO 69
- Figura 23: A fosforilação basal de CREB e ERK na retina E14 parece ser modulada pelo receptor NMDA e também através dos receptores tirosina cinase. 71

ABREVIATURAS

AMPA – α - amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AMPA/KaR – receptores AMPA e Kainato
AMPA – receptor AMPA
AMPc – 3' 5' monofosfato de adenosina
ATF-1 – fator ativador de transcrição 1
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
bZIP – zíper de leucina
CAMKII – proteína cinase dependente de cálcio e calmodulina II
CAMKIV - proteína cinase dependente de cálcio e calmodulina IV
CBP – proteína ligante de CREB
CRE - elemento de resposta ao AMPc
CREB – proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc
CREM – modulador do elemento de resposta ao AMPc
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDRF – fator de relaxamento derivado do endotélio
EEAT1 – transportador de aminoácidos excitatórios 1
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
E...- dia embrionário, ex.: E6 sexto dia embrionário
ERK – proteína cinase regulada por sinais extracelulares
FAD – flavina nucleotídeo
FGF2 – fator de crescimento de fibroblastos 2
FMN – flavina mononucleotídeo
GABA – ácido gama aminobutírico
GCs – guanilil ciclase solúvel
GluR – receptor de glutamato
GMPc – 3' 5' monofosfato cíclico de guanosina
Gs – proteína G estimulatória
GSK3 β – glicogênio sintase cinase 3 β
HB₄ - tetrahidrobiopterina
Heme – protoporfirina férrica número 9
ICER – repressor induzível de CREB
iGluR – receptor ionotrópico de glutamato
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
JNK - cinase da região N-terminal de c-jun
KA - kainato
KID – domínio induzível por cinases
L-AP4 - L-2-amino-4-fosfonobutirato
MAPKs – proteínas cinases ativadas por mitógenos
mGluR – receptor metabotrópico de glutamato
MK801 – 5-metil-10,10-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina
MSK – proteína cinase ativada por mitógenos e stress.
NADPH – nicotinamida dinucleotídeo
NFkB – fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$
NMDA – n-metil-d-aspartato
NMDAR – receptor NMDA
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
NO⁻ - ânion nítróido
NO – óxido nítrico

NO· – óxido nítrico
NO⁺ - cátion nitrosônio
NOS – óxido nítrico sintase
O₂⁻ - ânion superóxido
ODQ – 1h-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3,a]quinoxalina-1
OH· – radical hidroxila
ONOO⁻ - peroxinitrito
P300 – proteína com atividade histona acetil transferase intrínseca
P90 – ver RSK
PC12 - células de feocromocitoma
PI3K – cinase dependente de fosfatidilinositol-3
PKA – proteína cinase dependente de AMPc
PKC – proteína cinase C
PKD – proteína cinase D
PKG – proteína cinase dependente de GMPc
PLC – fosfolipase C
PSD95 – proteína de densidade pós-sináptica
PTP μ - fosfo-tirosina fosfatase μ
Q1 – domínio rico em glutamina 1
Q2/CAD – domínio rico em glutamina 2/ domínio constitutivamente ativo
Ras – proteína GTPase monomérica
RSK – cinase ribossomal s6
SIK – cinase induzida por salinidade
SNAP – S-Nitroso-N-acetil-penicilamina
SNC – sistema nervoso central
TGF β – fator de transformação tumoral β
TORC – transdutor da atividade de CREB regulada por coativadores
Trans-ACPD - 1-amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato
Trk – cinase relacionada à tropomiosina

RESUMO

Glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso central (SNC). Suas ações são mediadas pela ativação de receptores metabotrópicos e ionotrópicos (iGluRs). Os iGluRs são amplamente expressos no SNC, inclusive na retina dos vertebrados. Recentemente, a ativação dos iGluRs vem sendo relacionada à ativação da via das ERKs e do fator de transcrição CREB. Na retina de embrião de galinha, a ativação dos iGluRs do tipo NMDA aumenta a produção de óxido nítrico (NO), uma molécula neuroativa muitas vezes envolvida nas ações do glutamato. Neste trabalho estudamos os efeitos do glutamato e do NO na ativação da ERK e da CREB em culturas de retina de embrião de galinha, ou em retinas intactas durante o desenvolvimento embrionário. Ambos glutamato ou o doador de NO SNAP aumentaram o nível de fosforilação da ERK2 e da CREB nas culturas. Tanto a ativação da ERK2 quanto da CREB envolviam a atividade da PKG e da Src cinase. A fosforilação de CREB foi dependente da ativação de ERK, e os efeitos do glutamato foram totalmente dependentes de NO e predominantemente dependentes da ativação dos iGluRs do tipo AMPA/Kainato. Entretanto, a ativação da CREB por glutamato ou NO envolveu também o bloqueio de outras cinases como a PKA, PI3K e CAMK. A imunocitoquímica para fosfo-CREB em culturas estimuladas com glutamato mostrou-se restrita ao núcleo das células gliais. Na retina intacta de 8 dias de desenvolvimento (E8), SNAP induziu a fosforilação da CREB e da ERK2 pela via do GMPc mas a fosforilação da CREB não foi dependente da ativação da ERK. Glutamato estimulou o aumento da fosforilação da CREB de maneira dependente da dose. Foi verificado que a partir de E14 a fosforilação da CREB mostrava-se maior que em retinas mais jovens, e nesta idade a fosforilação da CREB e da ERK pôde ser inibida por drogas antagonistas dos receptores NMDA ou TrK. Os resultados revelam uma complexa rede de interações entre os receptores de glutamato, sistema de produção de NO, diferentes cinases e sistemas de comunicação neurônio-glia.

ABSTRACT

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system. Its actions are mediated by metabotropic or ionotropic receptors (iGluRs). iGluRs are largely expressed in the nervous system, and are present in the vertebrate retina. Recently, the activation of iGluRs has been associated to the activation of ERK pathway and CREB phosphorylation. In the chick embryo retina, the activation of NMDA receptors increases nitric oxide (NO) production, a neuroactive molecule often involved in glutamate actions. In the present work we have studied the effects of glutamate and NO on ERK and CREB phosphorylation in cultures of chick embryo retinal cells, or in the intact retina during development. Glutamate or the NO donor SNAP increased the phosphorylation levels of ERK2 and CREB in the cultures. Both the activation of ERK2 or CREB were dependent on PKG and Src kinase. CREB phosphorylation was dependent on ERK activation, and the glutamate effects were predominantly dependent on the activation of AMPA/Kainate iGluRs and NO production.. However, CREB activation was also dependent of different kinases such as PKA, PI3K and CAMK. We also showed that glutamate-induced CREB phosphorylation was restricted to the nuclei of glial cells in the cultures. In the 8-day-old (E8) chick embryo intact retina, NO induced the phosphorylation of ERK and CREB through the cGMP pathway but the phosphorylation of CREB was not dependent on ERK activation. Glutamate increased CREB phosphorylation in a dose-dependent manner. It was also observed that CREB phosphorylation was higher at E14 than in earlier retinas, and at this age CREB and ERK phosphorylation could be inhibited by NMDA or Trk receptor antagonists. The results reveal a complex chain of interactions involving glutamate receptors, NO production system, different kinases and neuronal-glia communication system.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Retina

1.1.1 Estrutura morfofuncional

A retina é um tecido sensorial que converte o estímulo luminoso em sinal elétrico permitindo que essa forma de energia seja interpretada pelo sistema nervoso resultando na percepção visual. Antes de alcançar as estruturas encefálicas superiores, o sinal elétrico é processado na retina por uma rede de conexões laterais ora inibitórias ora excitatórias formadas pelos prolongamentos de interneurônios, fornecendo ao sistema nervoso central um sinal refinado que discrimina contrastes e profundidade, além das cores (Wässle, 2004).

A retina está localizada ao fundo do globo sendo limitada anteriormente pelo humor vítreo, e posteriormente pelo epitélio pigmentado. As células deste epitélio simples estão em contato íntimo com o segmento externo dos fotorreceptores, participando da reciclagem de suas membranas (Young e Bok, 1969) e da troca de metabólitos com a retina como um todo (Kubrusly et al., 2003).

Existem cerca de seis tipos neuronais na retina (Livesey and Cepko, 2001), que se encontram dispostos em camadas, ora compostas de corpos celulares ora de seus respectivos processos, compondo um arranjo histológico bem semelhante ao de outras estruturas do sistema nervoso central. A figura 1 auxiliará a compreensão deste arranjo, cuja descrição vem a seguir. Os fotorreceptores, cones ou bastonetes, são células alongadas que possuem fotorreceptores compostos de uma opsina (proteína transmembrana acoplada à proteína G) acoplada a uma molécula cromófora que absorve a luz. Cones

medeiam a visão fotópica, que permite discriminação de cores através de um sistema de comparação de sinais obtidos em até três tipos de cones determinados pelo espectro de luz absorvido pelo fotorpigmento que possuem (vermelho, verde ou azul). Os bastonetes possuem um fotorpigmento muito sensível capaz de captar um único fóton, porém não discriminam cores, sendo responsáveis pela visão escotópica. O segmento externo dos fotorreceptores possui discos membranosos repletos de fotorpigmentos. É a porção dessas células especializada em captar a luz e que forma a camada fotorreceptora da retina. O segmento interno e o corpo celular dessas células formam a camada nuclear externa.

Na camada plexiforme externa o terminal axonal dos fotorreceptores faz sinapses com a arborização dendrítica de células bipolares e horizontais. Essas últimas, juntamente com as células amácrinas, formam a camada nuclear interna. Em seguida, na camada plexiforme interna encontram-se os terminais axonais das células bipolares, e os dendritos de células amácrinas e ganglionares. Células ganglionares e algumas células amácrinas deslocadas formam a camada de células ganglionares cujos axônios formam a camada de fibras ópticas, que se dirigem à saída da retina (na região denominada ponto cego). Essas fibras então unidas formam o nervo óptico, e se projetam ipso ou contra-lateralmente em estruturas encefálicas iniciando as vias ascendentes do processamento visual.

O tipo de célula glial predominante na retina são as células de Müller (Chang-Ling, 1994). Essas células dispõem-se radialmente atravessando todas as camadas da retina formando suas membranas limitantes, interna e externa, com seus pés terminais. O corpo celular da glia de Müller localiza-se no terço

médio da camada nuclear interna, seu citoplasma se ramifica e estende em processos que envolvem os contatos sinápticos da retina (Newman e Reichenbach, 1996). As interações neurogliais são fundamentais para a fisiologia e homeostase do tecido retiniano, visto que a glia de Müller modula a atividade neuronal da retina (Neuman e Zahs, 1998), participa do “clearance” sináptico através da captação de neurotransmissores (Matsui et al., 1999; Derouiche e Rauen, 1995), e do influxo de K^+ mantendo o equilíbrio eletroquímico (Nilius e Reichenbach, 1988). Mais recentemente foi demonstrado experimentalmente que as células de Müller se comportam como fibras ópticas conduzindo a luz ao longo da retina até os fotorreceptores (Franze et al., 2007), otimizando o processo de formação da imagem visual na retina.

As alterações no potencial de membrana provocadas pela luz em um fotorreceptor ocorrem por causa de oscilações na concentração citoplasmática de GMPc. Esse segundo mensageiro controla a abertura de canais de Na^+ mantendo um potencial de membrana mais positivo no escuro em decorrência de um influxo contínuo deste íon. A luz absorvida pelo cromóforo 11-cis retinal muda sua estrutura para retinal trans-total, causando mudança conformacional na opsina à qual estava ligado, levando à ativação de uma proteína G citoplasmática. Uma vez ativada, a subunidade alfa desta proteína G ativa uma fosfodiesterase específica para o GMPc. Desta forma a luz induz uma hiperpolarização dos fotorreceptores, que neste estado, liberam menos glutamato (Wässle, 2004).

As células bipolares transmitem sinais dos fotorreceptores às células ganglionares, formando a via vertical de transmissão da retina, cujo principal

neurotransmissor empregado é o glutamato. O sinal originado nos fotorreceptores pode ser modulado por sinapses elétricas entre si, e também pela resposta das células horizontais. As células amácrinas por sua vez também influenciam os sinais transmitidos das células bipolares para as células ganglionares através de suas sinapses. Desta forma as células horizontais e amácrinas através de suas conexões formam a via lateral de processamento da imagem na retina (Kolb, 2003).

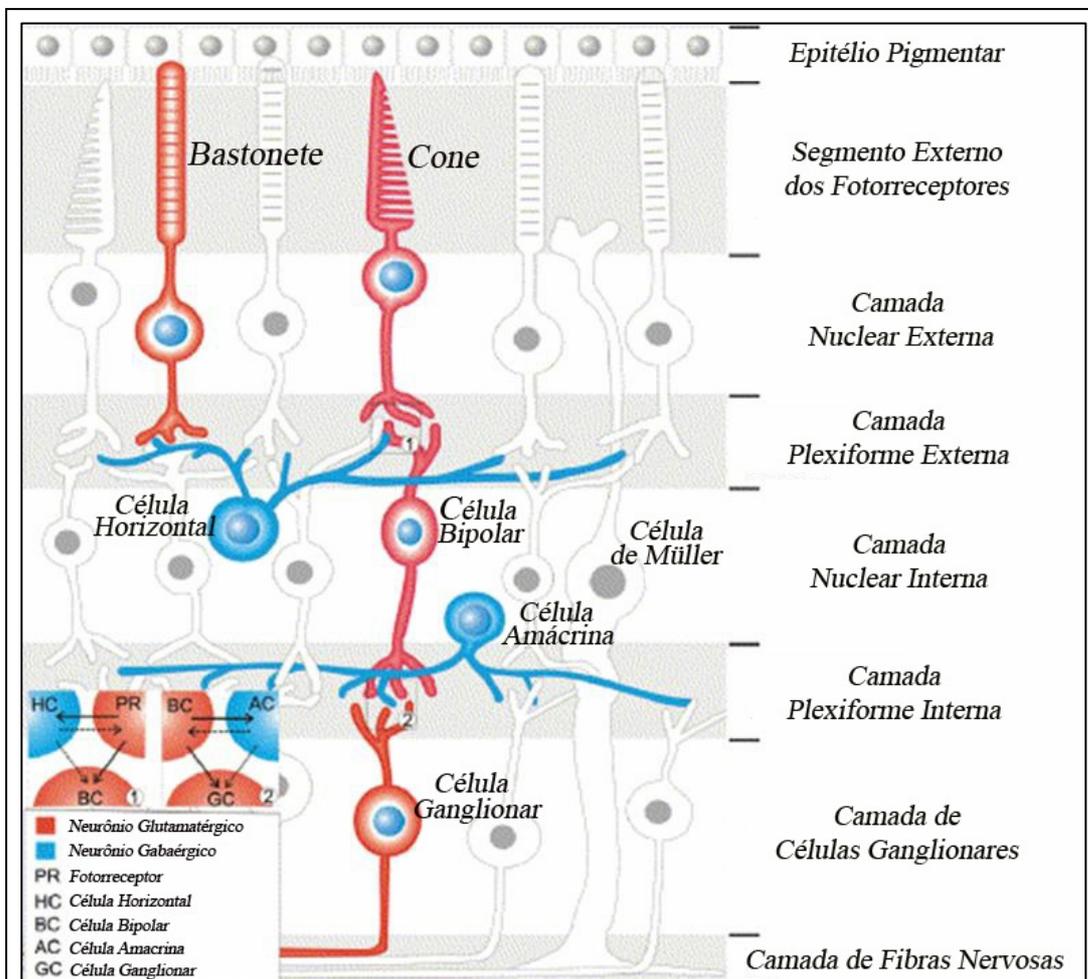


Figura 1: Esquema do arranjo histológico da retina. Mostrando a disposição das células em camadas definidas compostas de corpos celulares ou seus prolongamentos. A via de transmissão vertical está destacada em vermelho mostrando as células que liberam glutamato. A via paralela de processamento está representada em azul pelos neurônios gabaérgicos da retina. (Modificado de Yang, 2004).

1.1.2 A retina em desenvolvimento

Assim como as demais estruturas do sistema nervoso central, a retina é derivada de uma porção do ectoderma que forma o tubo neural. A região posterior do tubo neural se segmenta sob o comando de um repertório de genes morfógenos originando as estruturas precursoras do encéfalo (revisado por Mey e Thanos, 2000). O prosencéfalo então se evagina bilateralmente formando as vesículas ópticas. A vesícula óptica primária se invagina formando a vesícula óptica secundária, precursora do próprio globo ocular, que consiste em uma estrutura com duas camadas celulares. A camada mais externa formará o epitélio pigmentado, e a camada mais interna dispõe-se em epitélio pseudo-estratificado, formado por células-tronco capazes de dar origem a qualquer dos tipos neuronais ou à glia de Müller na retina madura (revisado por Adler, 2000).

Os processos de divisão celular, migração e diferenciação se fazem necessários à arquitetura e fisiologia da retina madura. A proliferação e a diferenciação ocorrem de maneira sobreposta, pois cada tipo celular “nasce” em períodos diferentes. O nascimento de uma determinada célula corresponde ao momento em que esta passa por sua última divisão celular. Se a esta etapa a célula em questão já encontra-se destinada a um determinado fenótipo é algo discutível. Porém é consenso, alcançado através de estudos realizados em diversas espécies, que as primeiras células a saírem do ciclo celular na retina são as células ganglionares, seguidas pelos demais neurônios (Prada et al., 1991, para revisão) (figura 2). A saída do ciclo celular na retina de galinha começa com o nascimento das primeiras células ganglionares, que ocorre entre o 2º e o 3º dia embrionário (E-2/3) (Fujita e Horii, 1963; Kahn, 1974; Prada

et al., 1991), com um gradiente centrífugo, do centro para a periferia, e também da superfície ventricular à vítrea. Desta forma, aos oito dias embrionários, quando a maioria das células já é pós-mitótica, a proliferação é quase restrita ao bordo ciliar da retina, também conhecido como ora serrata, iniciando-se um período de franca diferenciação celular.

A produção de fatores solúveis por células maduras, bem como as interações de superfície, regulam a proliferação dos progenitores retinianos. A exemplo, foi demonstrado que progenitores da retina de roedores em cocultura com células de Müller ou neurônios pós-mitóticos deixam de proliferar via TGF β (Close et al., 2005). As proteínas transmembrana delta e notch que funcionam como receptor e ligante parecem induzir a proliferação e inibir a entrada de precursores em um programa de diferenciação neuronal (Ahmad et al., 1997). Como em demais regiões do sistema nervoso, o papel do cálcio na regulação da proliferação é relevante na retina de galinha (Sugioka e Yamashita, 2003). As oscilações de Ca⁺⁺ provocadas por ativação de receptores muscarínicos e purinérgicos são capazes de modular o tempo da metáfase nas células da zona ventricular na retina embrionária de galinha em E6 (Pearson et al., 2002). Óxido nítrico é capaz de modular negativamente a proliferação celular na retina E8, bem como em células gliais cultivadas juntamente com neurônios da retina de galinha (Magalhães et al., 2006).

Dada essa interposição entre a proliferação e diferenciação na retina, é plausível que muitos dos sinais envolvidos na regulação da proliferação também sejam implicados na diferenciação celular, além dos fatores intrínsecos dos progenitores. A migração celular também é um fenômeno onipresente durante o desenvolvimento da retina e que se estende após a

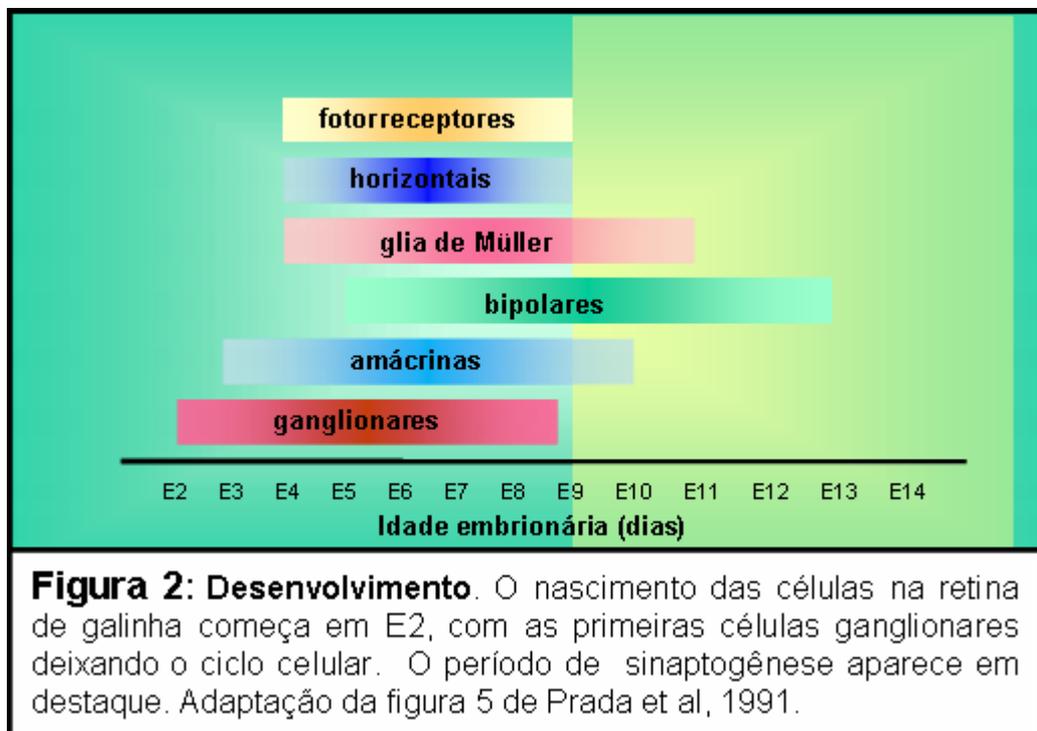
proliferação, visto sua organização em superfície ventricular e vítrea que segrega desde E2 progenitores multipotentes e células pós-mitóticas (Kahn, 1973, Fujita e Horii, 1963). Esse fenômeno é bastante evidente na laminação da retina, além da expansão dos neuritos, necessária á sinaptogênese. Que se inicia precocemente (a partir de E9), e é governada por neurotransmissores já produzidos no tecido retiniano (Wong e Wong, 2001). O glutamato é uma dessas moléculas, que ativa vias intracelulares remodelando rapidamente os neuritos (Wong et al., 2000). As moléculas de adesão presentes na matriz extracelular ou superfície celular, como o receptor fosfo-tirosina fosfatase mu (PTP μ), consistem em verdadeiras pistas para a migração, verdadeiramente esculpindo a retina. Essa molécula de adesão é expressa desde E3, e a perturbação de sua função por diversos modos é capaz de prejudicar a histogênese da retina (Ensslen et al., 2003).

Em uma visão geral, a proliferação, diferenciação e migração celular ocorrem na retina quase simultaneamente e de forma orquestrada resultando em um tecido com camadas fisicamente definidas. Enfim, um “genuíno centro neural”, como diria Ramón y Cajal (Yang, 2004).

1.1.3 A retina como modelo de estudo

A retina de galinha vem sendo amplamente usada por pesquisadores para o estudo de diversos aspectos neuroquímicos e do desenvolvimento do sistema nervoso central (Magalhães et al., 2006; Ferreira e Paes-de-Carvalho, 2001; de Mello, 1978). Compartilhando sua origem embrionária com o cérebro, a retina apresenta um arranjo histológico característico e bem conhecido de camadas alternadas de corpos celulares e prolongamentos, com relativamente

poucos tipos celulares. Além disso, as células da retina podem expressar fenótipos de quase todos os neurotransmissores.



A obtenção de tecido retiniano é possível durante quase todos os estágios embrionários (Coulombre,1955), possibilitando o estudo de diversos aspectos do desenvolvimento do tecido nervoso. A retina é um órgão de fácil dissecação com pouca probabilidade de contaminação por outros tecidos neuronais ou não neuronais, e este processo não provoca danos celulares significativos por hipóxia, pois a retina de pinto tem uma grande capacidade de metabolismo glicolítico (revisto por Lolley,1969).

As células da retina de galinha podem ser mantidas por vários dias em cultura desde estágios precoces do desenvolvimento embrionário. Podem ser produzidas diversas formas de culturas, como por exemplo mistas de neurônios e células gliais (de Mello, 1978), culturas purificadas de células gliais

(Cossenza and Paes-de-Carvalho, 2000), ou purificadas de neurônios e fotorreceptores, em que as células crescem aderidas às placas ou substrato de alta adesividade como poli-L-ornitina (Adler et al., 1984). É possível também cultivar as células da retina de forma que seu arranjo histológico seja preservado, utilizando-se pequenos pedaços de tecido que são os explantes (Zhang et al., 2003; Yamagata and Sanes, 1995). A cultura em agregados é uma outra estratégia para reproduzir uma estrutura laminada, semelhante à do tecido original, em que as células são cultivadas em recipientes apropriados (erlemeyer) em constante rotação (Layer and Willbold, 1993).

Outra grande vantagem do modelo é a possibilidade de se controlar a composição do meio. Nos experimentos com culturas é possível ainda selecionar células, viabilizando o estudo de fenômenos que não seriam possíveis de acessar in vivo. A retina em cultura resgata algumas características do tecido in vivo, como o desenvolvimento de sistemas de neurotransmissores (de Mello et al., 1982), interações neuro-gliais (Cossenza e Paes-de-Carvalho, 2000) e formação de sinapses (Puro et al., 1977), permitindo-nos a caracterização farmacológica destes fenômenos.

1.2 CREB

A regulação da transcrição gênica é essencial para os seres vivos, pois através deste processo uma determinada célula é capaz de expressar o repertório de proteínas adequado a cada momento. A natureza lança mão desta estratégia há milhões de anos, fazendo com que os seres vivos, compostos basicamente pelas mesmas classes de moléculas orgânicas (ex.: fosfolípidios, proteínas e ácidos nucleicos), sejam tão diversos. E também

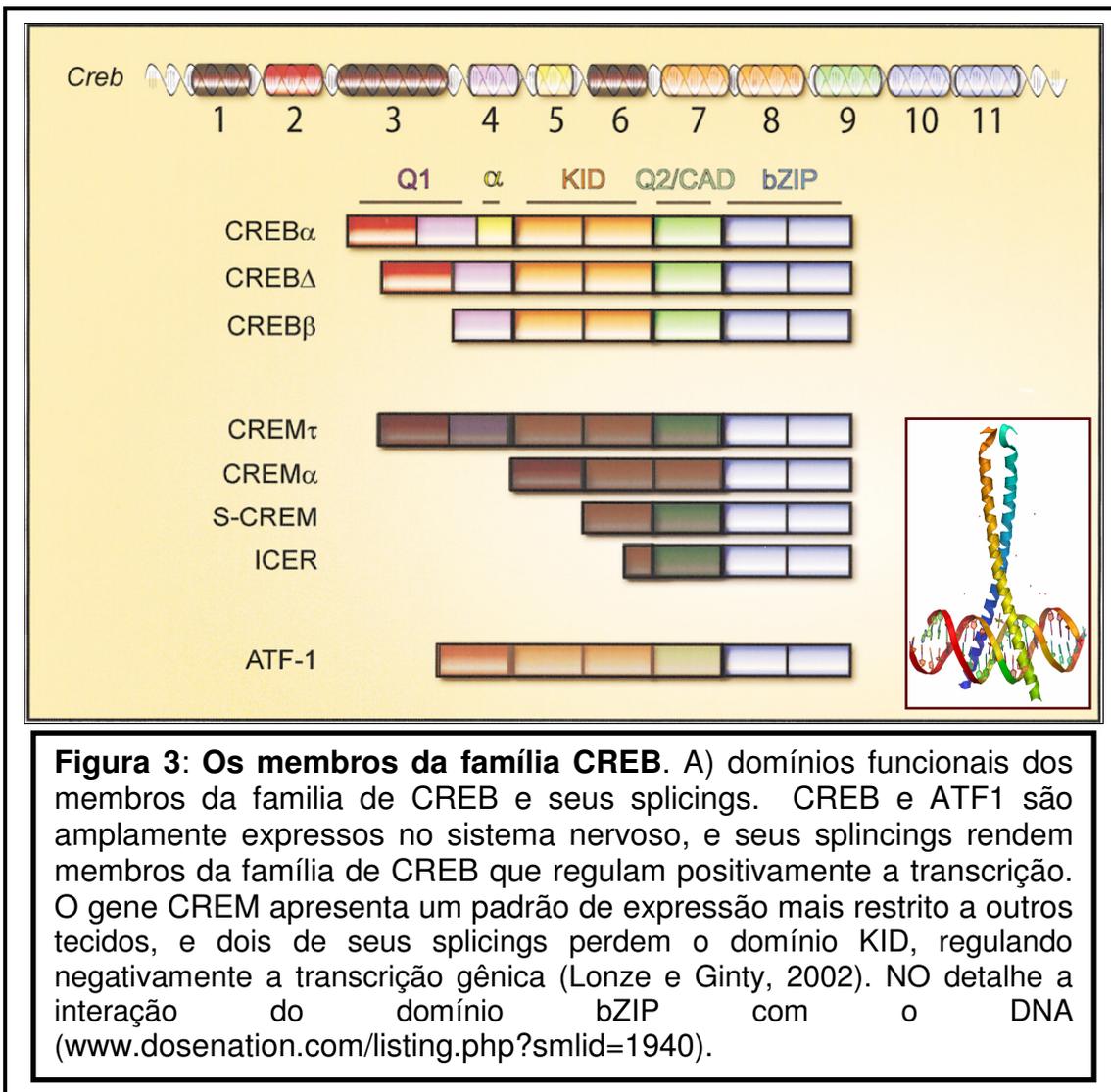
desta forma é possível compreender a diversidade de células em um mesmo organismo multicelular, pois estas têm o mesmo genoma, porém o expressam de forma diferente (Alberts et al., 2002).

Os fatores de transcrição são as proteínas reguladoras do DNA que funcionam como interruptores, ativando ou reprimindo a transcrição de determinados genes. Algumas delas agem como dímeros, reconhecendo seqüências do DNA sem que a dupla fita precise se abrir e então recrutam outras proteínas importantes para a transcrição. O mecanismo de ligação ao DNA e a forma como se dimerizam tem correlação com a estrutura molecular destas proteínas, e através destas características os fatores de transcrição são agrupados em famílias cujos membros podem ainda se enquadrar em subfamílias (Alberts et al., 2002).

A superfamília de fatores de transcrição do tipo bZIP, também chamados de zíper de leucina, formam um “motivo” com esse nome quando se dimerizam. Esse motivo consiste de duas alfa-hélices justapostas que se ligam através das cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos, como em um zíper, e essa região da proteína é rica em leucina. Adjacente a esse domínio de dimerização, em direção à porção carboxiterminal da proteína, encontra-se um domínio de caráter básico rico em Lisina e arginina onde as alfa-hélices se separam, que consiste no domínio de ligação ao DNA (Shaywitz e Greeberg, 1999).

Um dos fatores de transcrição do tipo bZIP mais conhecidos é CREB, que juntamente com CREM e ATF-1, forma a família de fatores de transcrição denominada CREB. Estes fatores de transcrição (CREB, ATF1 e CREM) são produtos de genes diferentes, cujos splicings rendem isoformas capazes de influenciar positiva ou negativamente a transcrição de novos genes. Apesar

disso, esses fatores de transcrição conservam considerável homologia em seus domínios críticos (figura 3).



Os membros da família de CREB se dimerizam através do domínio bZIP que coopera com a região c-terminal para que se liguem a seqüências consenso no DNA denominadas CRE (elemento de resposta ao AMPc), uma seqüência palindrômica compreendendo as bases nitrogenadas TGACGTCA, presente na região promotora dos genes regulados por CREB (revisado por Lonze e Ginty, 2002). Essa seqüência foi inicialmente encontrada no gene da somatostatina, o qual foi induzido por forskolina em células PC12 (Montminy et al., 1986). Posteriormente, foi isolado um peptídeo ligante de CRE com, cerca

de 43 KD que fora fosforilado in vitro quando incubado com a subunidade catalítica ativada da PKA: descobria-se CREB, a proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc (Montminy e Bilezikjian, 1987).

Os domínios ricos em glutamina Q1 e Q2/CAD (domínio constitutivamente ativo) contribuem para a ativação ou para o recrutamento de proteínas da maquinaria de transcrição (revisado por Shaywitz e Greenberg, 1999), e flanqueiam o domínio KID (domínio induzível por cinases). Neste último reside o resíduo 133 de serina, um alvo para a fosforilação por várias cinases, crítico para a ativação de CREB mediada por estímulos extracelulares. Quando a serina 133 é fosforilada, CREB recruta CBP/P300. Ambos são coativadores da transcrição, pois recrutam e estabilizam outros componentes da maquinaria transcricional, além de possuírem atividade histona-acetiltransferase intrínseca (revisado por Mayr e Montminy, 2001; Shaywitz e Greenberg, 1999).

CREB vem sendo intensamente estudado no sistema nervoso pelo fato de ser ativado pela atividade sináptica das células nervosas de diferentes áreas do cérebro. E desta forma, os genes transcritos como resultado da ativação de CREB, já foram relacionados a uma infinidade de condições patológicas ou processos fisiológicos e benéficos ao sistema nervoso (Carlezon et al., 2005).

1.2.1 CREB integra sinais de diversas vias de sinalização:

O resíduo de serina 133 da CREB é um ponto de convergência de diversas cascatas de sinalização iniciadas por neurotransmissores, neurotrofinas e hormônios, se comportando como um efetor comum para estes. A velocidade, intensidade e duração desses estímulos são pontos chave na

elucidação de como cada um deles provoca respostas celulares variadas através da ativação de CREB.

1.2.1.1 A via do AMPc

A proteína cinase dependente de AMPc (PKA) foi a primeira cinase descrita na fosforilação de CREB. Ela é ativada mediante o aumento intracelular de AMPc que se liga à subunidade regulatória da PKA, liberando sua subunidade catalítica que através do mecanismo de fosforilação modula uma infinidade de processos celulares. Muitos ligantes têm a capacidade de ativar as isoformas de adenil ciclase através da proteína Gs, dentre eles estão, dopamina e adenosina. Todavia existem adenil ciclasas ativadas por cálcio (Wang et al., 2003), e assim, receptores acoplados a outras vias de transdução também poderiam ativar a PKA (Impey et al., 1994).

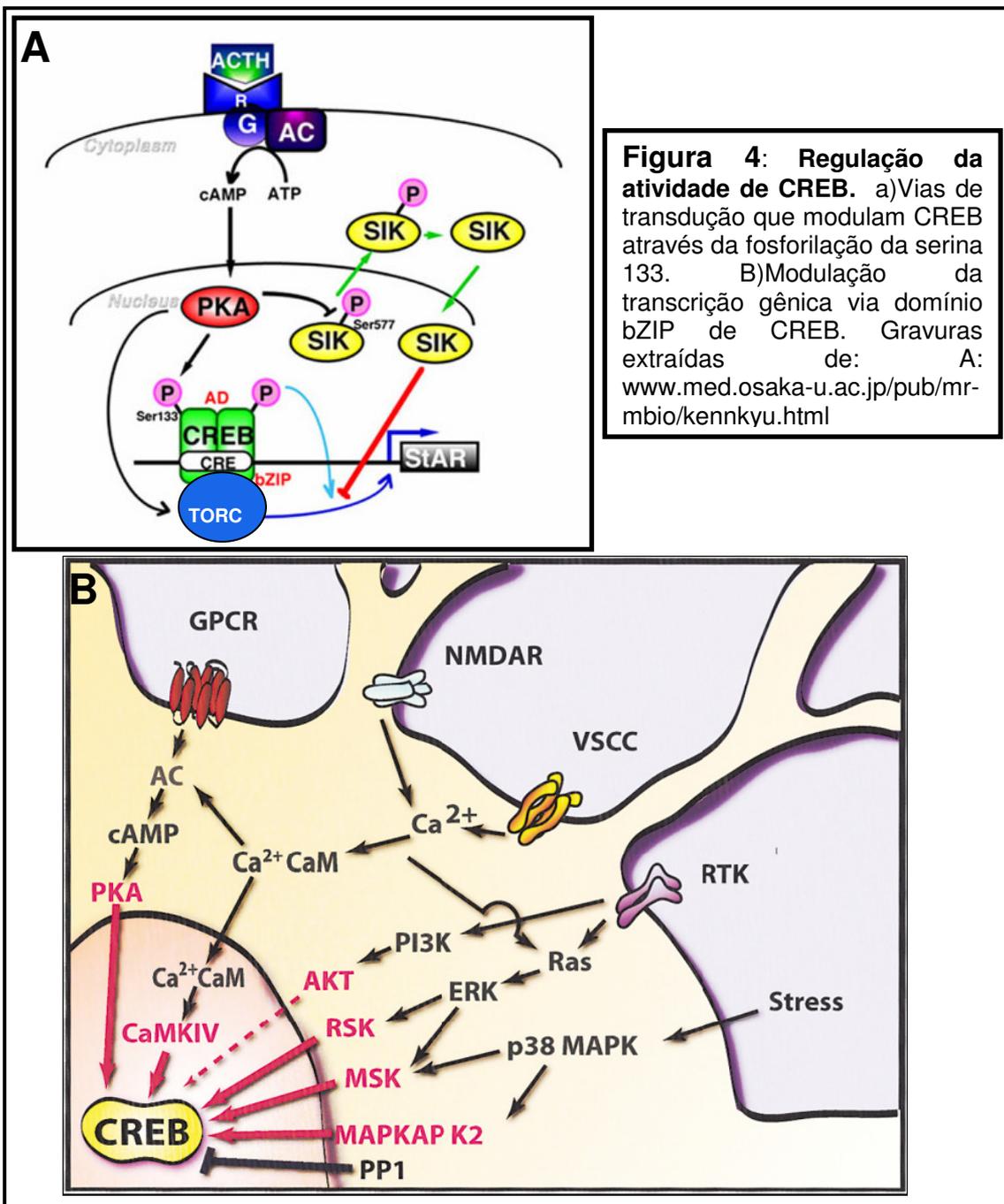
O domínio bZIP de CREB também possui atividade regulatória através da interação com proteínas como a TORC (transdutor dos coativadores reguladores da atividade de CREB). O TORC liga-se à região bZIP por forças iônicas e favorece a atividade de CREB, independente da fosforilação da serina 133. A ligação do TORC é prevenida por sua fosforilação pelas SIKs. A PKA fosforila a SIK que é exportada para o citoplasma (revisado por Takemori et al., 2007). A calcineurina defosforila o TORC, cooperando com a sua ligação à CREB (Kingsbury et al., 2007). Porém, é válido lembrar que a calcineurina ativada pela entrada de Ca^{++} via receptores NMDA extrasinápticos provoca defosforilação de CREB, sendo implicada na morte celular por excitotoxicidade (Lee et al., 2005).

1.2.1.2 O papel do Ca^{++}

O papel do cálcio na modulação de CREB é muito complexo, pois esse segundo mensageiro é capaz de atuar sob vários paradigmas, como já comentado brevemente. As alterações do potencial de membrana no sistema nervoso quase sempre envolvem o influxo de Ca^{++} seja através de receptores ionotrópicos ou via canais de cálcio dependentes de voltagem. Neurotransmissores que se ligam a receptores metabotrópicos participam da mobilização de estoques internos de cálcio. Classicamente o cálcio liga-se à calmodulina e modula a atividade de diversas proteínas, como os membros da família das CAMKs, proteínas serina/treonina cinase dependentes de cálcio e calmodulina. A CAMK II e a CAMK IV fosforilam CREB diretamente, porém a segunda é encontrada no núcleo (Nakamura et al., 1995), e ganha cada vez mais importância neste cenário. Além da serina 133, as serinas 142 e 143 de CREB constituem pontos de regulação pelas CAMKs, pois, dentre outros achados, Kornhauser et al. (2002) reportaram que a fosforilação destes três resíduos de serina ao mesmo tempo impedia a ligação de CREB ao CBP sem prejuízo da transcrição. O CBP, por sua vez quando fosforilado pelas CAMKII ou IV otimizou o processo de transcrição dos genes regulados por CREB (Revisado por Deisseroth e Tsien, 2002).

Em adição às CAMKs, o Ca^{++} advindo de eventos sinápticos pode ativar a cascata da ERK provocando ativação de CREB (Hardingham et al., 2001). Em neurônios hipocâmpais a fosforilação de CREB induzida por receptores AMPA permeáveis a Ca^{++} foi abolida pela inibição da via das ERK, cuja ativação foi dependente de PI3K (Perkinton et al., 1999). A fosforilação da serina 133 de CREB foi estimulada imediatamente pela CAMKIV em culturas

de neurônios do hipocampo, porém a via da ERK simultaneamente ativada promoveu a sustentação deste evento (Wu et al., 2001), mostrando que um único estímulo pode disparar cascatas distintas que culminam em um mesmo efetor, porém com cinéticas diferentes. A figura 4 resume as vias de fosforilação e ativação de CREB, inclusive algumas que ainda serão comentadas.



1.2.1.3 Envolvimento de outras cinases

Os fatores tróficos atuam sobre receptores do tipo tirosina cinase, que classicamente ativam a cascata Ras/Raf/MEK/ERK. A fosforilação de CREB dependente desta cascata pode ser efetuada por duas famílias de cinases, as P90RSK ou as MSK.(revisado por Lonze e Ginty, 2002). Além da via Ras/ERK, neurotrofinas são capazes de disparar paralelamente mais de uma cascata de sinalização que resulte na ativação de CREB (Finkbeiner, 2000). Em neurônios estriatais em cultura, a PKC estimulou CREB de forma dependente da ERK (Mao et al., 2007). Foi proposto também, que a PKC, assim como a PI3K, poderiam ativar a ERK diretamente (Grammer e Blenis, 1997). Recentemente foi mostrado que a ativação das vias da PI3K e da ERK por BDNF poderia regular a migração de neuroblastos da zona subventricular por um mecanismo dependente da ativação de CREB (Chiaramello et al., 2007). Os produtos da PI3K ativam a AKT, que é uma enzima serina/treonina cinase com múltiplos alvos celulares inclusive a CREB (Kato et al., 2007). Estudos realizados com linhagens celulares transfectadas contribuíram para a compreensão dos mecanismos de fosforilação de CREB por diversas cinases. A PKD é ativada pela via da PKC e pode fosforilar diretamente a serina 133 de CREB, além de outros sítios observados em experimentos realizados com proteínas purificadas (Johannesen et al., 2007). A serina/treonina cinase GSK3 β , que fosforila apenas substratos previamente fosforilados, assim o faz com CREB em seu resíduo serina 129, após a fosforilação da serina 133 cooperando em sua ativação (Fiol et al., 1994). Porém foi mostrado posteriormente que a GSK3 β inibe a interação de CREB com o DNA (Grimes e Jope, 2001), corroborando o papel neuroprotetor da via PI3K/AKT (Papadia et

al., 2005), que conhecidamente ativa CREB é responsável também pela inibição da GSK3 β (Cross et al., 1995).

1.3 ERK

As ERKs são enzimas serina treonina cinases pertencentes à superfamília das MAPK (proteínas cinase ativadas por mitógenos), que foram inicialmente descritas no controle da reprodução de leveduras (Herskowitz, 1995). A via de transdução das MAPKs é bastante conservada entre os membros desta superfamília, que também compreende p38 e JNK (c-jun N-terminal cinase). Essa via é composta de três cinases: uma MAP cinase cinase cinase (MAPKKK), que fosforila e ativa uma MAP cinase cinase (MAPKK) que por sua vez ativa uma MAP cinase (MAPK). No caso das ERKs, inicialmente uma proteína Ras é ativada por receptores Trk, a Ras ativa a Raf (MAPKKK), que ativa a MEK (MAPKK), e esta ativa a ERK (MAPK) (Sweatt, 2004).

As ERKs 1 e 2 também são conhecidas como p44 e p42. Como previamente comentado, as ERKs podem ser ativadas por outras vias além da clássica, como Ca⁺⁺, a via da PKC, PI3K, e AKT, ainda que providas pelos receptores Trk. Foi mostrado que a ativação de ERK pelo FGF2 em fotorreceptores da retina de ratos depende de MEK. Porém, nos demais neurônios e glia de Müller a ativação de ERK ocorre por uma via resistente à inibição da MEK (Kinkl et al., 2001). Em culturas de fibroblastos o peroxinitrito um metabólito de NO, promoveu ativação da ERK, novamente sem a participação de MEK, por um mecanismo envolvendo a PKC (Bapat et al., 2001). Uma vez ativadas as ERKs fosforilam diretamente seus substratos como canais iônicos, transportadores, fatores de transcrição como c-fos, e

outras cinases como a RSK e a MSK. A RSK (cinase ribossomal S6 de 90 kDa) é uma cinase citoplasmática ativada pela ERK, enquanto a MSK (proteína cinase ativada por mitógenos e stress) pode ser ativada também pela p38 (revisado em Frödin e Gammeltoft, 1999). Essas duas cinases foram capazes de fosforilar CREB, porém a RSK demonstrou maior afinidade que a MSK pelo sítio de fosforilação (Deak et al., 1998).

1.4 Óxido Nítrico (NO)

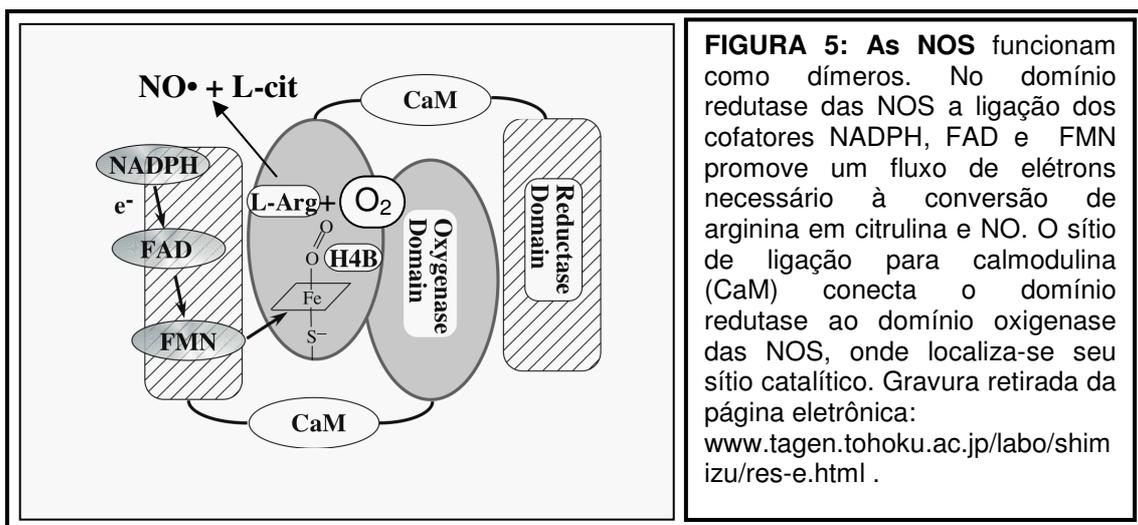
Há cerca de 20 anos o óxido nítrico (NO) foi identificado como uma molécula endógena, quando dois grupos de pesquisa independentes revelaram a identidade química do fator de relaxamento liberado pelo endotélio (EDRF) (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987), um mensageiro químico liberado por células endoteliais em resposta à acetilcolina (Furchgott e Zawadzki, 1980). No entanto, as propriedades vasodilatadoras de compostos nitrogenados já eram exploradas de forma terapêutica, reconhecendo-se que estes geravam NO e mimetizavam as ações do EDRF (Ignarro et al., 1981). A atuação do NO como mensageiro por células do sistema nervoso foi logo observada através do estímulo à formação de NO por glutamato em culturas de células granulares de cerebelo via receptores NMDA (Garthwaite et al., 1988). A formação endógena de NO foi também descrita em células imunes (Stuehr et al., 1989). Esses achados pioneiros impulsionaram uma ampla gama de pesquisas com o intuito de esclarecer possíveis papéis biológicos do NO em diversos tipos celulares, os mecanismos de sinalização e a forma como era produzido.

1.4.1 As Óxido Nítrico Sintases (NOS)

As óxido nítrico sintases (NOS) constituem um grupo de isoenzimas responsáveis pela síntese do NO. Essas enzimas receberam nomes diferentes de acordo com suas características bioquímicas e locais onde foram inicialmente encontradas. São conhecidas até esse momento três isoformas de NOS que apresentam uma relativa homologia, embora também possuam algumas peculiaridades e sejam produtos de genes distintos. A nNOS (neuronal), ou NOS I, foi a primeira a ser clonada em cerebelo de ratos; em seguida a NOS II foi obtida de macrófagos, também chamada de iNOS (induzível) por ser regulada ao nível de transcrição gênica; a eNOS (endotelial) ou NOS III foi encontrada nas células endoteliais (revisto por Yun et al., 1996). Entretanto, a localização ectópica das NOS tem sido pesquisada. Por exemplo, a NOS II pode ser induzida em células gliais durante injúria do sistema nervoso central por trauma ou infecção (Hori et al., 1999; Nakahara et al., 2002), ou expressa em neuroblastos da retina e córtex de ratos durante o desenvolvimento (Arnhold et al., 2002). A isoforma endotelial foi detectada no hipocampo (Kimura et al., 1999; Dinerman et al., 1994).

O aumento citoplasmático da concentração de Ca^{++} ativa as NOS endotelial e neuronal, através de um mecanismo envolvendo a ativação da calmodulina e sua subsequente ligação à NOS (Bredt e Snyder, 1990). Porém, a isoforma induzível de NOS é caracterizada como independentes de cálcio, pois apresenta afinidade tão alta à calmodulina que, mesmo em condições de baixo Ca^{++} , continua fortemente ligada. O sítio ao qual se liga calmodulina conecta os domínios oxidase e redutase da NOS, respectivamente localizados nas porções amino e carboxi-terminal do polipeptídeo (Lee e Stull, 1998).

A porção aminoterminal das NOS contém domínios importantes para a localização subcelular. A nNOS, por exemplo, apresenta uma seqüência de aminoácidos denominada domínio PDZ que consiste em um sítio de adaptação de proteínas como a PSD95 (proteína de densidade pós-sináptica 95), relacionada a receptores NMDA (Christopherson et al., 1999). O domínio oxigenase, também localizado na porção aminoterminal, abriga o sítio catalítico da enzima, além daquele para a ligação do cofator tetrahidrobiopterina (BH4). Na região carboxi-terminal está o domínio redutase, o qual compartilha cerca de 60% de homologia com a enzima hepática citocromo P450 redutase (Bredt et al., 1991). Desta forma, o domínio redutase das NOS apresenta sítios de ligação para FMN (flavina mononucleotídeo), FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) A ligação de calmodulina permite a ligação dos cofatores no domínio oxidase e a dimerização da enzima (figura 5). Em seguida ocorre o fluxo de elétrons, do NADPH ao Heme, gerando a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO (Craig et al., 2002; revisto por Yun et al., 2006).



1.4.2 Características fisicoquímicas e mecanismo de ação

O NO é uma molécula sinalizadora que não se enquadra nos parâmetros empregados para classificar os mensageiros convencionais. Ao contrário destes, NO não pode ser armazenado e nem degradado por enzimas, sendo sua liberação subordinada à síntese pelas NOS. Isto ocorre por causa das propriedades físico-químicas do NO, que se apresenta como gás na atmosfera, mas no ambiente celular se comporta como uma molécula hidrofóbica altamente reativa com as moléculas ali presentes. O NO propriamente dito, NO \cdot , possui um elétron livre (não pareado), logo suas interações com moléculas afins tem por finalidade o paramento deste elétron. Além de NO \cdot , podem ocorrer o ânion nítróxido (NO $^-$) e o cátion nitrosônio (NO $^+$), que também possuem propriedades sinalizadoras (revisado por Pagliaro, 2003). Ao ser formado, NO é rapidamente oxidado, reduzido ou complexado com outras moléculas. Entretanto, tais reações são extremamente dependentes da composição química do meio.

NO reage com Fe $^{2+}$ encontrado no grupamento heme presente na estrutura de diversas proteínas e também utilizado como cofator de enzimas, ligando-se reversivelmente. Assim, NO é capaz de inibir a própria NOS (Assreuy et al., 1993) agindo como um regulador de sua síntese, ou ativar a guanil ciclase solúvel (GCs), também denominada receptor de NO (Bellamy e Garthwaite, 2002; Bellamy et al., 2000). A elevação dos níveis de GMPc foi o primeiro mecanismo de ação descrito para o NO. Este segundo mensageiro modula diretamente a atividade de certos canais iônicos controlados por nucleotídeos (Savchenko et al., 1997), e também ativa uma proteína cinase dependente de GMPc (PKG). Diversos canais iônicos possuem sítios

consenso para a fosforilação por PKG (revisado por Ahern et al., 2002), que é uma serina/treonina cinase envolvida em cascatas de múltiplas fosforilações.

As respostas celulares à geração de NO envolvem também mecanismos independentes de GMPc como a nitrosilação e a nitração. A nitrosilação, também conhecida como nitrosação, consiste em uma reação de NO, geralmente em sua forma NO^+ , com radicais sulfidríla presentes em resíduos de cisteína formando um nitrosotiol. A nitrosilação provoca modificações pós-traducionais comparáveis à fosforilação nas proteínas, pois através dela pode ocorrer ativação ou inativação das mesmas. Através da s-nitrosilação NO é capaz de modificar a atividade do receptor NMDA (Choi et al., 2000), do fator de transcrição NFKB (Marshall et al., 2004) e do receptor rianodínico (Xu et al., 1998), dentre muitos outros alvos. Esse mecanismo não ocorre ao acaso, pois existem seqüências consenso para s-nitrosilação, compostas de aminoácidos básicos e ácidos flanqueando um resíduo de cisteína, que deve ter seu grupamento $-\text{SH}$ livre para reagir com NO (Hess et al., 2001). O grupamento nitroso, adquirido por uma molécula após a nitrosilação, pode ser transferido para tiois em outra molécula através de transnitrosilação (Gaston et al., 2003). A transnitrosilação é de grande importância biológica, pois pequenos nitrosotiois como a nitrosoglutationa podem consistir em uma reserva de NO/nitrosotiois da qual as células lançam mão quando convém (Rauhala et al., 2005).

Sob baixas concentrações de arginina, as NOS podem concomitantemente produzir O_2^- , ânion superóxido. A reação de NO com O_2^- gera peroxinitrito (ONOO^-), um radical livre altamente deletério às estruturas celulares e também um potencial precursor do radical OH^\cdot (hidroxila). O ONOO^- é produzido sob condições de “stress” oxidativo, em geral durante respostas

inflamatórias ou excitotoxicidade. Todavia, o potencial sinalizador do peroxinitrito vem sendo explorado levando a observação de que essa molécula pode interagir com resíduos de tirosina em proteínas, formando 3-nitrotirosina, em uma reação denominada nitração. O aumento da fosforilação de p38 MAPK (“mitogen activated protein kinase”) e ativação da caspase 3 em células de neuroblastoma foram eventos dose-dependentes obtidos com a incubação das mesmas com peroxinitrito (Oh-hashii et al., 1999). Peroxinitrito promove a nitração de resíduos de tirosina em proteínas que, em casos específicos, parece competir com a fosforilação do mesmo resíduo. Porém, essa ação pode aumentar os níveis gerais de fosforilação na célula, sendo um exemplo a inibição de fosfatases de tirosina por nitração (revisado por Monteiro, 2002). A nitração, que também é uma reação covalente, é revertida por denitrases (Kamisaki et al., 1998).

Mais recentemente foi descrito na literatura um modo de sinalização que concilia a ativação da GCs com os as espécies reativas de nitrogênio advindas da formação de NO, pois estes podem reagir com GMPc produzindo o 8-nitro-GMPc. Esta molécula tem um potencial papel biológico, pois apesar de muito a se esclarecer sobre o 8-NO₂-GMPc, sabe-se que ele promove a guanilação ao reagir com tióis liberando nitrito (NO₂⁻) (Feelisch, 2007). A figura 6 sumariza os mecanismos de ação do NO.

1.4.4 NO e CREB

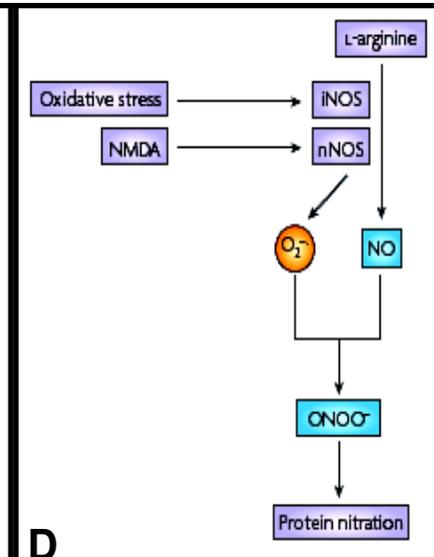
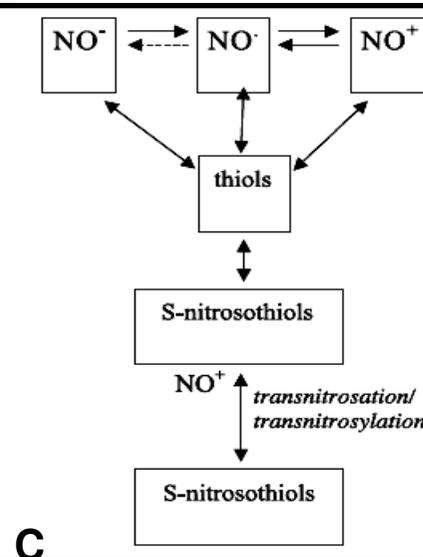
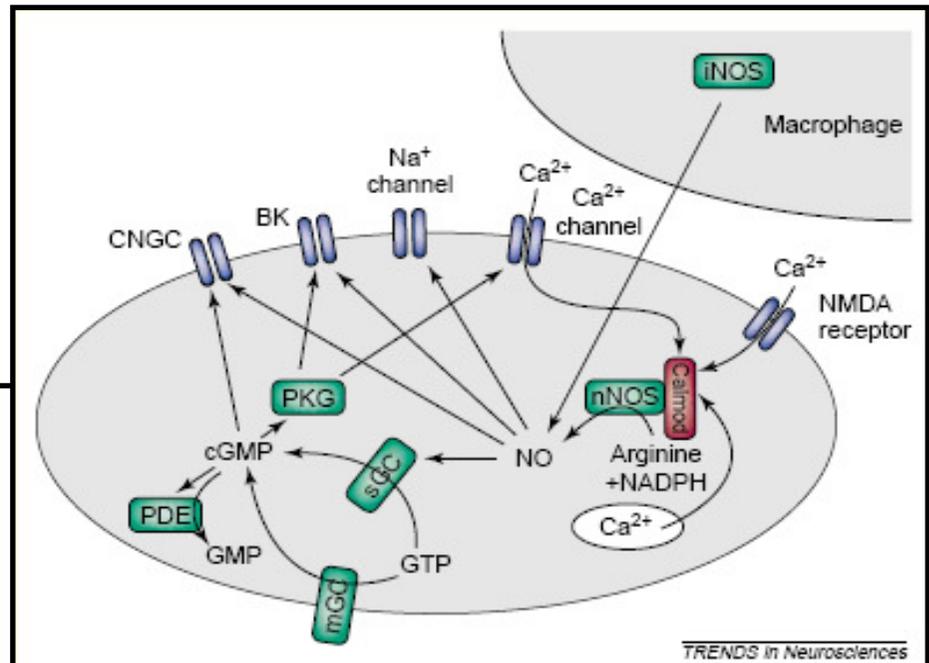
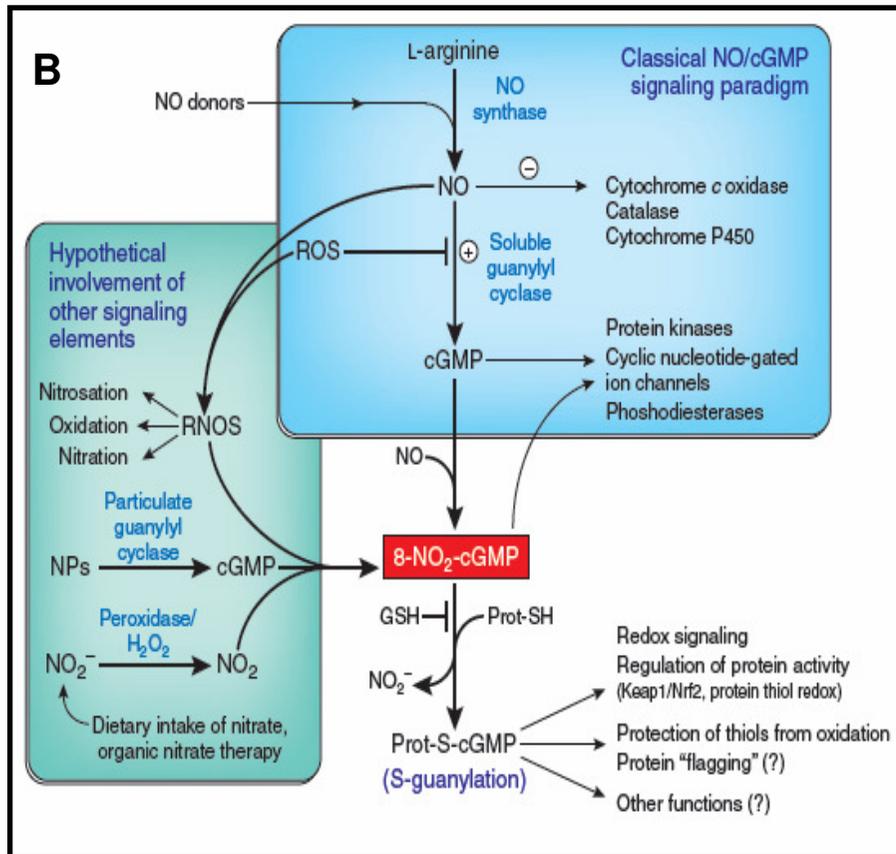
A despolarização é um evento que pode levar à ativação da NOS através da entrada de cálcio nas células. NO gerado a partir deste fenômeno é capaz de modular a transcrição de genes comandados por CREB através de

seus mecanismos de ação como a s-nitrosilação, ou o aumento dos níveis de GMPc (Riccio et al., 2006; Peunova e Enikolopov, 1993). O GMPc ativa a PKG que foi demonstrada ativar a transcrição da Bcl2, uma proteína antiapoptótica, via CREB em neurônios do cerebelo (Ciani et al., 2002). NO foi capaz de regular a transcrição de c-fos no núcleo tracto solitário, que regula a pressão arterial a nível nervoso, pela via GMPc/PKG/CREB (Chan et al., 2004). Esta mesma via mediou o papel neuroprotetor do NO em uma linhagem imortalizada de progenitores neuronais e gliais de retina (Nagai-Kusuhara et al., 2006). O NO contribui para a ligação de CREB ao DNA em neurônios corticais tratados com BDNF, pois nitrosila histona-acetilases provocando sua inibição e liberação do CRE (Riccio et al., 2006).

1.5 Glutamato

Glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante pelo sistema nervoso central (SNC). A transmissão glutamatérgica é realizada pela ligação do glutamato a receptores metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (iGluRs) presentes na membrana plasmática de neurônios. O glutamato altera a permeabilidade dessas células, classicamente produzindo potenciais de ação. Mas seu papel vai muito além, pois a entrada de cálcio através dos receptores ionotrópicos ou de canais de cálcio regulados por voltagem é responsável pela ativação de vias de sinalização intracelulares que promovem a ativação de genes envolvidos nas alterações de longo termo provocadas pelo glutamato.

FIGURA 6: Mecanismos de ação do NO. A) A via NO/GMPc relacionada a ativação de canais controlados por nucleotídeos (CNGC) e canais de K⁺ controlados por Ca⁺⁺ (BK). retirada de Ahem et al, 2002. B) Mecanismo de guanilação através do metabólito 8-NO₂-GMPc, produto de reações de espécies reativas de nitrogênio e GMPc. Retirado de Feelisch, 2007. C) Mecanismo de s-nitrosilação e transnitrosilação. Retirado de Pagliaro, 2003. D) Mecanismo de nitração. Retirado de Calabrese et al, 2007.



Ademais, quando o estímulo aos neurônios é demasiado, pode ocorrer um descontrole na dinâmica citoplasmática do cálcio e a ativação de vias relacionadas à morte celular com ativação da calcineurina, e liberação do citocromo C (Papadia et al., 2005), o que originou o termo excitotoxicidade.

As células gliais mostram um papel fundamental na homeostase da sinapse glutamatérgica, pois expressam diversos subtipos de transportadores que captam glutamato em excesso e potencialmente nocivo, o qual é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase presente no citoplasma glial. A glutamina é liberada pela glia e captada pelo neurônio, que a converte novamente em glutamato pela glutaminase (revisado por Thoreson e Witkovsky, 1999), estabelecendo-se uma interação neurônio-glia fundamental. Os receptores de glutamato são também expressos na glia (Lamas et al., 2005). Células de Müller em cultura tratadas com glutamato aumentaram a secreção de neurotrofinas (Taylor et al., 2003), sugerindo um papel trófico do glutamato envolvendo a população celular não neuronal do sistema nervoso.

1.5.1 Receptores ativados por glutamato

1.5.1.1 mGluR

Os receptores metabotrópicos ativados por glutamato foram descritos pela primeira vez na segunda metade da década de oitenta, quando se verificou que o tratamento com glutamato foi capaz de ativar a fosfolipase C (PLC) em culturas de neurônios do corpo estriado de maneira independente dos receptores ionotrópicos, já conhecidos naquele momento (Sladeczek et al., 1985). Outros trabalhos foram publicados em seguida demonstrando efeitos

semelhantes do glutamato reforçaram as suspeitas da existência de receptores de glutamato acoplados à proteína G, regulando sistemas de segundos mensageiros (revisto por Pin e Duvoisin, 1995). As características farmacológicas, homologia e vias de transdução associadas definem três categorias funcionais dos mGluRs. O grupo I compreende os mGluR1 e mGluR5, acoplados positivamente à PLC. O grupo II inclui os mGluRs2 a 3, e o grupo III inclui os mGluR4 e mGluRs6 a 8, e todos esses sinalizam classicamente através da Gi diminuindo os níveis intracelulares de AMPc (revisto por Gerber, 2003).

1.5.1.2 iGluRs

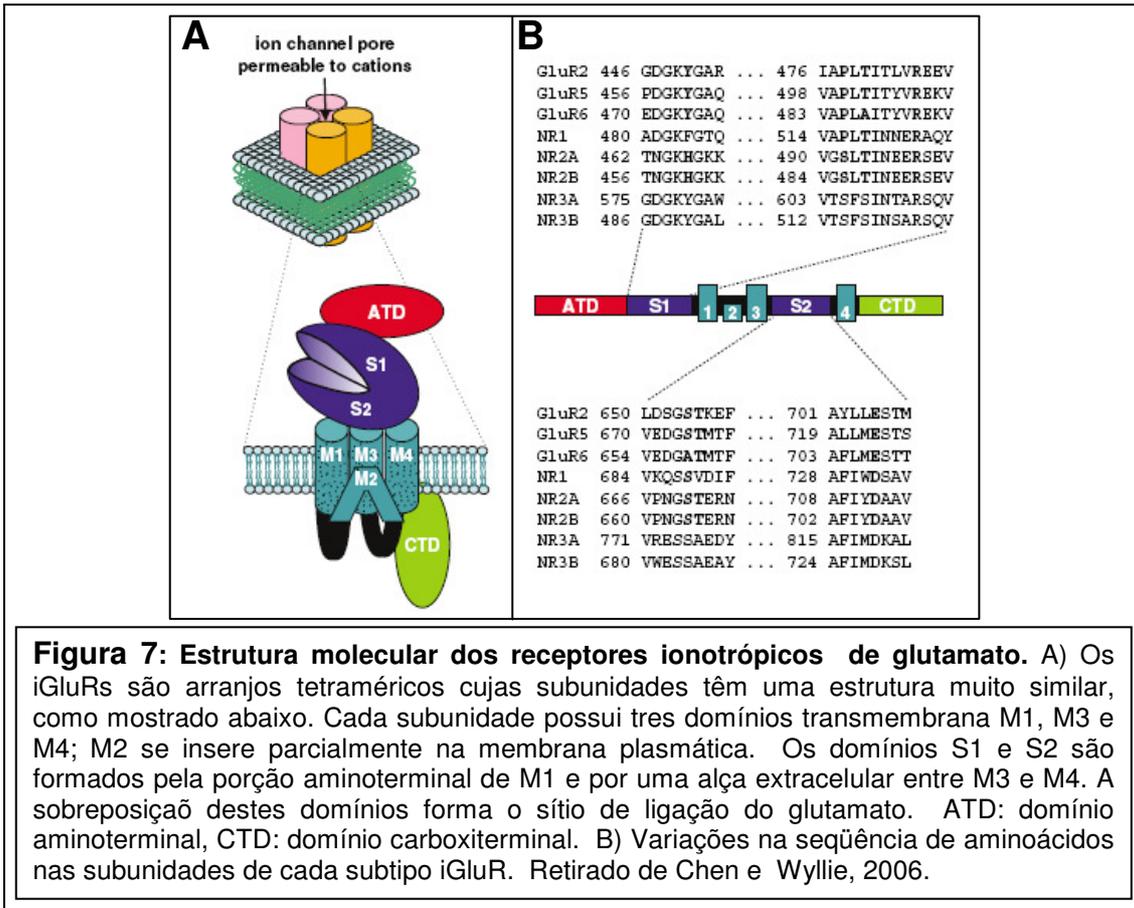
Os receptores ionotrópicos são classificados como NMDA e não-NMDA segundo sua afinidade aos agonistas sintéticos N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato (AMPA) e kainato. A estrutura molecular dos receptores ionotrópicos de glutamato é muito similar (figura 7), consistindo de arranjos de quatro subunidades protéicas que juntas formam um canal permeável a cátions (revisado por Chen e Wyllie, 2006) relativamente seletivo. Cada subunidade possui domínios M1, 2, 3 e 4, que interagem fisicamente com a membrana plasmática. Os domínios M2 inserem-se parcialmente na membrana formando a luz do canal, e os resíduos dos aminoácidos que o compõem influenciam a permeabilidade, pois interagem com as espécies iônicas que permeiam os iGluRs. M1, M3 e M4 transpassam a membrana de uma face a outra, e as regiões entre M3 e M4, e a porção aminoterminal adjacente à M1 formam duas alças extracelulares que contêm os domínios S1 e S2 que formam o sítio de ligação ao glutamato e diversas

drogas dentre agonistas e antagonistas. A região carboxiterminal é intracelular, e pode ser comparada a um pólo de sinalização, em face das interações protéicas além daquelas envolvidas com o tráfego e localização dos iGluRs, fazendo destes receptores muito mais que simples condutos iônicos (revisado por Huettner, 2003).

AMPA/kainato

Os receptores do tipo AMPA e kainato (AMPA/KARs) foram também referidos como preferenciais para os agonistas AMPA e kainato, pois diferentes estratégias experimentais confirmaram que ambos os receptores respondem a AMPA e kainato, porém com diferente afinidade e cinética de dessensibilização (Bettler e Mülle, 1994).

Os receptores AMPA são formados pelas subunidades GluR1, 2, 3 e 4. Estudos realizados em sistemas heterólogos vêm esclarecendo alguns aspectos da combinação destas subunidades. A princípio, estas formam dímeros, que em seguida formam pares dentro do retículo endoplasmático. A combinação de heterodímeros é mais favorável, e a ausência da subunidade GluR2 nestes arranjos forma receptores permeáveis ao cálcio. A subunidade GluR2 é expressa na maioria dos receptores AMPA, sendo naturalmente editada na região M2 onde ocorre a substituição de uma glutamina por L-arginina, carregada positivamente, conferindo fraca permeabilidade ao cálcio (revisado por Cull-Candy, 2006).



A estrutura molecular dos receptores kainato é bastante semelhante à dos receptores AMPA. As subunidades GluR 5, 6 e 7 podem formar homo ou heterotetrâmeros juntamente com KA 1 e 2, que sozinhos não formam receptores funcionais. As subunidades GluR 5 e 6 ligam glutamato bem como outros ligantes com diferente afinidade, através de ligações químicas não-covalentes com os resíduos de aminoácidos de S1 e S2. Desta forma diferentes combinações de subunidades também são responsáveis por receptores com diferentes características farmacológicas e biofísicas.

NMDA

Assim como os receptores do tipo AMPA e kainato, os receptores NMDA consistem em tetrâmeros, que combinam as subunidades NR1, NR2a-c e

NR3a-b. A subunidade NR1 é produto de apenas um gene que gera oito diferentes isoformas por “splicing”. A presença de NR2 e NR1 é essencial para a formação de receptores funcionais, pois nestas respectivas subunidades residem os sítios de ligação de glutamato e de glicina, um coagonista dos receptores NMDA. A subunidade NR3 foi identificada mais recentemente. Esta subunidade também liga glicina, e sua presença está relacionada a uma diminuição do bloqueio por magnésio e menor permeabilidade ao cálcio, devido à presença de um resíduo de arginina na região M2, que forma a luz do canal (Revisado por Paoletti e Neyton, 2007).

Os receptores NMDA são responsáveis pela fase mais tardia dos potenciais sinápticos excitatórios, pois para que esse canal se abra é necessária uma despolarização prévia, mediada por correntes evocadas pelos receptores do tipo AMPA e kainato. Com isso, o íon Mg^{2+} que oclui o canal é removido, e as mudanças conformacionais provocadas pelos agonistas permitem um alto influxo de Ca^{2+} (MacDermott et al., 1986).

1.5.1.3 GluRs na retina

Metabotrópicos (mGluR)

Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) estão presentes na retina contribuindo para a fisiologia deste tecido. Os mGluRs provocam alterações celulares relativamente lentas se comparados aos receptores ionotrópicos, comumente envolvidos na transmissão sináptica. Entretanto, o sinal elétrico transmitido dos fotorreceptores para as células bipolares do tipo ON é mediado diretamente via canais de cátions controlados por GMPc,

negativamente regulados pelo mGluR6 no escuro (Nawy, 1999). Essa exceção mostra que, de acordo com sua localização celular, os mGluRs podem participar diretamente na transmissão sináptica. O mGluR8 está presente em fotorreceptores diminuindo a concentração interna de cálcio e funciona como um autorreceptor (Koulen et al., 1999; Koulen and Brandstatter, 2002).

Os mGluRs 1 e 5 são expressos na retina de pinto pós-eclosão, sendo detectados por imunohistoquímica nas camadas plexiformes externa e interna (Kreimborg et al., 2001). Um estudo subsequente mais detalhado demonstrou que os mGluR 1 e 5 estão presentes ao nível sináptico nas camadas plexiformes, ambos em um padrão muito similar, o que sugere a colocação destes receptores e sua colaboração nos eventos sinápticos (Sen and Gleason, 2006). Esses dados fornecem evidências da participação dos mGluRs no processamento lateral da informação transmitida dos fotorreceptores às células ganglionares. Quando retinas de galinha em diversas fases embrionárias foram tratadas com agonistas mGluR dos grupos II e III, houve inibição do acúmulo de AMPc promovido por forskolina, porém de forma diferenciada para cada grupo de mGluR com o avançar da idade (Sampaio and Paes-de-Carvalho, 1998).

A expressão e funcionalidade dos mGluRs em culturas de retina embrionária de galinha é de grande importância para a compreensão dos mecanismos de transdução de sinais empregados por esses receptores, bem como sua interação com outras classes de receptores de glutamato. Em culturas mistas, a ativação de mGluRs do grupo III com L-AP4 foi capaz de inibir o aumento dos níveis de AMPc induzidos por forskolina (Sampaio and Paes-de-Carvalho, 1998). A liberação de [³H]acetilcolina por células amácrinas

em cultura induzida por despolarização com alto K^+ foi diminuído por L-AP4, um efeito revertido pelo tratamento com agonistas de mGluRs dos grupo I e II (Caramelo et al., 1999), indicando a presença e interação dos três grupos de mGluR nas células amácrinas. Os mGluRs do grupo II foram relacionados à fosforilação e atividade da subunidade GluR4 dos receptores AMPA (Gomes et al., 2004).

AMPA/kainato

O papel dos receptores AMPA e kainato (AMPA/kaRs) na retina se faz evidente nas sinapses entre fotorreceptores e células bipolares OFF (Brandstätter e Hack, 2001), onde o glutamato causa despolarização por intermédio destes receptores. As subunidades dos receptores AMPA e kainato são expressas na retina externa incluindo as células bipolares ON (Morigiwa e Vardi, 1999), implicando na contribuição de diferentes classes de receptores de glutamato na percepção da luz em uma mesma célula. Em retina de peixes, a retração de neuritos nas células horizontais relacionada à adaptação ao escuro é mediada por receptores AMPA permeáveis a Ca^{++} (Okada et al., 1999).

Na retina de galinha os AMPA/kaRs foram identificados na camada nuclear interna, camada de células ganglionares e nas camadas plexiformes de forma heterogênea (Bredariol and Hamassaki-Brito, 2001). Estudos realizados com radioligantes ao longo do desenvolvimento da retina de galinha revelaram que os AMPARs alcançam um pico em E7, e apresentam uma mudança de afinidade importante durante sua ontogênese (Somohano et al., 1988). O padrão de expressão dos AMPA/KaRs, crescente ao longo do desenvolvimento na retina, foi mimetizado em culturas de agregados celulares de retina de

galinha obtidas em diversas fases do desenvolvimento embrionário (Cristóvão et al., 2002a).

A presença de AMPA/kaRs em células da retina em cultura foram detectadas por diversas abordagens experimentais, trazendo à luz uma miríade de interações funcionais dos receptores de glutamato no tecido retiniano. A afinidade dos iGluRs em células horizontais de peixes em cultura foi afetada por óxido nítrico e dopamina, por um mecanismo independente de dessensibilização (McMahon e Schmidt, 1999). Células horizontais recém isoladas da retina de coelhos respondem a glutamato com aumento na condutância catiônica via AMPARs (Blanco e De La Vila, 1999). A ativação de AMPA/kaRs aumentou a liberação de purinas em culturas mistas de retina embrionária de galinha com envolvimento da cinase dependente de Ca^{++} /calmodulina II (CaMKII) (Paes-de-Carvalho et al., 2005). Em culturas purificadas de neurônios da retina embrionária de galinha o estímulo da PKC (proteína cinase C) provocou aumento na fosforilação e na expressão de GluR4 na superfície dessas células (Gomes et al., 2007).

Os estudos realizados com culturas são de grande importância no entendimento de aspectos do desenvolvimento da retina. A ativação de AMPARs permeáveis ao Ca^{++} em culturas dissociadas ou explantes de retina de galinha em desenvolvimento provocou morte celular, enquanto a aplicação contínua de altas doses de Kainato desde idades precoces como E6 não surtiu efeito lesivo nas células (Allcorn et al., 1996). A expansão de neuritos em culturas de retina embrionária mostrou-se diminuída com a ativação dos AMPARs permeáveis ao Ca^{++} (Catsicas et al., 2001). A permeabilidade dos AMPARs aos íons cálcio demonstrada nestes achados podem indicar uma

ligação entre estes e vias de sinalização envolvidas na transcrição gênica que influenciem a morte celular ou a sobrevivência neuronal (Santos et al., 2001). Finalmente, a expressão das subunidades GluR1-4 (AMPA) e 6-7 (kainato) foi mostrada em culturas de agregados de células da retina de galinha em diferentes estágios do desenvolvimento, porém a funcionalidade dos AMPARs não foi detectada precocemente nas culturas (Cristóvão et al., 2002a).

NMDA

A retina de vertebrados apresenta maior expressão de NMDARs nas células amácrinas e ganglionares (Jakobs et al., 2007; Kalloniatis et al., 2004). Alguns achados recentes mostram subunidades NMDA em fotorreceptores e células horizontais (Fletcher et al., 2000; Gründer et al., 2000), embora careçam da análise funcional dos supostos NMDARs encontrados. Entretanto, evidência funcional foi encontrada em células horizontais de carpas (Shen et al., 2006).

A expressão de subunidades de NMDARs foi associada à formação de sinapses durante o desenvolvimento embrionário da retina de galinha, pois estes foram “up-regulados” em E15, e a experiência da luz pareceu “down-regular” a subunidade NR2a (Cristóvão et al., 2002b).

Achados relevantes a respeito da neuroquímica dos NMDARs vêm sendo alcançados em células de retina de galinha em cultura. O tratamento de culturas mistas com NMDA aumenta a liberação de purinas (Paes-de-Carvalho et al., 2005). Em culturas semelhantes a ativação de NMDARs inibiu a síntese protéica disponibilizando mais L-arginina que foi empregada na síntese de NO (Cossenza et al., 2006). Culturas de células de Müller de ratos tratadas com

glutamato aumentaram a secreção de neurotrofinas de forma dose-dependente (Taylor et al., 2003). Houve nestas condições um concomitante aumento da expressão do transportador de glutamato EAAT1 e “down-regulação” da subunidade NR1, corroborando o papel trófico e homeostático dos NMDARs na retina. Um trabalho recente mostra que as propriedades cinéticas e farmacológicas do sítio de interação do NMDAR com glicina diferem em células de Müller e neurônios da retina (Lamas et al., 2005). Culturas de agregados celulares apresentaram atividade dos NMDARs e um padrão de expressão das subunidades NR1, NR2a/b and NR2c muito similar ao tecido retiniano durante o desenvolvimento embrionário (Cristóvão et al., 2002b).

1.5.2 NO e glutamato: enfoque na retina

No sistema nervoso a síntese de NO está bastante relacionada com a ativação dos receptores de glutamato, principalmente aos NMDARs. Através dos receptores desta classe há um intenso influxo de Ca^{++} que ativa a NOS. A NOS neuronal é capaz de se localizar estrategicamente próxima ao NMDAR através de uma interação de seu domínio PDZ com a PSD95, a proteína de densidade pós-sináptica que se encontra associada ao NMDAR dentre outros canais iônicos (revisado por Brenman e Bredt, 1997). Contudo, os AMPARs e os mGluRs também são capazes de promover oscilações do Ca^{++} intracelular e ativar a NOS, seja por influxo ou mobilização de estoques internos. A ativação de mGluRs com trans-ACPD aumentou os níveis de GMPc em culturas organotípicas de cerebelo através da ativação da NOS (Okada, 1992). Em outro trabalho, a estimulação dos AMPARs, NMDARs ou mGluRs foi capaz de aumentar os níveis de metabólitos diretos de NO (NO_2^-/NO_3^-) in vivo no

cerebelo de ratos (Yamada e Nabeshima, 1997). Mais recentemente foi demonstrado também que a ativação de AMPA/KaRs estimula a produção de NO (Radenovic e Selakovic, 2005), e que NO exerce influência sobre as oscilações de cálcio provodadas pelo AMPAR em uma subpopulação de células do hipotálamo em culturas organotípicas (Roychowdhury et al., 2006)

Os elementos dos fenótipos nitrérgico e glutamatérgico coexistem na retina de várias espécies. Estes podem estar presentes desde idades embrionárias, sugerindo sua participação em fenômenos relacionados ao desenvolvimento da retina bem como do sistema visual. A síntese de NO estimulada pelo receptor NMDA em culturas de retina embrionária de ratos foi bloqueada pela dopamina através de um mecanismo envolvendo a formação de AMPc e não a inibição das correntes de Ca^{++} evocadas pelo NMDAR (Yamaushi et al., 2003). A eliminação de projeções retinotectais ipsolaterais que ocorre ao longo do desenvolvimento requer a produção de NO estimulada pelo NMDAR (Ernst et al., 1999). Ensaios radioquímicos detectaram a conversão de L-[3H]-arginina em L-[3H]-citrulina na retina embrionária de galinha com oito dias embrionários (E8) que foi estimulada por glutamato, inibida por análogos de arginina e pelo bloqueador do receptor NMDA MK801 (Paes-de-Carvalho e de Mattos, 1996). Os mGluRs e os AMPA/KaRs estão presentes ao longo do desenvolvimento da retina, mas são pouco documentados sob o aspecto de sua interação com a NOS. Em E14, um período de sinaptogênese na retina de galinha, baixas doses de KA, NMDA e trans-ACPD são capazes de estimular a NOS, enquanto altas doses dessas drogas provocam um “feedback” inibitório na produção de NO (López-Colomé e López, 2003).

2- OBJETIVOS:

Trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Neurobiologia Celular apontam o papel fundamental do glutamato durante o desenvolvimento da retina de galinha. Temos também demonstrado o papel do NO, e a interação do glutamato com o sistema nitrérgico. O presente trabalho foi realizado parcialmente com culturas mistas de neurônios e células gliais da retina embrionária de galinha, e com o tecido retiniano intacto. O seu objetivo geral foi estabelecer um elo entre o glutamato e o NO, e a modulação das vias de sinalização que convergem com a ativação da ERK e com a fosforilação da CREB. Para isto foram propostos alguns objetivos específicos:

- ❖ Verificar o envolvimento do glutamato com a fosforilação da CREB e da ERK.
- ❖ Identificar qual(is) iGluR medeiam os efeitos do glutamato
- ❖ Investigar a participação do NO na modulação da fosforilação de ERK e CREB pelo glutamato.
- ❖ Identificar a via pela qual NO exerce seus efeitos.
- ❖ Verificar se há envolvimento de outras vias de sinalização nos efeitos do NO.

- ❖ Identificar a população celular alvo do aumento da fosforilação de CREB nas culturas.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Materiais:

BSA, CHE, DNQX, KT 5923, KN62, SNAP, Glutamina, Penicilina e Estreptomicina foram obtidas da Sigma/RBI Chem.Co. (Missouri, Estados Unidos). MEM, Soro Fetal Bovino e Tripsina foram obtidos da GIBCO (Nova York, Estados Unidos). MK801 foi obtido da Calbiochem (Califórnia, Estados Unidos). PD 98059 e PP1 foram obtidos da Biomol (Pensilvânia, Estados Unidos). Kit ECL e anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho conjugados à peroxidase foram obtidos da Amersham (Buckinghamshire, Inglaterra). O anticorpos monoclonais anti-camundongo contra p-ERK e p-CREB, e anti-coelho contra CREB e AKT foram obtidos da Cell Signaling (Madison, Estados Unidos) e o anticorpo policlonal anti-coelho contra ERK foi obtido da Promega (Madison, Estados Unidos).

3.2-Culturas mistas de neurônios e células gliais:

Ovos de galinha fertilizados da espécie White Leghorn foram obtidos em uma granja local e foram mantidos a 38 °C em uma incubadora com atmosfera umidificada. Culturas em monocamada de células de retina de pinto foram preparadas como previamente descrito (de Mello et al., 1978). As retinas de embrião de pinto de 8 dias (E8) foram dissecadas dos demais tecidos oculares, em solução salina livre de cálcio e magnésio (CMF) (NaCl, 131mM; KCl, 4.09mM; NaH₂PO₄.7H₂O, 0.92mM; KH₂PO₄, 0.45mM; glucose.H₂O, 12.2mM; NaHCO₃, 9.4mM) e dissociadas quimicamente com tripsina 0,1% em uma solução CMF por 10/15 minutos a 37°C. Em seguida, o sobrenadante era descartado e as retinas eram dissociadas mecanicamente por pipetagem em

meio mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 3% de soro fetal bovino inativado termicamente, penicilina (100U/mL), estreptomicina (100 ng/mL) e glutamina (2mM). Essa suspensão de células era semeada em placas de cultura de 40mm de diâmetro, em uma densidade aproximada de 10^4 células/mm². As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, em 5% de CO₂. O meio de cultura era trocado com 1 dia de cultura (C1).

3.3-Incubação com drogas:

3.3.1 Culturas:

Após dois dias de incubação, o meio das culturas mistas era trocado por meio fresco sem soro, e as mesmas foram assim mantidas por 24 horas, para o estudo da fosforilação de ERK e CREB. A fosforilação basal destas duas proteínas mostrava-se bastante elevada em culturas mantidas com soro até o dia do experimento, dificultando a detecção do estímulo (dado não mostrado). Por isso utilizamos este protocolo de privação de soro, que não provocou morte das células em cultura (tomando como base o critério morfológico). As culturas privadas de soro por 24 horas eram lavadas duas vezes com solução salina de Hank's (NaCl 140mM, KCl 5mM, HEPES 20mM, glicose 4mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM) e incubadas com drogas diluídas nessa solução por tempos pré-determinados. As drogas utilizadas com o intuito de inibir a via estimulada foram pré-incubadas por 2 minutos antes da adição da droga usada como estímulo. Nas situações controle, as culturas eram incubadas por 2 minutos em Hank's puro, todos esses procedimentos foram realizados em banho a 37°C.

3.3.2 Retina:

Retinas de embriões em diferentes idades eram dissecadas em CMF gelado, transferidas para placa com Hank's e pré-incubadas por 15 minutos no banho a 37°C para adaptação. Em seguida eram adicionadas as drogas, assim como nos experimentos com culturas os inibidores eram adicionados desde a pré-incubação.

3.4 Western Blotting

3.4.1 Preparo das amostras

Ao fim dos experimentos com as culturas a solução de Hank's com drogas era aspirada e o material celular era recolhido raspando-se a placa com 100µL de tampão de amostra para eletroforese (10% glicerol, 100mM 2-mercaptoetanol, 2%SDS), e transferido para Eppendorfs. O material era agitado em vortex e aquecido a 100°C por 6 minutos, e então congelado a -20°C.

Nos experimentos realizados com a retina intacta, após a incubação com drogas, o tecido era transferido para eppendorfs contendo tampão de amostra para eletroforese, que eram vigorosamente agitados em vortex para a dissociação do tecido, em seguida esse material era aquecido a 100°C por 6 minutos e congelado a -20°C até sua utilização.

A determinação do conteúdo protéico das amostras foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Uma vez determinada, a concentração de proteínas de cada amostra, foi adicionado o corante azul de bromofenol em uma concentração final de 0,1%.

Quantidades pré-determinadas de amostras (30 a 60 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 9% contendo SDS (Laemmli, 1970). Em seguida as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF por eletrodifusão, conforme descrito por Towbin e colaboradores em 1979.

3.4.2 Incubação da membrana com anticorpos específicos e revelação:

A membrana PVDF contendo as proteínas foi inicialmente incubada com 5% de leite desnatado em solução tampão de Tris (TBS) pH 7,6 contendo 0,1% Tween (TBS-T), por 1 hora, para bloquear a adsorção inespecífica de anticorpos. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos (1:2000 anti p-ERK e 1:3000 anti ERK total, 1:2000 anti p-CREB, 1:1000 CREB total, 1:4000 anti AKT total), em TBS-T 5% de leite, de um dia para o outro a 4º C. No dia seguinte, após 3 lavagens sucessivas em TBS-T, a membrana foi incubada por período de 1 hora com anticorpos secundários anti-mouse ou anti-rabbit, Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos em TBS-T, e uma vez em TBS puro. Após as lavagens as membranas foram incubadas com os reagentes do kit ECL para reação de quimioluminescência, catalisada pela enzima peroxidase conjugada ao anticorpo secundário, e expostas a filme radiográfico próprio.

Para a realização do controle do carregamento, após a revelação as membranas foram lavadas em TBS e, em seguida, incubadas em uma solução de glicina 0,2M pH 2,2 por 30 minutos sob agitação suave para a remoção dos anticorpos ligados à membrana. Após este período, as membranas foram lavadas por 3 vezes em TBS e, em seguida, realizou-se o mesmo

procedimento de bloqueio e incubação com os anticorpos descritos anteriormente.

Os filmes obtidos na reação de quimioluminescência foram digitalizados em um scanner, e os níveis de fosforilação da ERK e da CREB foram determinados pela análise densitométrica das imagens utilizando-se o programa Scion Image.

3.5 Imunocitoquímica

Culturas mistas de embriões de oito dias (E8C3) foram plaqueadas sobre lamínulas pretratadas por 2 a 4 horas com 50 µg/ml de poli L-ornitina. Após incubação com drogas, as células foram lavadas duas vezes com solução salina de Hank's e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 10 minutos. Em seguida as células foram lavadas duas vezes por cinco minutos com PBS e incubadas por 1 hora com solução de bloqueio de sítios inespecíficos e de permeabilização da membrana (3% BSA, 3% SBF and 1% TritonX-100 em PBS). Os anticorpos primários (1:150 anti-pERK1/2; 1:100 anti-pCREB; 1:300 anti-2M6) foram incubados de um dia para o outro sobre as lamínulas em uma câmara úmida. Após essa incubação as lamínulas foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada) com PBS, e incubadas com anticorpos secundários fluorescentes (anti-rabbit Alexa568 e anti-mouse Alexa488) por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes de 10 minutos com PBS, uma vez com TBS, e incubadas por 40 segundos com solução 1:1,000 de DAPI em TBS, e então lavadas duas vezes com TBS. As lamínulas foram montadas sobre laminas com n-propil-galato como meio, e então visualizadas em microscópio de fluorescência.

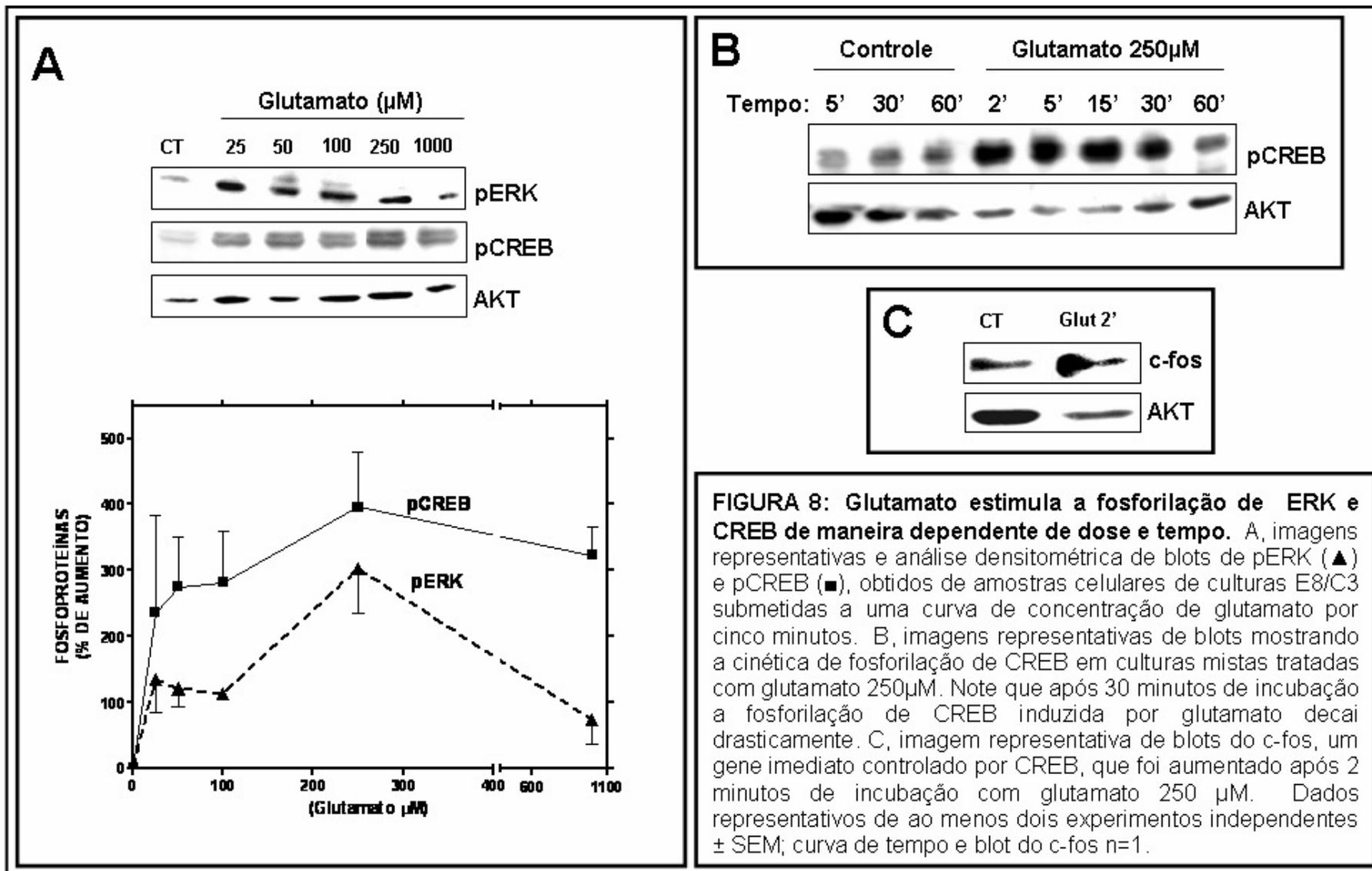
3.6. Análise Estatística

Os dados foram analisados pela análise de variância ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, utilizando-se o programa *GraphPad Prism*.

4- RESULTADOS

4.1 Cultura:

Os receptores ionotrópicos de glutamato são expressos em diferentes populações neuronais da retina *in vivo* e em cultura ao longo do desenvolvimento (Cristóvão et al., 2002, a e b). A ativação destes receptores no sistema nervoso central está relacionada à via das MAPK em células neuronais e também com a ativação de CREB (Hardingham et al., 2001; Perkinson et al., 1999). Partindo dessas premissas, decidimos investigar o papel do glutamato na fosforilação da ERK2, bem como na fosforilação do resíduo 133 de serina da CREB. Com esta finalidade as culturas mistas E8/C3 foram estimuladas com diferentes concentrações de glutamato. A análise da fosforilação da ERK2 por “western blot” demonstrou que concentrações de glutamato baixas como 25 ou 50 μM são capazes de aumentar a taxa de fosforilação desta enzima em $134,7 \pm 50,2\%$ e $120,6 \pm 27,9\%$, respectivamente, dentro de um intervalo de 5 minutos (figura 8 A). A curva dose-resposta para ERK2 indica que a estimulação máxima promovida por glutamato foi alcançada na concentração de 250 μM . Doses de glutamato como 25 ou 50 μM foram também suficientes para induzir o estímulo da fosforilação da CREB na serina 133 ($235,47 \pm 147,5\%$ e $274,64 \pm 76,14\%$ de aumento) dentro de 5 minutos de incubação (figura 7 A). A fosforilação da CREB se manteve elevada em concentrações maiores de glutamato, como por exemplo, 100 e 175 μM ($281,8 \pm 77\%$ e $295,7 \pm 79,3\%$, respectivamente), aparentemente alcançando o maior estímulo na concentração de 250 μM ($396,3 \pm 82,3\%$), o que mostra uma curva dose-resposta semelhante à da fosforilação da ERK2.



Entretanto, enquanto concentrações maiores que 250 μ M promoveram níveis mais baixos de fosforilação da ERK2, os níveis de fosfo-CREB foram mantidos em um “plateau” (figura 8 A). A cinética de fosforilação da CREB em resposta ao glutamato (figura 8 B) demonstrou que dentro do período de 2 minutos de estimulação, este aminoácido foi efetivo em promover a fosforilação da CREB. Após 5 minutos de estimulação com glutamato, um nível mais alto de fosforilação foi alcançado e este nível foi mantido até 30 minutos, retornando ao nível basal em 60 minutos (figura 8 B). Também foi avaliada a capacidade do glutamato em aumentar o conteúdo de c-fos, um gene imediato modulado por CREB. Glutamato (250 μ M) promoveu um aumento de c-fos em 2 minutos (figura 8 C).

A concentração de 250 μ M de glutamato foi escolhida para ser utilizada nos próximos experimentos, pois esta concentração estimula maximalmente a fosforilação tanto da ERK2 quanto da CREB e, em segundo lugar, porque esta concentração de glutamato é suficiente para ativar todos os três subtipos de receptores ionotrópicos de glutamato presentes, sem induzir nenhum tipo de dano celular nestas culturas mistas de células de retina. Como pode ser observado na figura 9, as células da retina em cultura não apresentaram sinais de “stress” ao tratamento agudo com 250 μ M de glutamato, levando em consideração a análise morfológica das células (D-F). Uma outra preocupação quanto à homeostase das células foi o protocolo de retirada do soro 24 horas antes do tratamento com as drogas. Este protocolo vem sendo bem tolerado por células de linhagens em cultura, não provocando a morte destas em até 48 horas de privação de soro (Oh-hashii et al., 1999).

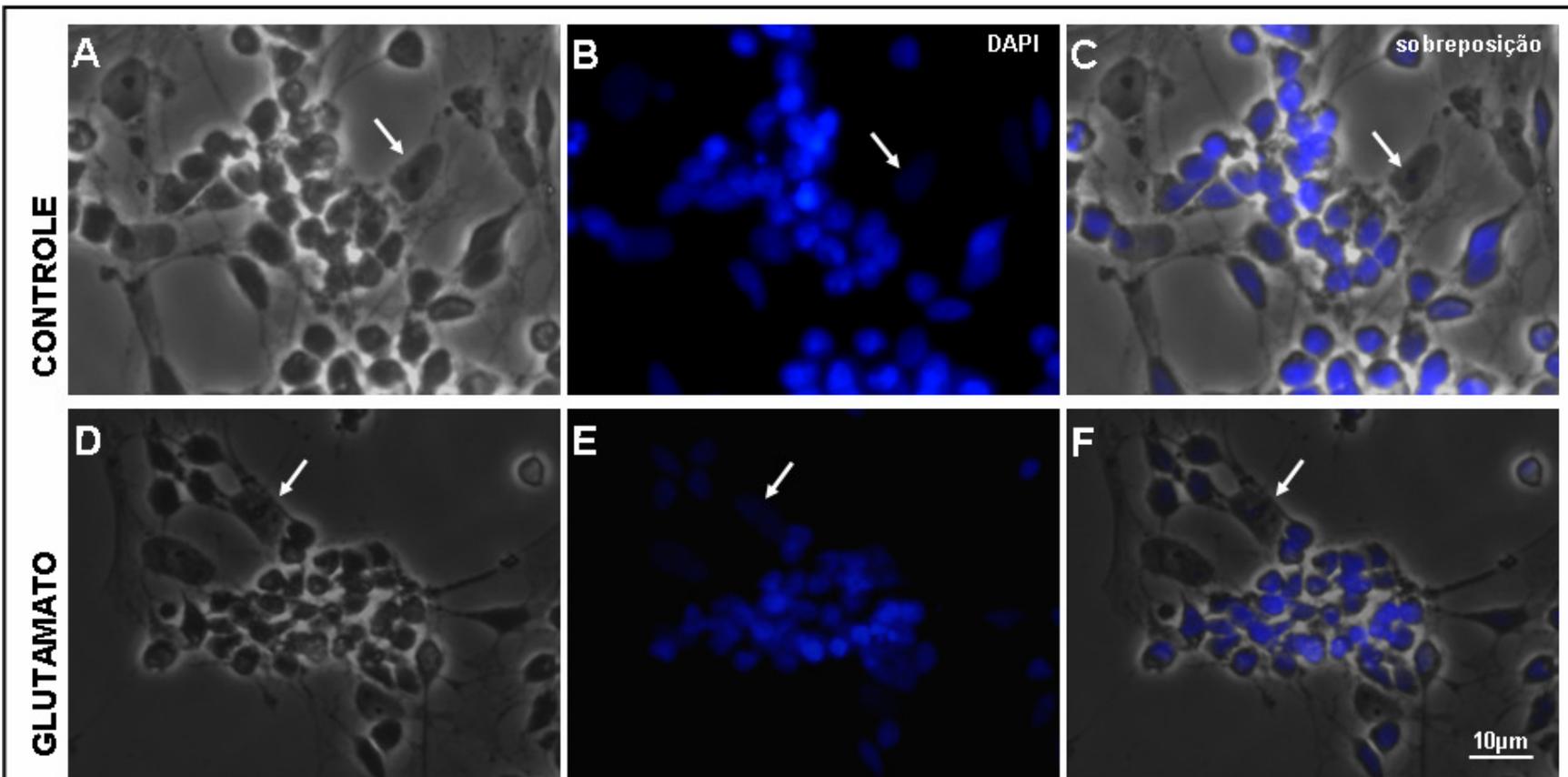


FIGURA 9: A privação de soro ou o tratamento agudo com glutamate não provoca morte celular nas culturas mistas.

Fotomicrografias das culturas controle (A-C) ou tratadas por 5 minutos com glutamate 250µM (D-F), ambas em ausência de soro por 24 horas, de C2 a C3. Em C3 as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e visualizadas em um microscópio de fluorescência. Em A e D as culturas são mostradas em contraste de fase, e tanto neurônios como células gliais (setas brancas), apresentam aspecto saudável mesmo sob o tratamento com glutamate. Em B e E os mesmos campos são visualizados em fluorescência para DAPI, evidenciando os núcleos arredondados e brilhantes de neurônios, diferentes de núcleos gliais com um padrão mais difuso de marcação (setas brancas). Dados representativos de ao menos dez experimentos diferentes; todas as fotomicrografias foram adquiridas de campos selecionados randomicamente.

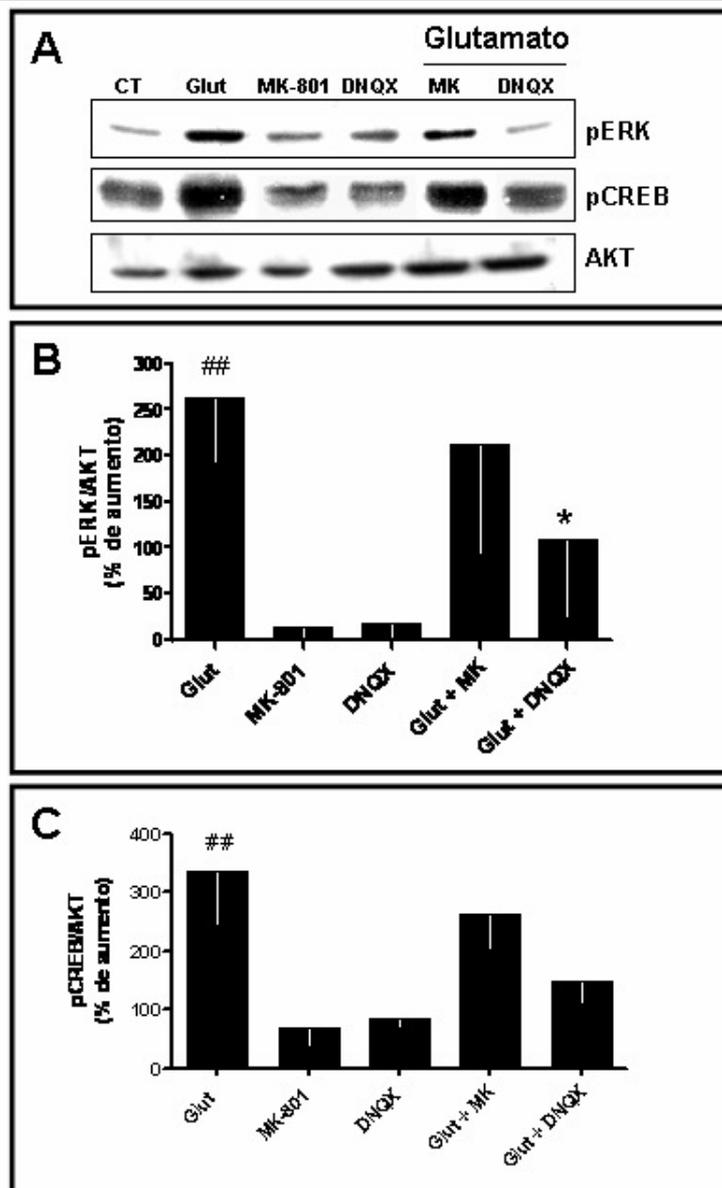


FIGURA 10: O estímulo na fosforilação de ERK e CREB por glutamato via receptores ionotrópicos. A figura mostra os blots representativos (A) e a análise densitométrica de pERK (B) e pCREB (C) em culturas mistas pré-incubadas por 2 minutos com os antagonistas do receptor NMDA MK801 (10 μ M), e de receptores do tipo AMPA/kainato DNQX (100 μ M), e então expostas ou não ao glutamato 250 μ M por 5 minutos. DNQX mostrou-se um inibidor mais potente em inibir o estímulo do glutamato na fosforilação de ERK e CREB do que o MK-801. Dados representativos de dois a três experimentos independentes \pm SEM. ## = $p < 0.01$ em relação ao controle (262.9 \pm 68.2% de aumento em ERK e 300.4 \pm 84.1% em CREB); * = $p < 0.05$ em relação ao tratamento com glutamato (109,44 \pm 83,35 % para ERK).

De fato, as células em cultura mostradas na figura 9 A-C, como nos demais experimentos, foram mantidas em meio sem soro por 24 horas e apresentaram aspecto saudável, com expansão de neuritos e sem sinais visíveis de sofrimento celular. Os dados até então apresentados mostram claramente que a estimulação das culturas com glutamato foi capaz de promover aumento da fosforilação da ERK2 e da CREB.

Em seguida decidimos investigar a participação de receptores ionotrópicos no aumento da fosforilação de ERK2 e CREB provocado por glutamato. A figura 10 mostra que o bloqueio dos canais-receptores NMDA com MK-801 (10 μ M) foi menos eficaz em bloquear a fosforilação de ambas ERK2 ou CREB induzida por glutamato. Entretanto, o antagonista de receptores AMPA/Kainato DNQX bloqueou totalmente o efeito do glutamato (figura 10). Concluímos então que o glutamato estimula a fosforilação de ERK2 e CREB nas nossas culturas através da estimulação de receptores AMPA/Kainato, e que o envolvimento dos receptores NMDA deve ser mais bem estudado.

Embora a ativação de receptores NMDA por glutamato seja uma via clássica de estímulo da NOS (Brenman e Bredt, 1997), sendo documentada inclusive na retina de galinha (Paes-de-Carvalho e de Mattos, 1996), os receptores AMPA/kainato podem também desencadear a produção de NO (Radenovic e Selakovic, 2005). Baseado nestes dados resolvemos investigar se o efeito do glutamato sobre a fosforilação de ERK2 e CREB em nosso sistema teria a participação do NO.

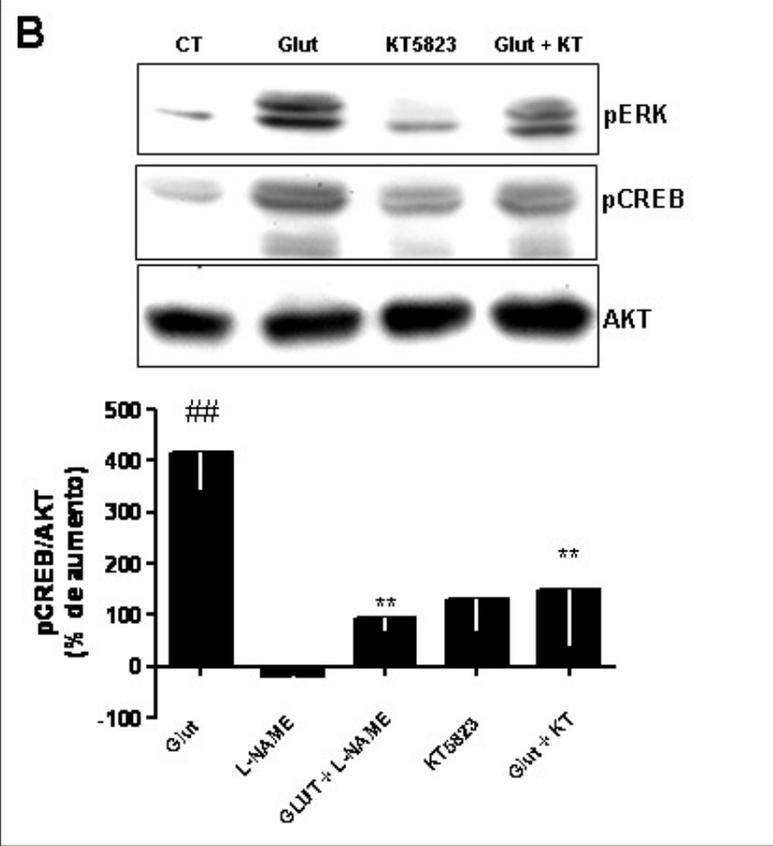
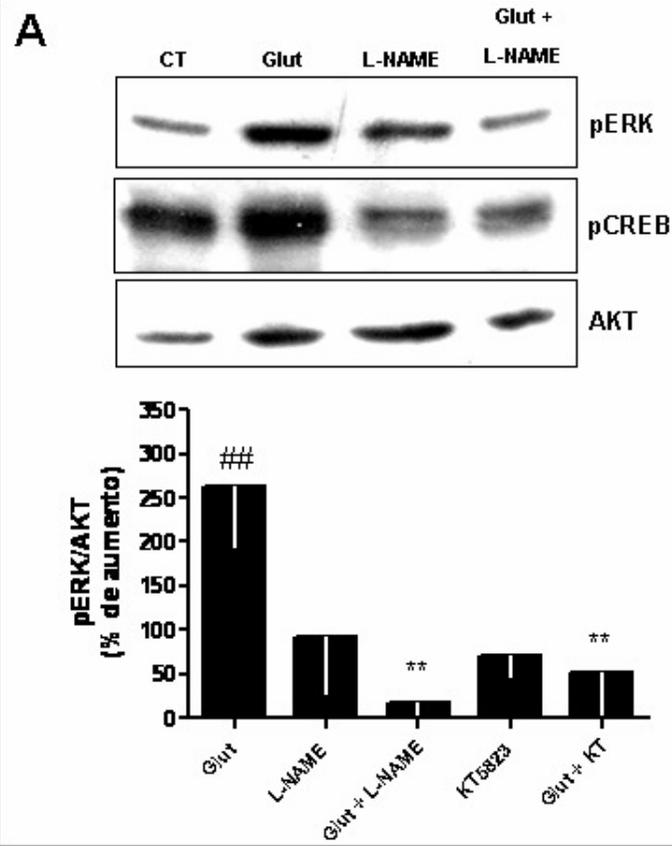


FIGURA 11: O efeito do glutamato sobre ERK e CREB requer a produção de NO e a ativação da PKG. O pré-tratamento das culturas E8/C3 com o análogo de arginina L-NAME (100µM) ou KT5823A (1µM) foi capaz de abolir o estímulo de glutamato (250µM por 5 minutos) em ERK2 (A) e CREB (B). Ambas as figuras mostram imagens representativas dos blots seguidas da análise quantitativa dos mesmos. Os dados foram obtidos em dois ou três experimentos ± SEM. ###p<0.01 (263±68.2% e 415.4±69.8% relativos ao controle) **p<0.01 (116±66.1% e 149,56±106,76% do tratamento com KT+glutamato relativos ao glutamato).

A via clássica do NO foi testada farmacologicamente ao se tratar as culturas mistas E8/C3 com o inibidor da NOS de amplo espectro L-NAME (250 μ M), e com o potente inibidor da PKG KT5823 (1 μ M), antes da adição de glutamato ao meio. Estas drogas não alteraram os níveis basais de fosforilação da ERK2 e da CREB, porém aboliram totalmente a estimulação induzida pelo glutamato (figura 11). Esses dados sugerem que, de alguma forma, os receptores AMPA/Kainato estimulam a NOS nessas culturas, mediando a ativação da ERK e da CREB através da via clássica NO/sGC/PKG.

Para verificar se o NO por si mesmo poderia modular a fosforilação da ERK e da CREB, as culturas foram tratadas com 100 μ M do doador de NO SNAP, uma concentração não tóxica há muito utilizada em nossos experimentos (Magalhães et al., 2006). A análise cinética da fosforilação da ERK2 e da CREB mostrou que dentro de cinco minutos SNAP promove um aumento do nível de fosforilação destas duas proteínas (176,5 \pm 17,8% de aumento da ERK2 e 224 \pm 43,1% da CREB), porém em menor magnitude que o glutamato. Os níveis de pERK2 se mantiveram elevados até 30 minutos de tratamento com SNAP (180,5 \pm 23,4% de aumento) retornando aos níveis basais aos 60 minutos (100,7 \pm 22,6% do controle) (figura 12 A). A cinética temporal de estimulação da CREB foi mais rápida do que a da ERK2. Aos 30 minutos de estimulação com SNAP a pCREB já havia retornado para níveis basais (110,1 \pm 13,5% do controle), que foram mantidos até 60 minutos de tratamento com SNAP (146,8 \pm 35,6% do controle) (figura 12 B). Perguntamos em seguida se a fosforilação da ERK2 e da CREB induzida por SNAP envolvia a via de ativação clássica do NO.

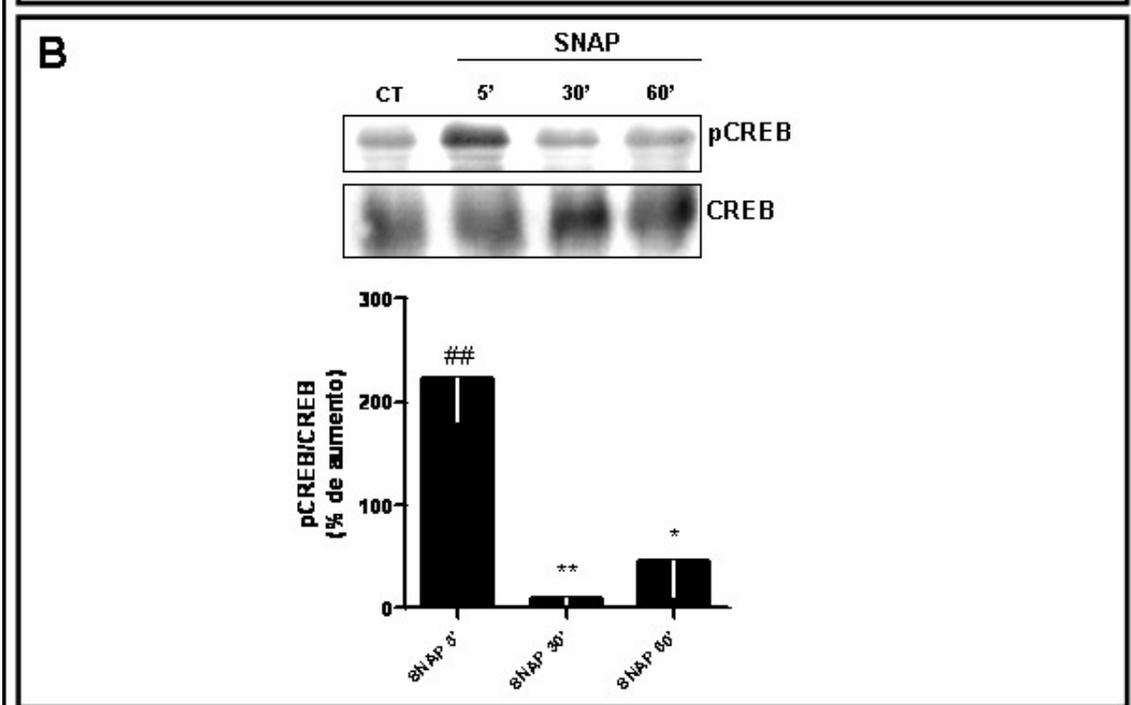
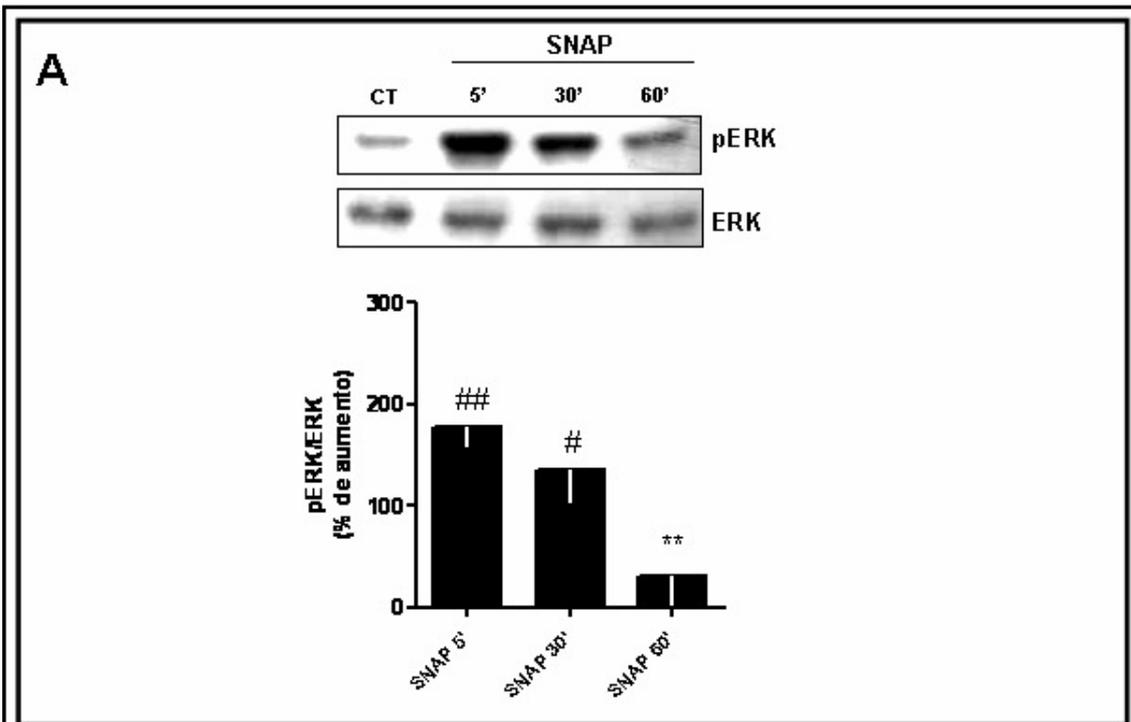
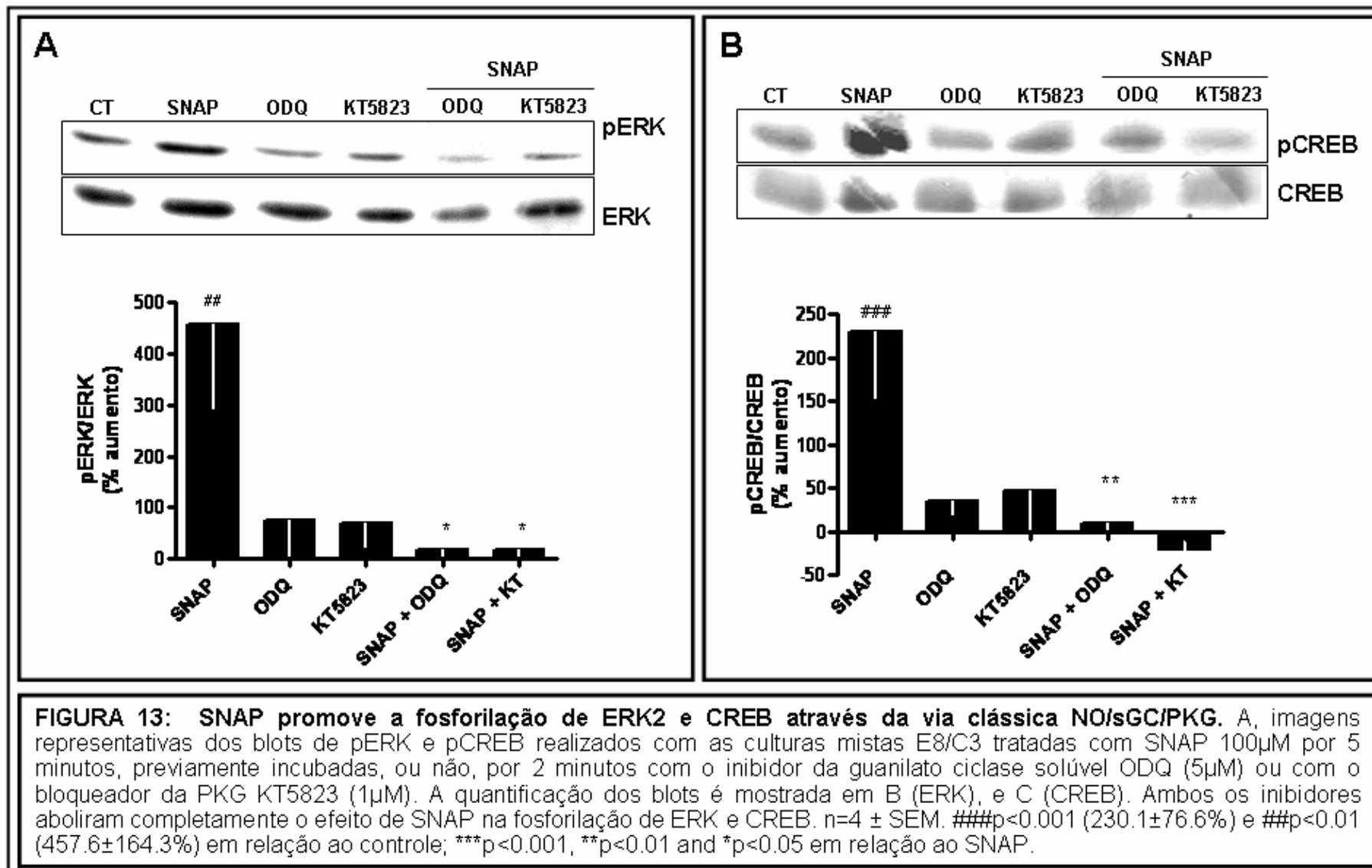


FIGURA 12: Cinética de fosforilação de ERK2 e CREB induzida por SNAP.

As culturas E8/C3 foram tratadas durante diferentes intervalos de tempo com SNAP 100µM e então processadas para western blot para pERK2 (A) e pCREB (B). Note que a fosforilação de CREB induzida por SNAP é mais breve em relação à da ERK2, declinando aos 30 minutos de incubação. Os dados apresentados foram obtidos em pelo menos cinco experimentos independentes ± SEM. ##p<0.01 e #p<0.05 em relação ao controle; **p<0.01 e *p<0.05 em relação a SNAP 5'.



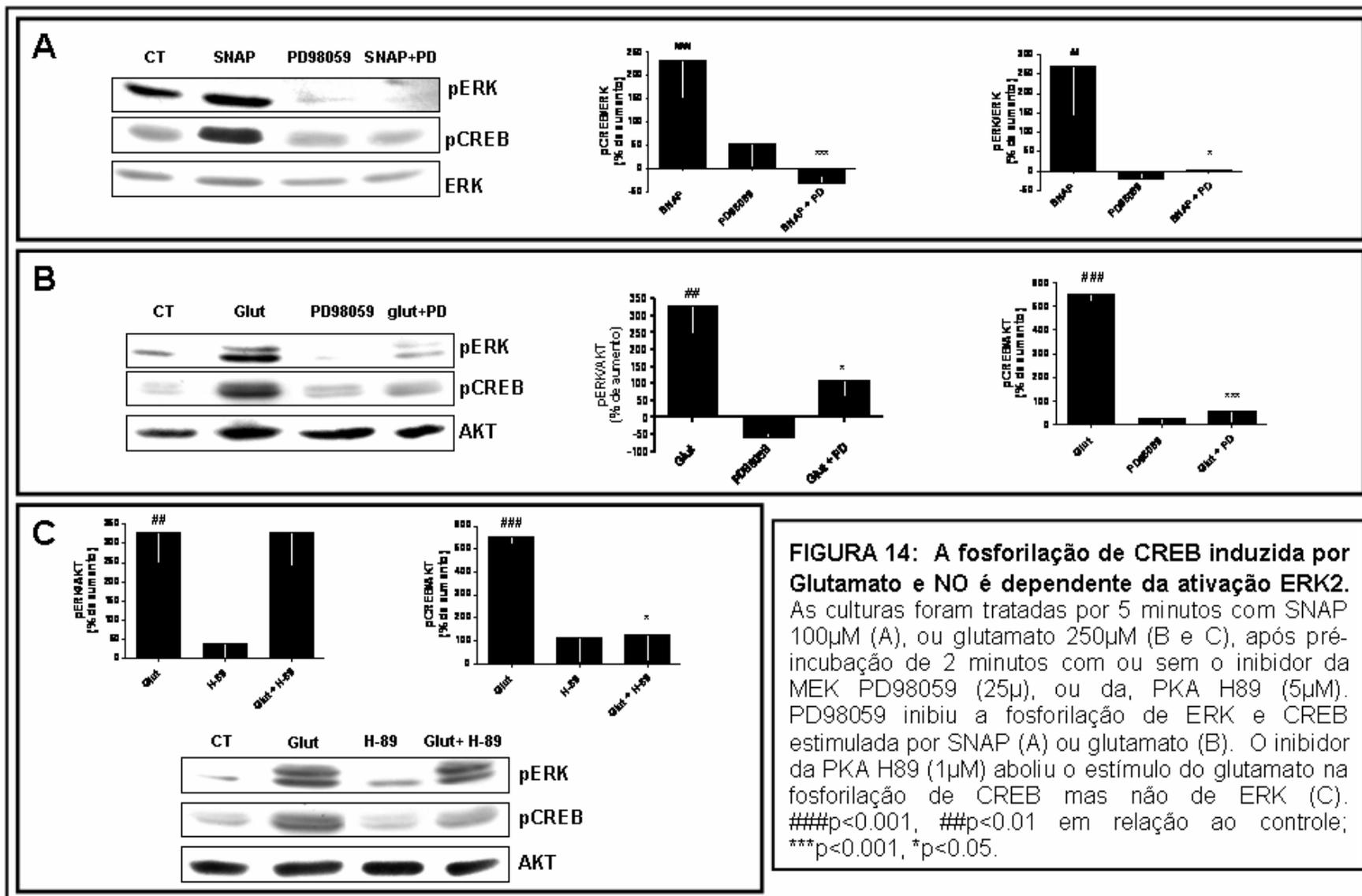
A figura 13 mostra que o bloqueio da produção de GMPc com o inibidor da guanilil ciclase solúvel ODQ (5 μ M) ou da ativação da PKG com KT5823 (1 μ M) também bloqueou a fosforilação da ERK2 (116,8 \pm 42,5% e 118,3 \pm 56,3%, respectivamente) ou da CREB (110,6 \pm 19,8% e 79,0 \pm 40,1%, respectivamente) por SNAP. Semelhantemente ao glutamato, NO exógeno é capaz de promover rapidamente a fosforilação da ERK2 e da CREB, e este efeito do NO depende da atividade da guanilil ciclase solúvel e aumento subsequente de GMPc e da atividade da PKG.

É bem conhecido que a fosforilação e ativação da CREB pode estar relacionada à via da ERK no sistema nervoso (Lee et al., 2005; Riccio et al., 2006) e em outros sistemas celulares (de Cesare et al., 1998), e que o NO modula a função da CREB em células neuronais (Ciani et al., 2002). Assim, ficamos interessados em verificar se a fosforilação da CREB poderia ser modulada pela via da ERK nas células da retina em cultura. O inibidor da MEK PD98059 foi empregado nas culturas mistas para testar essa hipótese. Como mostrado nas figuras 13 A e 13 B, o pré-tratamento por dois minutos com 25 μ M PD98059 foi capaz de inibir a fosforilação da CREB induzida tanto por SNAP quanto por glutamato, mostrando que a ativação de CREB por esses agentes é dependente da ativação da ERK.

A CREB foi identificada inicialmente como um fator de transcrição responsivo ao AMPc e à ativação da PKA (Gonzalez e Montminy, 1989). Assim, também realizamos experimentos para verificar se o efeito do glutamato na ERK2 e na CREB também era modulado pela PKA. O bloqueio da PKA foi testado com o inibidor da PKA H-89 (5 μ M), que bloqueou a fosforilação da CREB por glutamato, mas não teve nenhum efeito sobre a fosforilação da

ERK2 (figura 14 C). Nós concluímos então que o glutamato, via produção de NO e GMPc e ativação da PKG, modula a fosforilação da ERK2 e isto constitui-se em um passo para a fosforilação da CREB em resposta à ativação de receptores de glutamato.

Após a obtenção dos resultados apresentados acima, nós perguntamos se diferentes vias de sinalização poderiam estar contribuindo para o efeito do NO na fosforilação da ERK2 e da CREB. A figura 15 A mostra que diferentes vias de sinalização que classicamente levam à fosforilação da CREB, como a da PI3K/AKT, CaMKs e PKC (Yamamoto et al., 1988; Sun et al., 1994; Du e Montminy, 1998), contribuem para o efeito mediado por NO na fosforilação da CREB. Usando inibidores destas cinases (os inibidores e suas respectivas concentrações são especificados na figura 15), a fosforilação da CREB induzida por NO foi completamente inibida (figura 15 A). De modo interessante, nenhuma destas cinases participa na fosforilação da ERK2 mediada por NO (figura 15 A). A figura 15 B mostra que somente as Src cinases tem um papel na modulação da ERK2 por NO, já que, usando o inibidor destas cinases PP1, o SNAP não foi mais capaz de induzir a fosforilação da ERK2 e também da CREB. Estes resultados corroboram a idéia que múltiplas etapas da sinalização intracelular convergem e modulam a fosforilação do resíduo serina 133 da CREB na célula. Além disso, é provável que, em nosso sistema celular, todos os módulos de cinases estudados sejam necessários para a fosforilação da CREB. Entretanto, se estas cascatas de sinalização não forem concatenadas como uma rede, a ativação da CREB pode não ser alcançada.



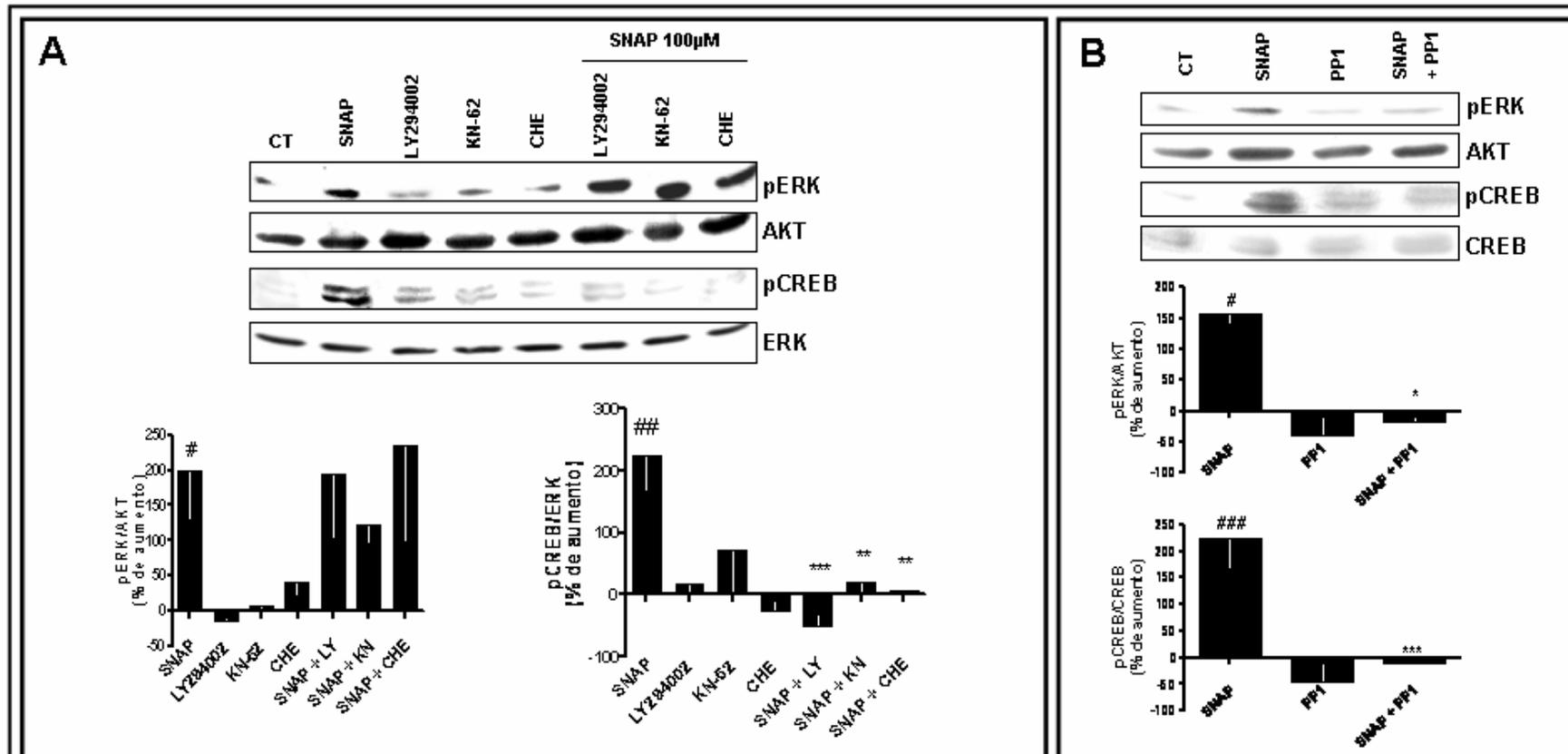


FIGURA 15: Diversas vias de sinalização estão envolvidas na fosforilação de CREB mediada por NO. As figuras A e B mostram blots representativos de pERK e pCREB, bem como a quantificação da análise densitométrica dos experimentos realizados com culturas E8/C3 estimuladas com SNAP (100µM). Em A as culturas foram previamente incubadas por 2 minutos com ou sem 10µM de LY294002 (inibidor da PI3K), ou 10µM de KN-62 (bloqueador de CaMKs), ou 10µM de cloreto de cheleritrina (CHE, inibidor de PKC); esses inibidores não afetaram significativamente a via da ERK, porém aboliram o estímulo de SNAP na pCREB. Em B as culturas foram tratadas por 2 minutos com inibitor das Src cinases PP1 (5µM), antes da adição de SNAP. N=4 ± SEM. ###p<0.001, ##p<0.01 e #p<0.05 relativo ao controle. ***p<0.001, **p<0.01 e *p<0.05 relativo ao SNAP.

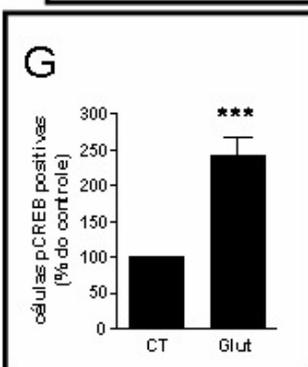
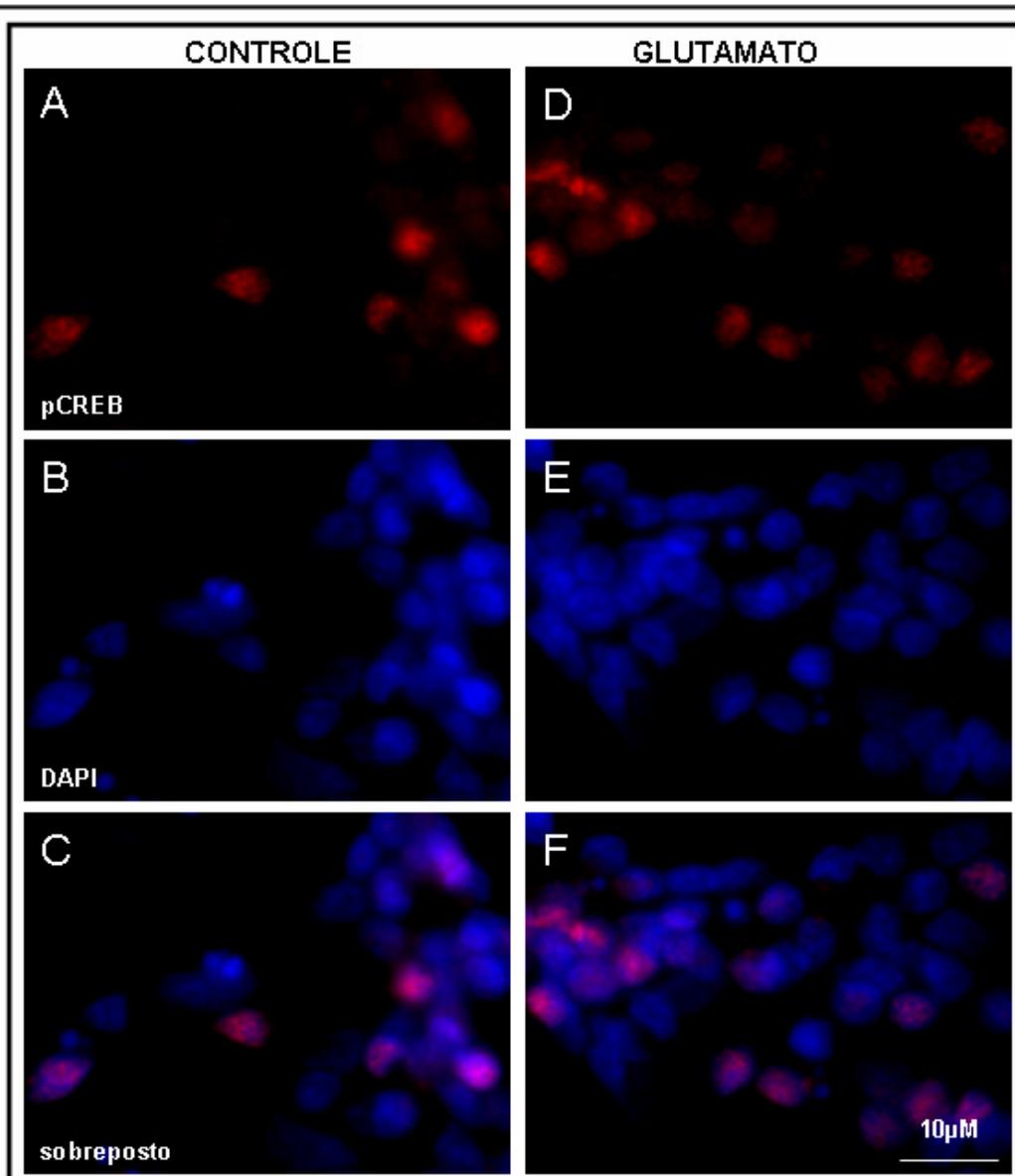


FIGURA 16: Glutamato aumenta a fosforilação da serina 133 de CREB no núcleo das células. Culturas mistas E8C3 na situação controle (A, B e C); ou tratadas com 250µM de glutamate por 5 minutos (D, E e F), foram fixadas com paraformaldeído 4%, e então processadas por imunocitoquímica. As células foram marcadas para pCREB ser133 (A e D) e com o marcador nuclear DAPI (B e E). a imunorreatividade de pCREB, restrita ao núcleo, foi bastante aumentada ao tratamento com glutamato (C e F). Esse aumento da imunorreatividade pCREB ser133 provocado por glutamato foi quantificado e mostrado na figura G. Resultados obtidos em três diferentes experimentos realizados em duplicatas. ***p<0.001 relativo ao controle. Media do número de células marcadas para pCREB por campo escolhido randomicamente: 13.1±1.8 (controle); 31.7±3.4 (glutamato).

Com o intuito de avaliar o tipo celular e a localização da fosforilação da CREB por glutamato, nós usamos um método imunocitoquímico para detectar a forma fosforilada da CREB usando um anticorpo específico para esta em conjunto com o anticorpo contra o antígeno 2M6, um marcador específico para células gliais de Muller da retina de pinto (Schlosshauer et al., 1991). Como mostrado na figura 16, na condição basal ou estimulada por glutamato a marcação para fosfo-CREB foi inteiramente restrita ao núcleo, uma característica comum a todas as células analisadas reativas para fosfo-CREB. Além disso, como previamente demonstrado pelos dados de “western blot”, 250 μ M de glutamato por 5 minutos foi capaz de induzir um aumento de mais de 2 vezes no número de células marcadas para fosfo-CREB ($241,1 \pm 26,2\%$) (figura 16 G). Usando experimentos de dupla marcação com anticorpos contra o marcador glial 2M6 e contra fosfo-CREB, nós demonstramos que o aumento da marcação da fosfo-CREB em resposta ao glutamato ocorre preferencialmente nas células duplamente marcadas, isto é, nas células gliais de Muller (figura 17). Pode-se observar que nas condições basais também ocorreu marcação para fosfo-CREB nos núcleos de alguns neurônios e células gliais (figura 17 G). Os dados quantitativos mostrados na figura 17 H demonstram que enquanto não ocorreu mudança significativa do número de núcleos neuronais marcados para fosfo-CREB (de $4,3 \pm 1,4$ para $6,2 \pm 1,9\%$), este número aumenta expressivamente nas células gliais (de $10,7 \pm 2,3$ para $30,1 \pm 3,9\%$). Concluimos que, nas culturas de células da retina de pinto, o glutamato induz a fosforilação do resíduo serina 133 da CREB nos núcleos das células gliais.

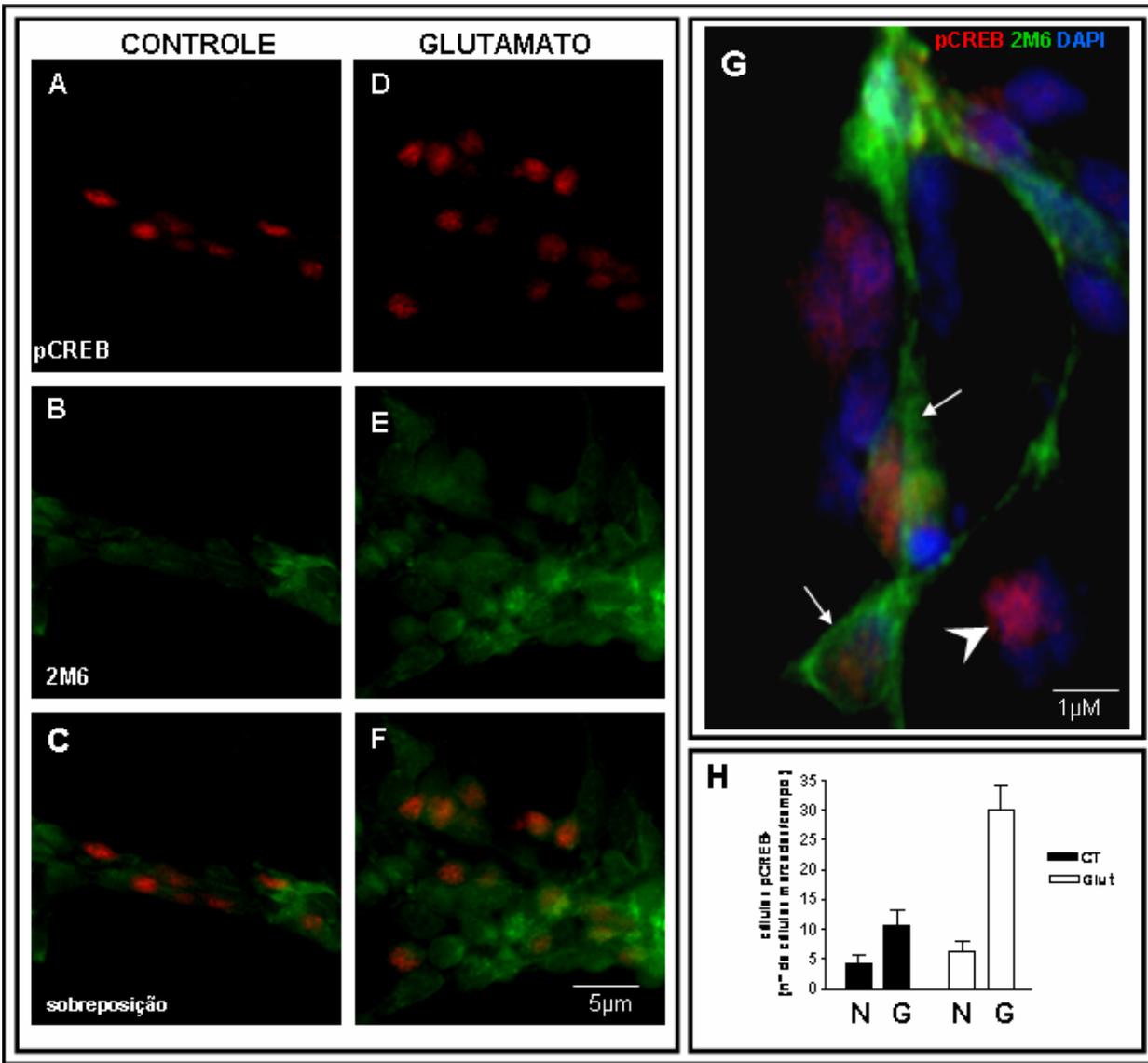


FIGURA 17: CREB é fosforilado em células glias em resposta ao glutamato. Culturas E8C3 controle (A-C) ou tratadas por 5 minutos com 250µM de glutamato (D-F). As células foram marcadas com anticorpos para pCREB ser133 e para o marcador glial 2M6. Note que o tratamento com glutamato aumenta drasticamente o número de células duplamente marcadas (F), que correspondem a células glias 2M6+. Em G, uma fotomicrografia em fluorescência de uma cultura em situação controle triplamente marcada com anticorpos para pCREB ser133 e 2M6, e o marcador nuclear DAPI. A imunorreatividade para pCREB é observada sob condições basais em neurônios (cabeça de seta), e em núcleos de células glias (setas). A quantificação de células marcadas apenas para pCREB (neurônios=N) ou duplamente marcadas (pCREB+/2M6+) que são as células glias=G. n=4 ± SEM. H) Contagem de células de 16 campos diferentes escolhidos randomicamente, para cada grupo experimental. **p<0.01 em relação ao controle de células glias.

A fosforilação da CREB induzida por glutamato nas células gliais poderia estar ocorrendo através da liberação de neurotransmissores mediada pela ativação de receptores ionotrópicos. A figura 18 A mostra que o efeito do glutamato na fosforilação da CREB não foi abolido quando as culturas foram pré-tratadas com K252a, um antagonista de receptores Trk de neurotrofinas. Então, a fosforilação da CREB estimulada por glutamato não depende de neurotrofinas que atuam via receptores TRK. Além disso, a administração direta de SNAP também induz fosforilação da CREB na presença de K252a (figura 18 B). Experimentos preliminares em que as culturas foram tratadas com brefeldina A (BFA), um bloqueador de tráfego vesicular, mostram que esta droga não foi capaz de bloquear os efeitos do glutamato e do SNAP na fosforilação da CREB, indicando que os mesmos não dependem da liberação de fatores tróficos. Estes resultados sugerem fortemente a possibilidade que o NO produzido pelos neurônios se difunda para as células gliais e induza diretamente a fosforilação da CREB nestas células.

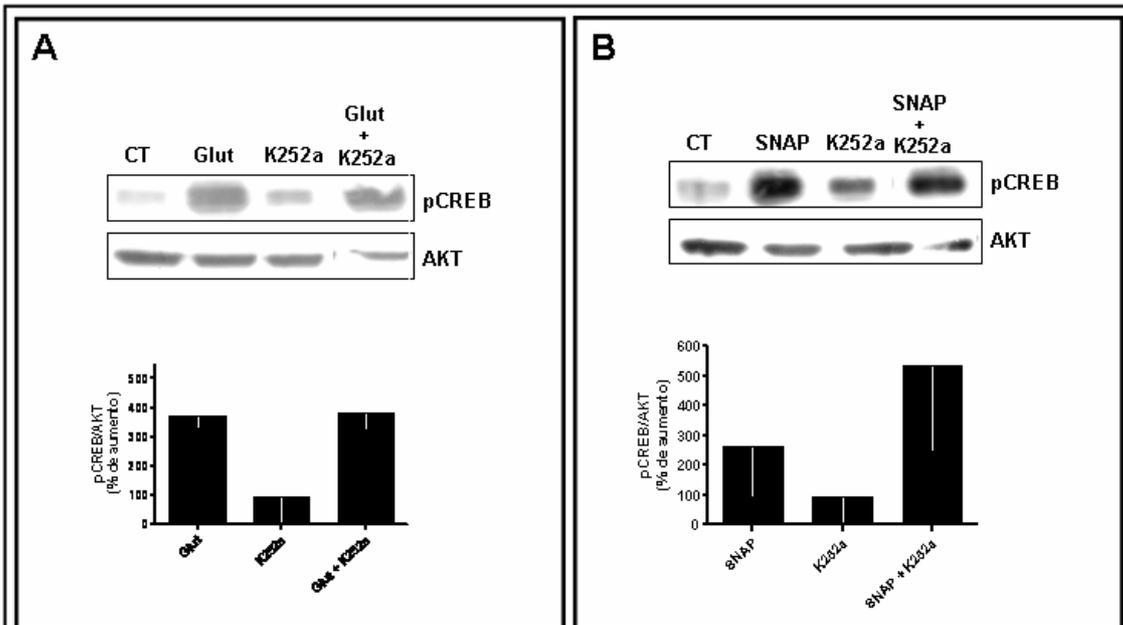


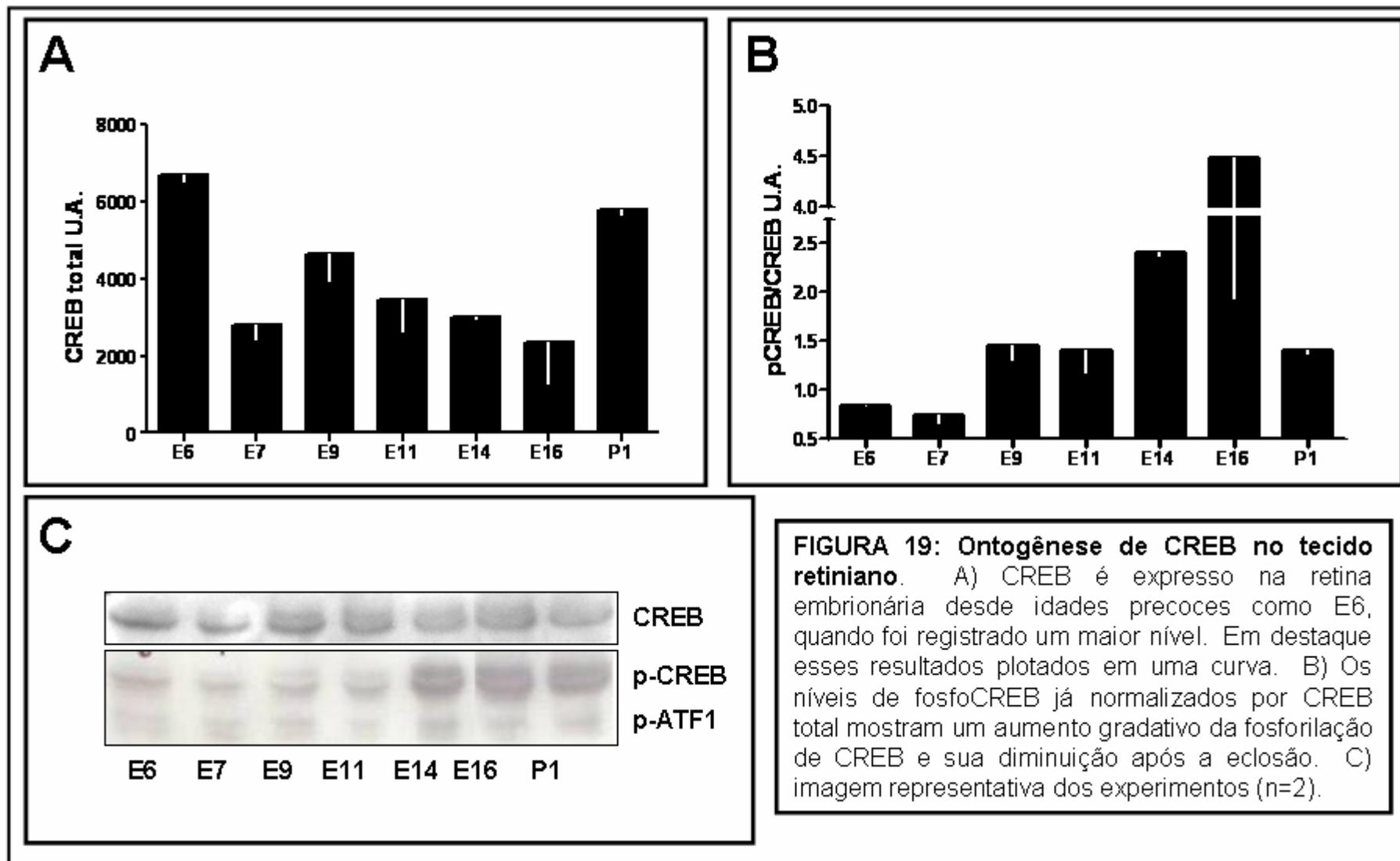
FIGURA 18: A fosforilação de CREB não é dependente da ativação de receptores Trk. Culturas mistas E8C3 foram tratadas por 2 minutos com K252a (50nM), um antagonista de receptores Trk de neurotrofinas de alta afinidade; ou com o bloqueador do tráfego vesicular intracelular brefeldina A (30ng/ml). Em seguida, foi administrado às culturas 250µM de glutamato (A) ou 100µM de SNAP (B) por 5 minutos. n=3 ± SEM.

4.2 Retina intacta:

A função de CREB ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso é pouco caracterizada até o momento. Estudos em que a atividade dos membros da família CREB foi perturbada durante o desenvolvimento e maturação, apontam para o papel de CREB no suporte à sobrevivência, proliferação e conectividade sináptica (Lonze e Ginty, 2002). CREB é expressa nas células da retina embrionária de galinha em cultura e sua atividade é modulada por glutamato e NO via GMPc, como verificamos anteriormente. Tomando como base esses achados, decidimos investigar a expressão e modulação de CREB no tecido retiniano ao longo do desenvolvimento.

Primeiramente a expressão da CREB foi caracterizada bem como sua fosforilação na serina 133 na retina embrionária em diferentes idades. Em E6 a retina de pinto ainda possui células precursoras que encontram-se dentro do ciclo mitótico e também células em fase de neurogênese (Prada et al., 1991). A expressão da proteína CREB neste estágio do desenvolvimento foi maior que nos estágios posteriores, se assemelhando mais à da retina com um dia pós eclosão (P1) (figura 19 A). Nas retinas com idade entre E7 e E16 a expressão de CREB foi menor, não mostrando grandes variações nestes períodos. Entretanto, os níveis de fosfoCREB relativos à CREB total cresceram gradativamente, alcançando um máximo em E16, caindo a um nível semelhante aos de E9 e E11 na retina pós-eclosão (figura 19 B). Na figura 19 C, observamos os blots representativos deste resultado.

Conhecendo o perfil de fosforilação de CREB na retina em diferentes estágios do desenvolvimento, decidimos estudar os mecanismos de modulação deste evento por glutamato e NO.



Foram escolhidas retinas de oito dias embrionários, que também são utilizadas para o preparo das culturas, pela facilidade de dissecção e por apresentarem fenômenos de diferenciação em detrimento da proliferação apresentada em retinas mais jovens. Também utilizamos as retinas E14 pelo fato de ser um período de intensa sinaptogênese e maior ativação de CREB, com grandes possibilidades de sua modulação por glutamato e NO. As retinas E11 foram escolhidas por estarem um estágio intermediário, além de representar o início da sinaptogênese.

Glutamato apresentou um efeito dose dependente na fosforilação de CREB em retinas E8 incubadas com este aminoácido por cinco minutos. Concentrações baixas como 50 e 100 μM de glutamato provocaram aumento de $40,5 \pm 6,5$ e $91,1 \pm 43,8$ por cento respectivamente. O efeito máximo foi obtido com 500 μM de glutamato ($126,4 \pm 36\%$ de aumento), pois a incubação com 1mM já demonstrou diminuição do efeito de fosforilação de CREB (figura 20). A produção de NO e a fosforilação de CREB desencadeada por glutamato não ficou clara neste sistema até o momento, porém a via do NO foi estudada.

A incubação das retinas E8 por cinco minutos com o doador de NO SNAP (100 μM) foi capaz de estimular em $134,36 \pm 74,06 \%$ a fosforilação de CREB. Este efeito foi totalmente abolido pelo inibidor da guanilil ciclase solúvel ODQ (10 μM) (figura 21 A). O antioxidante DTT (100 μM), utilizado com o intuito de bloquear a nitrosilação, não foi capaz de inibir o efeito de SNAP, reforçando a idéia de que NO estimula a fosforilação de CREB através de seu mecanismo clássico de ação, a via do GMPc. Nossos resultados mostram também que a fosforilação de CREB por NO na retina E8 não depende da ativação das ERKs 1/2, pois o efeito de SNAP não foi bloqueado nas retinas coincubadas com o

inibidor da MEK PD98059 (figura 21 A). Curiosamente a incubação com SNAP também provocou aumento da fosforilação de ERK nas retinas E8 ($203,47 \pm 42,56\%$ de estímulo), um efeito que envolveu ao menos parcialmente a via do GMPc, assim como observado com a fosforilação de CREB (figura 21 B).

Embora os dados referentes aos experimentos realizados em retinas E11 sejam muito preliminares, nós acreditamos que o glutamato também module a fosforilação de CREB nesta idade. A figura 22 mostra o efeito de $500\mu\text{M}$ de glutamato aumentando a fosforilação de CREB. Provavelmente este neurotransmissor atua através da produção de NO via receptores NMDA, pois a utilização do inibidor da NOS L-NAME ou do bloqueador do receptor NMDA MK801 (respectivamente $250\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$) foi capaz de inibir consideravelmente o estímulo por glutamato.

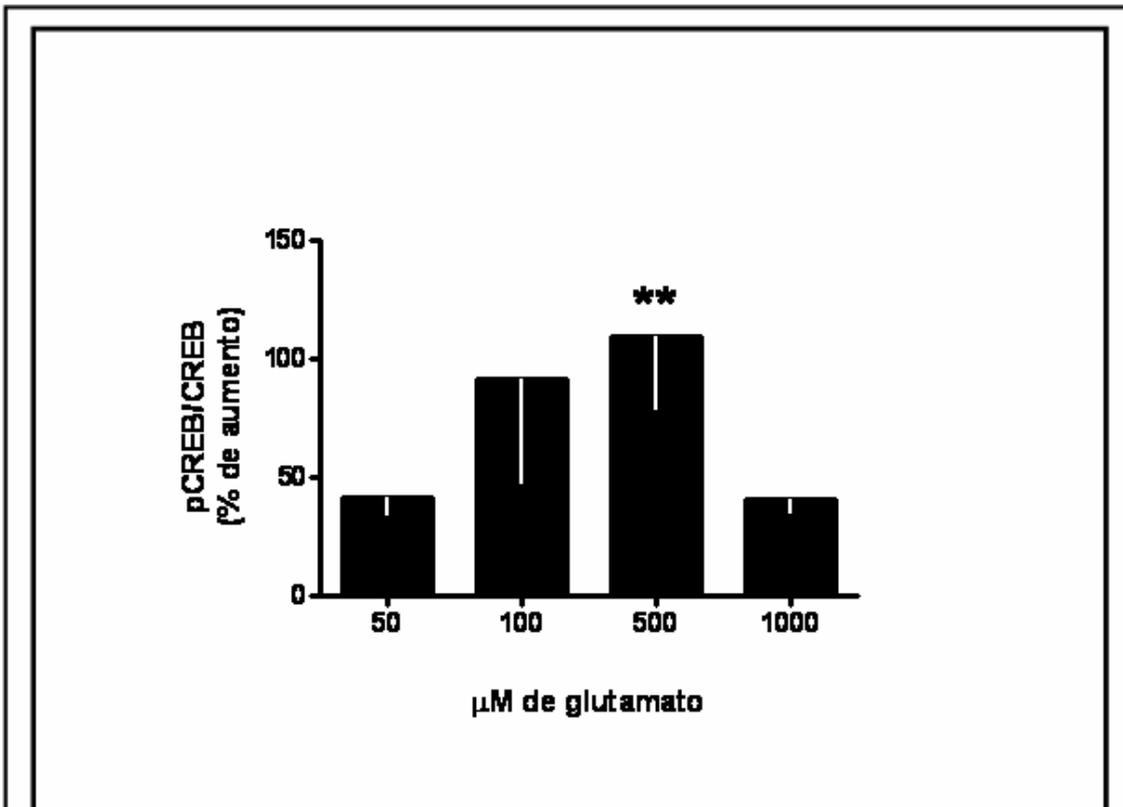


FIGURA 20: Glutamato estimula a fosforilação de CREB de maneira dose dependente. Retinas E8 foram incubadas durante cinco minutos com concentrações crescentes de glutamato, doses baixas como 50 e 100μM foram capazes de induzir a fosforilação da serina 133 de CREB. O estímulo máximo foi alcançado com 500μM. Dados obtidos de no mínimo 2 experimentos (exceto glutamato 500μM, n=5). **= $p < 0,001$.

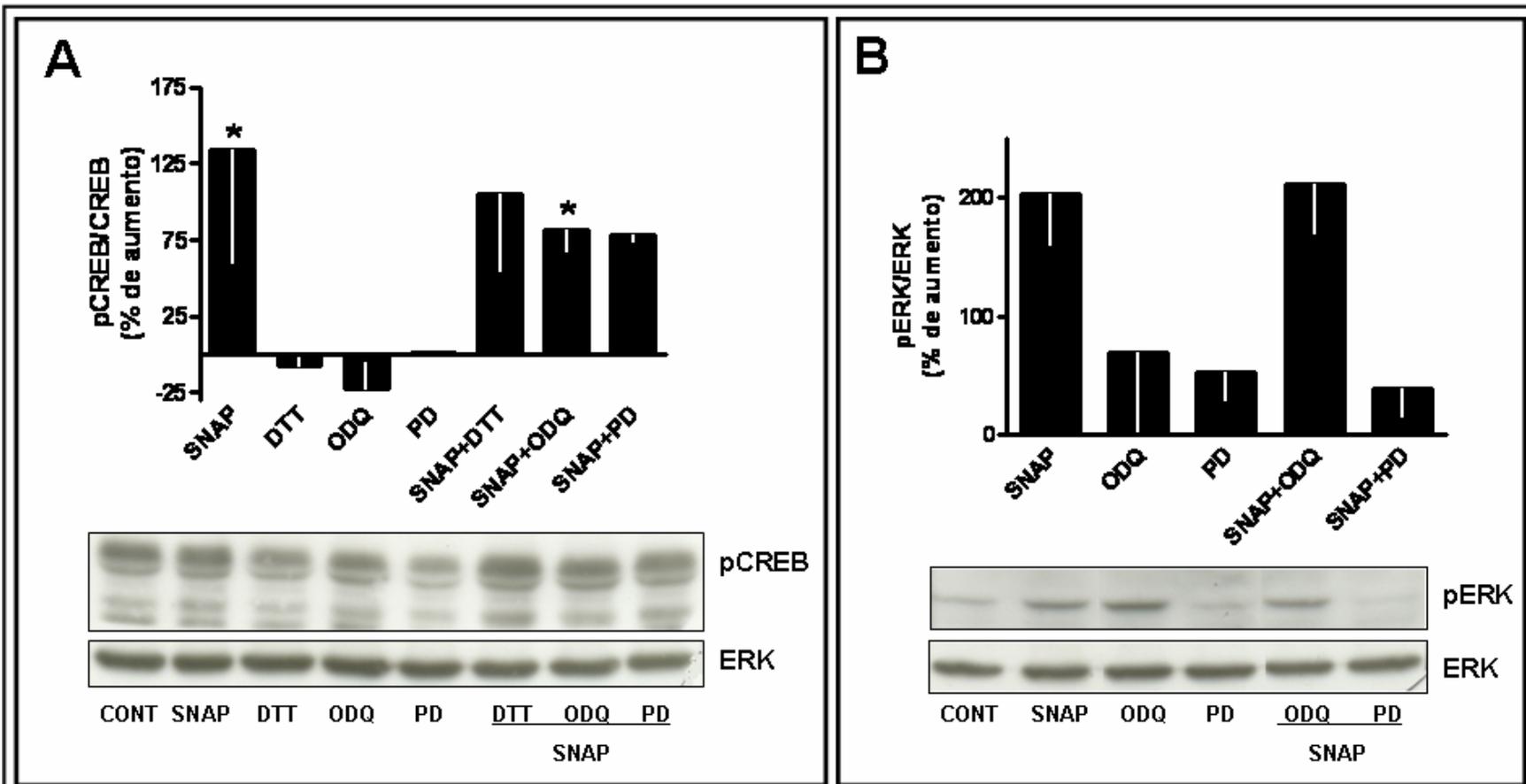


FIGURA 21: NO estimula a fosforilação de CREB e ERK na retina E8 pela via do GMPc. As retinas E8 foram incubadas em salina contendo um destes inibidores: DTT 100µM, ODQ 10µM ou PD98059 50µM, em presença ou não de 100µM do doador de NO SNAP. A)A incubação com SNAP aumenta a fosforilação de CREB sem a participação da via da ERK1/2, seu efeito é inibido apenas por ODQ. B)A ERK também é estimulada por SNAP pela via do GMPc. Resultados obtidos de no mínimo três experimentos. * = P < 0,05, controle vs. SNAP e SNAP/ODQ vs. SNAP.

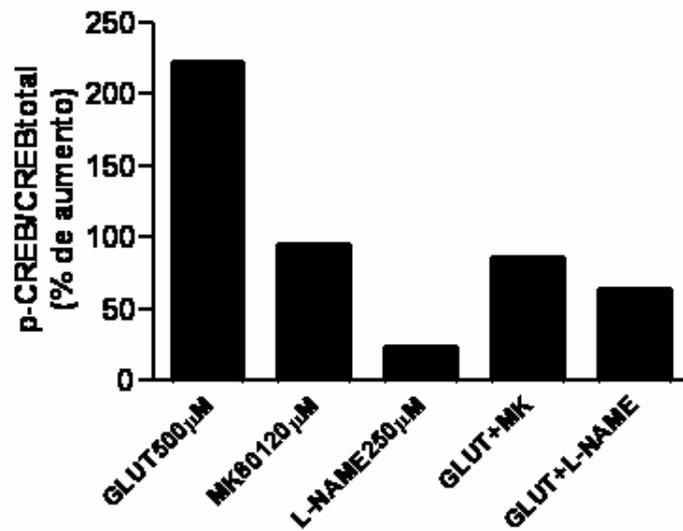


FIGURA 22: Glutamato estimula a fosforilação de CREB na retina E11 por um mecanismo envolvendo NO. As retinas foram incubadas durante 5 minutos com glutamato em presença ou não de MK801 ou L-NAME, na situação controle a retina foi incubada em salina pura. (resultado preliminar mas de grande importância).

Em E14 a retina apresentou uma fosforilação basal máxima dentre as idades investigadas (figura 19 B). A fosforilação de CREB e ERK foi refratária à incubação com SNAP em diversos tempos na retina E14 (não mostrado). Esses dados nos fizeram pensar que a fosforilação destas proteínas neste estágio estivesse maximamente estimulada, talvez por glutamato. Para verificar esta hipótese, nós utilizamos o inibidor do receptor NMDA MK801 e observamos que nestas condições ocorre uma diminuição de quase a metade da fosforilação de CREB ($46,36 \pm 6\%$) (figura 23 A). A ativação da ERK também foi semelhantemente inibida por MK801 ($60,65 \pm 20,2\%$), (figura 23 B). Empregando o inibidor de receptores Trk K252a (100nM) foi possível avaliar a participação de fatores tróficos na fosforilação tanto de CREB quanto de ERK. As figuras 23 A e B mostram que este inibidor também provoca a diminuição de ambas as fosfoproteínas (respectivamente $33,36 \pm 12$ e $53,56 \pm 26\%$).

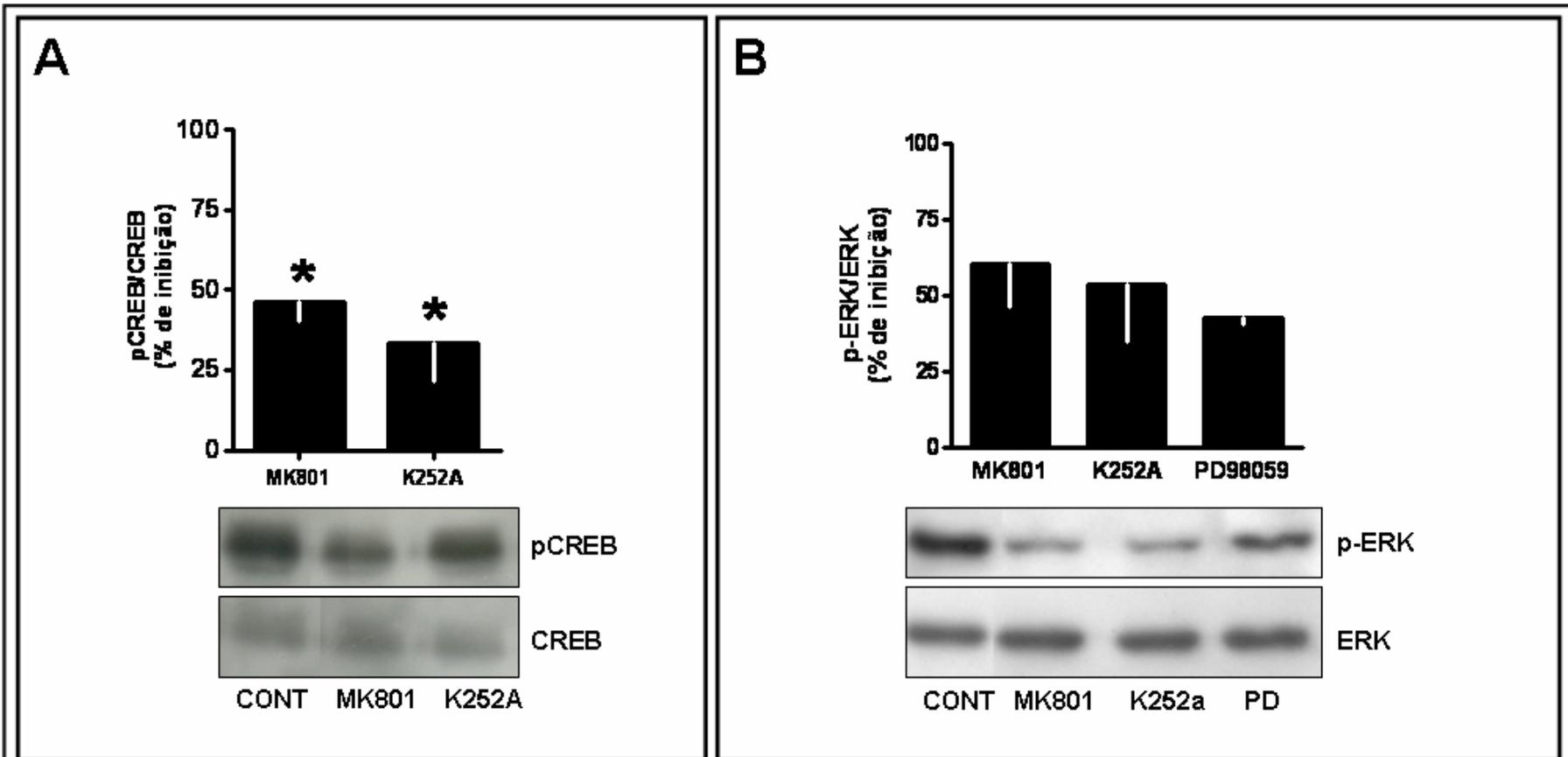


FIGURA 23: A fosforilação basal de CREB e ERK na retina E14 parece ser modulada pelo receptor NMDA e também através dos receptores tirosina cinase. As retinas foram incubadas com 10 μ M de MK801 ou 100nM de K252A, inibidores do receptor NMDA e de receptores TrK, respectivamente. Os níveis basais destas duas fosfoproteínas encontram-se mais altos neste estágio embrionário, e a incubação com estes inibidores foi capaz de inibir a fosforilação de CREB (A) e de ERK (B). O inibidor da MEK PD98059 (50 μ M) foi empregado como um controle negativo da fosforilação de ERK. N=3, **=P< 0,05 em relação ao controle.

5- Discussão

Glutamato é um neurotransmissor responsável pela mudança de potencial da célula nervosa, que é um evento essencial para a comunicação celular do sistema nervoso. A alteração na permeabilidade provocada pela ativação dos iGluRs nas células permite, por exemplo, a entrada do segundo mensageiro cálcio, seja via iGluRs ou por canais ativados por voltagem, com cinética e intensidade variadas. Por outro lado, a atuação do glutamato nos mGluRs está pouco relacionada aos eventos rápidos na sinalização sináptica, mas classicamente, estes medeiam mobilizações dos estoques intracelulares de cálcio e diminuição nos níveis de AMPc (Gerber, 2003).

Neste estudo as atenções foram voltadas para o papel dos iGluRs na fosforilação de ERK e CREB na retina de galinha em desenvolvimento. Foram empregadas células da retina mantidas em culturas, e também o tecido retiniano intacto. Nestes dois tipos de preparações observamos que o glutamato foi capaz de promover estímulo na fosforilação de CREB, e apenas nas culturas também da ERK. Foi também verificado que glutamato atuava através da produção de NO e ativação da via do GMPc. Nas culturas, esses fenômenos tiveram a participação das Src cinases. Foi também observado que a fosforilação de CREB estimulada por NO nas células em cultura contava com o envolvimento de diversas cinases como PKA, PKC, PI3K e CAMKs.

5.1 Cultura:

O aumento na fosforilação da ERK2 e da CREB nas culturas foi rápido (5 minutos de estímulo), e dependente da concentração de glutamato administrada. Entretanto, em concentrações superiores a 250 μ M de

glutamato os níveis de pCREB e pERK diminuíram. Esse perfil de diminuição ou parada do efeito do glutamato pode refletir uma diminuição da resposta dos receptores de glutamato. Dados da literatura sugeriram que altas doses de glutamato podem ser excitotóxicas para as células da retina embrionária de galinha (López-Colomé e López, 2003).

Dados anteriores do laboratório estabeleciam uma ligação entre a ativação de receptores NMDA, influxo de Ca^{++} e a ativação da NOS nas células da retina (Paes-de-Carvalho e de Mattos, 1996). De fato, nas culturas mistas de células da retina de galinha, a inibição da síntese de NO bloqueou o aumento da fosforilação de ERK2 e CREB provocadas por glutamato, sugerindo que a ativação de receptores deste aminoácido estaria ativando a NOS como um passo necessário à fosforilação de ERK2 e CREB. Surpreendentemente, o bloqueio do estímulo do glutamato na fosforilação da ERK e da CREB não foi alcançado com o antagonista do receptor NMDA MK801, enquanto a utilização de um antagonista de iGluRs do tipo AMPA/Kainato aboliu os efeitos do glutamato, indicando que seriam estes os receptores envolvidos nos dados até então comentados. A elevação da concentração intracelular de cálcio é um evento chave na ativação da NOS, classicamente atribuído ao receptor NMDA (Christopherson et al., 1999), e a ativação dos receptores NMDA foi associada ao aumento da fosforilação de CREB e ERK em outras áreas do sistema nervoso (Hardingham et al., 2001), por isso reconhecemos a importância de averiguar melhor a participação destes receptores na fosforilação de ERK e CREB em nosso sistema. Entretanto os efeitos do glutamato através da ativação dos receptores AMPA/kainato com o estímulo à produção de NO é perfeitamente plausível,

pois estes receptores foram responsáveis por estimular a NOS (Radenovic e Selakovic, 2005; Yamada e Nabeshima, 1997). Além disso, o influxo de cálcio é possível através dos receptores do tipo AMPA desde que estes não possuam em seu arranjo a subunidade GluR2 (Cull-Candy et al., 2006). Os iGluRs tipo AMPA/kainato medeiam oscilações de cálcio na retina embrionária de galinha (Sugioka et al., 1998; Catsicas et al., 2001). Uma outra possibilidade de ativação da NOS desencadeada pelos AMPA/KainatoRs seria o influxo de Ca^{++} secundário à ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem, embora esta via tenha sido descartada por alguns autores (Sugioka et al., 1998).

A inibição dos efeitos do glutamato com o bloqueio da PKG sustenta a hipótese de que o NO gerado através da ativação dos receptores AMPA/kainato atua na fosforilação de ERK2 e CREB pela via clássica de ativação da guanilato ciclase solúvel, com aumento dos níveis de GMPc que ativam a PKG. A relação entre NO e a ativação da ERK1/2 vem sendo estabelecida em vários estudos (Yamazaki et al., 2005), aparentemente através da inibição de sua defosforilação mediada pela via da PKG (Endo e Launey, 2003). É conhecido também que NO é capaz de ativar a transcrição de genes pró-sobrevida como o bcl2 através da fosforilação da serina 133 de CREB em neurônios cerebelares (Ciani et al., 2002).

O NO fornecido exogenamente também foi capaz de estimular a fosforilação de ERK2 e CREB, porém em menor magnitude que o glutamato. Isto sugere que glutamato, além da ativação da NOS, poderia agir por outras vias, através de seus receptores, ou em populações celulares diferentes da cultura. A NOS neuronal foi imunodetectada apenas em neurônios nas culturas mistas de células da retina de galinha (Cossenza e Paes-de-Carvalho, 2000), e

os diferentes tipos de receptores de glutamato estão presentes em neurônios e células gliais da retina (Lamas et al., 2005,).

A interdependência da fosforilação da serina 133 de CREB e a via das MAPKs é um evento bastante descrito no sistema nervoso (Wu et al., 2001; Hardingham et al., 2001), e que se reproduziu em nossas culturas quando estimuladas por glutamato ou NO diretamente. Os experimentos de mapeamento das vias pelas quais o NO poderia atuar na fosforilação de ERK2 e CREB revelaram a participação de várias cinases além da PKG na ativação de CREB. Este achado está de acordo com dados da literatura que afirmam que a serina 133 de CREB é alvo de fosforilação por várias cinases, consistindo em um ponto de convergência de diversas vias de sinalização (Lonze e Ginty, 2002). Neste trabalho mostramos que NO é capaz de regular algumas destas vias como da PKA, PI3K/AKT, PKC, CaMKs e das Src cinases. Dentre estas, apenas a via das Src cinases interagiu com a fosforilação de ERK mediada por NO. Especulamos que as Src cinases poderiam reforçar o sinal do NO na ERK2 em uma etapa paralela à ativação de PKG. Isto ocorreria através da autofosforilação do resíduo 416 de tirosina na Src induzida por NO, que ativa essas cinases por um mecanismo envolvendo espécies reativas do NO (Akhand et al., 1999). As Src cinases, uma vez ativadas, poderiam ser recrutadas e modular a atividade da sGC (Meurer et al., 2005) e da PKG (Lafevre-Bernt et al., 1998).

Resultados recentes de nosso grupo (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, dados não publicados) e achados em neurônios de outras áreas do sistema nervoso mostram que NO promove a ativação da AKT via PI3K (Ciani et al., 2002). Anteriormente foi demonstrado que a CREB seria um suposto alvo da

AKT (Du e Montminy, 1998). Além da AKT, a PKC, a CaMKII e a CaMKIV podem fosforilar a serina 133 de CREB (Yamamoto et al., 1988; Sun et al., 1994). Os dados comentados acima suportam a participação de todas estas cinases nos efeitos do glutamato e do NO na fosforilação da serina 133 de CREB, mostrados em nossos resultados.

Os resultados até então comentados mostram claramente que NO pode atuar na ativação de CREB via fosforilação da serina 133 por um mosaico de vias de sinalização. Porém, a inibição de qualquer uma delas foi capaz de abolir totalmente o estímulo de NO. Interessantemente, a proteção de neurônios embrionários da retina de galinha promovida por NO também depende de múltiplas vias de sinalização, integradas temporalmente (Mejía-García e Paes-de-Carvalho, 2007). Nós sugerimos que estas vias devem trabalhar de forma concatenada para que os sinais gerados nas sinapses possam alcançar o núcleo das células promovendo a ativação de CREB.

Outras etapas além da fosforilação da serina 133 são importantes na ativação da transcrição gênica por CREB. A integração fina do sinal a diferentes níveis, como por exemplo a ligação de CBP a CREB, é também regulada por diversos eventos, destacando-se a sinalização por cálcio com envolvimento das CaMKs (Deisseroth e Tsien, 2002; Kornhauser et al., 2002). Recentemente, Riccio et al. (2006) demonstraram que NO também é capaz de modular o “binding” de CREB ao DNA, um processo mediado exclusivamente por S-nitrosilação e dissociado da fosforilação da serina 133 dentro do domínio KID deste fator de transcrição. Em acordo com esses achados, em nosso modelo experimental o estímulo com glutamato parece mediar a transcrição de

c-fos, um gene imediato regulado por CREB, embora este seja um dado ainda muito preliminar, que deve ser mais bem explorado.

A localização nuclear de CREB é quase um consenso. Porém, é válido considerar que CREB já foi encontrado dentro de mitocôndrias localizadas em dendritos (Crino et al., 1998; Bevilaqua et al., 1999). Foi também recentemente demonstrada a existência de um “pool” de RNAm para CREB em terminais sinápticos que, mediante o estímulo de receptores Trk, seria traduzido em proteínas; estas translocariam para o núcleo juntamente com o receptor Trk ativando a transcrição gênica (Lin e Holt, 2008). Concordando com grande parte dos trabalhos sobre a localização subcelular de CREB (Mão et al., 2007; Kornhauser et al., 2002), a imuno-marcação de fosfo-CREB ser133 foi restrita ao núcleo das células na cultura.

A população celular predominantemente afetada pelo glutamato quanto ao aumento da fosforilação de CREB nas culturas foi a glia. De fato, receptores de glutamato são expressos nas células de Müller (Lamas et al., 2005), além de que essas células podem responder à coestimulação de NMDA e D-serina com a ativação de CREB (Lamas et al., 2007). Entretanto, nossos dados mostram que os efeitos do glutamato são dependentes da produção de NO, e estudos anteriores de nosso laboratório detectaram a NOS neuronal restrita aos neurônios deste tipo de cultura (Cossenza e Paes-de-Carvalho, 2000). Desta forma, como explicar a observação do aumento da fosforilação de CREB nas células gliais de nossas culturas? Nós perguntamos se o NO produzido através do estímulo dos receptores AMPA/Kainato estaria envolvido na liberação de substâncias difusíveis como fatores tróficos, ou se o próprio NO estaria difundindo dos neurônios alcançando as células gliais nas culturas. A

primeira hipótese foi descartada em nossos experimentos, prevalecendo a idéia de que o NO é o responsável direto pelos efeitos do glutamato nas células gliais. A presença da guanilil ciclase solúvel na glia de Müller (Kusaka et al., 1996) além do efeito do glutamato depender de GMPc corrobora essa hipótese. A ERK2 também tem sua fosforilação aumentada na glia de Müller em resposta à incubação com SNAP, o doador de NO empregado em nossos experimentos (Magalhães et al., 2006). Dados não publicados de nosso laboratório (Rodrigues, A.S. e Paes-de-Carvalho, R.) demonstram a interação da PKA e da PKC com a via das ERKs em culturas purificadas de células gliais. Embora a fosforilação da ERK2 estimulada por glutamato não seja suscetível aos inibidores destas cinases, estes dados provêm evidências da presença da PKA e da PKC na glia de Müller. Juntos, esses achados aumentam a confiabilidade da localização do efeito de glutamato na população de células gliais. Células gliais em diversas áreas do sistema nervoso contam com a participação de CREB em processos fisiológicos ou patológicos, como em astrócitos corticais onde a proliferação induzida por FGF2 é dependente da via ERK/CREB. A ativação de CREB foi também encontrada em células precursoras de oligodendrócitos e astrócitos do hipocampo sujeitos à excitotoxicidade por kainato (Ong et al., 2000). Assim como esses trabalhos, os nossos resultados demonstram a ativação de CREB na população glial, um evento potencialmente importante para a retina.

5.2 Retina intacta

CREB é expressa ao longo do desenvolvimento da retina, desde estágios embrionários precoces. Em E6 seu nível de expressão mostrou-se

elevado em relação às demais idades estudadas (com exceção da retina P1). A fosfoCREB correspondeu a $84,2 \pm 0,5\%$ da CREB total em E6, enquanto nas retinas um pouco mais amadurecidas (a partir de E9), a fosfoCREB apresenta uma tendência a ultrapassar esse valor. Acreditamos que essa grande expressão de CREB total se deva ao fato de um grande número de células progenitoras indiferenciadas expressarem CREB neste estágio do desenvolvimento, uma fosforilação basal de CREB relativamente baixa seria suficiente à atividade de proliferação. Alternativamente, essas células ainda pouco diferenciadas, poderiam não expressar uma maquinaria de transdução adequada ao estímulo de CREB. Com o amadurecimento, o número de células expressando CREB poderia diminuir. Porém, com a aquisição gradativa de fenótipos para neurotransmissores e de novas funções celulares, os níveis de fosforilação de CREB seriam mais altos. Isto é corroborado pelo fato de CREB ser um fator de transcrição conhecidamente regulado pela atividade elétrica (Lee et al., 2005; Shaywitz et al., 1999). O alto nível de fosfoCREB a partir de E14 também corrobora esta informação na retina, pois este período do desenvolvimento é caracterizado por intensa sinaptogênese (Mey e Thanos, 2000).

Como mostrado em nossos resultados, a fosforilação de CREB aumentou gradativamente com o desenvolvimento e maturação da retina. Nós acreditamos que esse fenômeno esteja atrelado a outros eventos maturacionais da retina. Na retina E8 a taxa de proliferação é baixa e quase todos os tipos celulares já “nasceram”, e estão migrando e diferenciando ao mesmo tempo (Prada et al., 1991). Em E8 é possível estimular os receptores de glutamato diretamente no tecido retiniano e verificar o estímulo da NOS

(Paes-de-Carvalho e de Mattos, 1996). Mostramos anteriormente que NO regula a proliferação in vivo na retina E8 (Magalhães et al., 2006). Nossos resultados mostraram que NO foi capaz de estimular a fosforilação de CREB na retina E8, através de um mecanismo dependente da ativação da guanilil ciclase. A fosforilação de CREB não foi revertida por DTT, um antioxidante que inibe a nitrosilação, mostrando que NO é capaz de disparar a fosforilação de CREB pela via do GMPc assim como em outros sistemas relatados na literatura (Ciani et al., 2002). A ERK também foi estimulada pelo NO pela via do GMPc, porém a inibição desta via não interferiu com o efeito do NO na CREB. A ERK pode modular a fosforilação de CREB através da ativação de cinases intermediárias, as MSKs e RSKs (Deak et al., 1998; de Cesare et al., 1998), mas os nossos resultados indicam que estas vias estão dissociadas na retina E8 quando são estimuladas por NO através de um metabólito comum. Nas culturas E8/C3 o NO também foi capaz de promover a fosforilação de ERK e CREB através da via NO/GMPc/PKG, mas ao contrário da retina E8, a fosforilação de CREB foi dependente da ERK. Embora a dependência de GMPc esteja clara nos fenômenos desencadeados por NO na retina E8, a efetiva participação da PKG não foi avaliada, e talvez esse seja um ponto chave na divergência entre a ERK e a CREB quando da ativação por NO. O glutamato também foi capaz de estimular a fosforilação de CREB na retina E8 de forma dependente da dose administrada. Porém, a dose de 1mM de glutamato já não mostrava o mesmo efeito, talvez porque, nesta concentração, o glutamato seja capaz de provocar excitotoxicidade e sua ação de uma maneira geral seja fisiologicamente inibida, como anteriormente demonstrado para a ativação dos iGluRs na síntese de NO (López-Colomé e López, 2003).

A participação de NO neste efeito de glutamato na retina E8 não foi testada, porém experimentos preliminares com a retina E11, aliados a dados anteriores (Paes-de-Carvalho e de Mattos, 1996), fornecem indícios para acreditarmos nesta hipótese. Na retina E11 o glutamato também estimula a fosforilação de CREB por um mecanismo dependente de NO e via receptores do tipo NMDA. Esses resultados preliminares nos animaram em investir na investigação do papel dos receptores ionotrópicos de glutamato na modulação de ERK e CREB na retina embrionária de galinha.

A fosforilação basal de CREB na retina E14 já se encontrava elevada como demonstrado pelo perfil da ontogênese de CREB e fosfoCREB. A fosforilação da ERK também se mostrou alta na retina E14 sem qualquer estímulo farmacológico no meio, e não apresentou alteração quando incubada com SNAP (dado não mostrado). As suspeitas de que este nível basal alto, tanto de ERK quanto de CREB, envolvesse a liberação de glutamato ou fatores tróficos se confirmou em nossos resultados, já que o tratamento das retinas E14 com o bloqueador de receptores NMDA MK801, ou com o inibidor dos receptores Trk k252A diminuiu a fosforilação basal de ERK e CREB. Os fatores tróficos e o glutamato são descritos na literatura como ativadores de CREB e ERK (Chiaramello et al., 2007; Hardingham et al., 2001). Associado a isso a retina E14 está suficientemente diferenciada expressando tanto receptores Trk e todos os tipos de GluRs, além de passar por uma fase de sinaptogênese (Mey e Thanos, 2001).

Os dados obtidos nas culturas e nas retinas apontam o envolvimento do glutamato em fenômenos maturacionais das células da retina, através da modulação da transcrição gênica. Ora nas culturas, onde as células foram

selecionadas, ora no tecido intacto, onde a integridade histológica foi mantida apesar da secção do nervo óptico, este neurotransmissor encontra-se interagindo com uma rica rede de sinalização. Os elementos desta rede podem estar presentes em células distintas, porém as interações realizadas ultrapassam suas dimensões, estabelecendo uma comunicação sincronizada. O exemplo comprovado disto em nosso trabalho foi a ativação de CREB pela via glutamato/NO nas células gliais da cultura. Cabe agora continuar as investigações no tecido retiniano, onde algumas etapas do fenômeno de fosforilação de CREB e ERK por NO e glutamato ainda encontram-se obscuras.

6- Conclusões

6.1 Culturas E8/C3:

- ❖ Glutamato estimula a fosforilação da ERK1/2 e da CREB de maneira dose-dependente.
- ❖ Os receptores AMPA/Kainato parecem ser os iGluRs responsáveis pelos efeitos do glutamato.
- ❖ O efeito do glutamato sobre a ERK1/2 e a CREB requer a produção de NO, sendo mediado pela via GCs/PKG e envolvendo também a Src cinase.
- ❖ SNAP, um doador de NO, também é capaz de estimular a fosforilação da ERK1/2 (e da CREB) pela mesma via que o glutamato.
- ❖ A fosforilação de CREB por NO envolve múltiplas vias de sinalização celular, como a PKA, CAMK e PI3K, que devem agir conjuntamente.
- ❖ A fosforilação de CREB induzida por Glutamato ou NO é dependente da ativação da via da ERK1/2.
- ❖ O estímulo da fosforilação de CREB por glutamato ocorre na população de células gliais da cultura.
- ❖ Esse efeito não parece ser dependente da liberação de fatores tróficos, e sim diretamente pelo NO que estaria difundindo dos neurônios.

6.2 Retina intacta:

- ❖ A expressão da CREB total ao longo do desenvolvimento do tecido retiniano parece oscilar de um nível alto em idades mais precoces estabilizando com a maturação do tecido .
- ❖ A fosforilação de CREB parece aumentar durante a sinaptogênese.
- ❖ O glutamato estimula a fosforilação de CREB na retina E8.
- ❖ Na retina E8, o NO também é capaz de aumentar os níveis de fosforilação de ERK e CREB pela via do GMPc.
- ❖ A fosforilação de CREB na retina E8 não é dependente da ativação de ERK.
- ❖ O glutamato parece regular a fosforilação de CREB na retina de galinha em fases distintas do desenvolvimento embrionário por mecanismos que envolvem os receptores NMDA e a síntese de NO.
- ❖ Na retina E14 a fosforilação basal da CREB e da ERK encontram-se maximamente estimuladas, e parecem ser moduladas por glutamato e fatores tróficos endógenos.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler R., Lindsey J.D., Elsner C.L. (1984). Expression of cone-like properties by chick embryo neural retina cells in glial-free monolayer cultures. *J. Cell Biol.* 99, 1173-1178.

Adler R. (2000). A model of retinal cell differentiation in the chick embryo. *Prog. Reti. Eye Res.* 19, 529-557.

Ahern G.P., Klyachko V.A., Jackson M.B. (2002). cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci.* 25, 510-507.

Ahmad I., Dooley C.M., Polk D.L. (1997). Delta-1 is a regulator of neurogenesis in the vertebrate retina. *Dev. Biol.* 185, 92-103.

Akhand A.A, Pu M., Senga T., Kato M., Suzuki H., Miyata T., Hamaguchi M., Nakashima I. (1999). Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *J Biol. Chem.* 274, 25821-25826.

Allcorn S., Catsicas M., Mobbs P. (1996). Developmental expression and self-regulation of Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors in the embryonic chick retina. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2499-24510.

Arnhold S., Fassbender A., Klinz F.J., Kruttwig K., Lohnig B., Andressen C., Addicks K. (2002). NOS-II is involved in early differentiation of murine cortical, retinal and ES cell-derived neurons: an immunocytochemical and functional approach. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20, 83-92.

Assreuy, J., Cunha, F. W., Liew, F. Y., Moncada, S. (1993). Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 108, 893.

Bapat S., Verkleij A., Post J.A. (2001). Peroxynitrite activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) via a MEK-independent pathway: a role for protein kinase C. *FEBS Lett.* 499, 21-26.

Bellamy TC, Garthwaite J. (2002). Pharmacology of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in cerebellar cells. *Br. J. Pharmacol.* 136, 95-103.

Bellamy TC, Wood J, Goodwin DA, Garthwaite J. (2000). Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2928-2933.

Bettler B., Mülle C. (1994). Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34, 123-139.

Bevilaqua L.R., Cammarota M., Paratcha G., de Stein M.L., Izquierdo I., Medina J.H. (1999). Experience-dependent increase in cAMP-responsive element

binding protein in synaptic and nonsynaptic mitochondria of the rat hippocampus. Eur. J. Neurosci. 11, 3753-3756.

Blanco, R., De la Villa, P. (1999). Ionotropic glutamate receptors in isolated horizontal cells of the rabbit retina. Eur. J. Neurosci. 11, 867-873.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brandstätter J.H., Hack I. (2001). Localization of glutamate receptors at a complex synapse. The mammalian photoreceptor synapse. Cell Tissue Res. 303, 1-14.

Bredariol A.S.S., Hamassaki-Britto D.E. (2001). Ionotropic glutamate receptors during the development of the chick retina. J. Comp. Neurol. 441, 58-70.

Bredt, D.S., Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 682-685.

Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature 351, 716-718.

Brenman J.E., Bredt D.S. (1997). Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol.* 7, 374-378.

Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D.A., Stella A.M. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 8, 766-75.

Caramelo, O.L., Santos, P.F., Carvalho, A.P., Duarte, C.B. (1999). Metabotropic glutamate receptors modulate [(3)H]acetylcholine release from cultured amacrine-like neurons. *J. Neurosci. Res.* 58, 505-514.

Carlezon W.A., Duman R.S., Nestler E.J. (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci.*, 28, 436-445.

Catsicas M., Allcorn S., Mobbs P. (2001). Early activation of Ca²⁺ permeable AMPA receptors reduces neurite outgrowth in embryonic chick retinal neurons. *J. Neurobiol.* 49, 200-211.

Chan S.H., Chang K.F., Ou C.C., Chan J.Y. (2004). Nitric oxide regulates c-fos expression in nucleus tractus solitarii induced by baroreceptor activation via cGMP-dependent protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 65, 319-325.

Chang-Ling T. (1994). Glial, neuronal and vascular interactions in the mammalian retina. *Prog. Ret. Eye Res.* 13, 357-389.

Chen P.E., Wyllie D.J.A. (2006). Pharmacological insights obtained from structure–function studies of ionotropic glutamate receptors. *Brit. J. Pharmacol.* 147, 839–853.

Chiaramello S., Dalmasso G., Bezin L., Marcel D., Jourdan F., Peretto P., Fasolo A., De Marchis S. (2007). BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1780–1790.

Christopherson K.S., Hillier B.J., Lim WA, Bredt D.S. (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem.* 274, 27467-27473.

Choi Y.B., Tenneti L., Le D.A., Ortiz J., Bai G., Chen H.S., Lipton S.A. (2000). Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci.* 3, 15-21.

Ciani E.S., Guidi S., Bartesaghi R., Contestabile A (2002) Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide. *J Neurochem.* 82, 1282-1289.

Close J.L., Gumuscu B., Reh T.A. (2005). Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development* 132, 3015-3026.

Cossenza M., Paes-de-Carvalho R. (2000). L-arginine uptake and release by cultured avian retinal cells: differential cellular localization in relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* 74, 1885-1894.

Cossenza M., Cadilhe D.V., Coutinho R.N., Paes-de-Carvalho R. (2006) Inhibition of protein synthesis by activation of NMDA receptors in cultured retinal cells: a new mechanism for the regulation of nitric oxide production. *J. Neurochem.* 97, 1481-1493.

Coulombre A.J. (1955). Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick. *Am. J. Anat.* 96,153-189.

Craig d.h., Shapman k.s., Daff s. (2002). Calmodulin activates electron transfer through neuronal nitric oxide synthase reductase domain by releasing an NADPH-dependent conformational lock. *J. Biol. Chem.* 277, 33987-33994.

Crino P, Khodakhah K, Becker K, Ginsberg S, Hemby S, Eberwine J. (1999). Presence and phosphorylation of transcription factors in developing dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2313-2318.

Cristóvão A.J., Oliveira C.R., Carvalho C.M. (2002a). Expression of AMPA/kainate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20, 1-9.

Cristovão A.J., Oliveira C.R., Carvalho C.M. (2002b). Expression of functional N-methyl-D-aspartate receptors during development of chick embryo retina cells: in vitro versus in vivo studies. *Brain Res.* 99, 125-133.

Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.

Cull-Candy S., Kelly L., Farrant M. (2006). Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 288-297.

De Cesare D., Jacquot S., Hanauer A., Sassone-Corsi P. (1998). Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 12202-12207.

de Mello M.C.F., Ventura A.L.M., Paes-de-Carvalho R., Klein W.L., de Mello F.G. (1982). Regulation of dopamine and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5708-5712.

de Mello, F.G. (1978). The ontogeny of dopamine-dependent increase of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the chick retina. *J. Neurochem.* 31, 1049-1053.

Deak M., Clifton A.D., Lucocq L.M., Alessi D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 17, 4426-4441.

Deisseroth K., Tsien R.W. (2002). Dynamic Multiphosphorylation Passwords for Activity-Dependent Gene Expression. *Neuron* 34, 179–182.

Derouiche A, Rauen T. (1995). Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J. Neurosci. Res.* 42, 131-143.

Dinerman J.L., Dawson T.M., Schell M.J, Snowman A., Snyder S.H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 4214-4218.

Du K., Montminy M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273:32377-32379.

Endo S., Launey T. (2003). Nitric oxide activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and enhances declustering of ionotropic glutamate receptor subunit 2/3 in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett.* 350, 122-126.

Ernst A.F., Wu H.H., El-Fakahany E.E., McLoon S.C. (1999). NMDA Receptor-Mediated Refinement of a Transient Retinotectal Projection during Development Requires Nitric Oxide. *J. Neurosci.*, 19, 229–235.

Ensslen S.E., Rosdahl J.A., Brady-Kalnay S.M. (2003). The receptor protein tyrosine phosphatase mu, PTPmu, regulates histogenesis of the chick retina. *Dev. Biol.* 264, 106-118.

Feelisch M. (2007). Nitrated cyclic GMP as a new cellular signal. *Nat. Chem. Biol.* 3, 687-688.

Ferreira J.M., Paes-de-Carvalho R. (2001). Long-term activation of adenosine A2a receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain Res.* 900, 169-176.

Finkbeiner S. (2000). CREB couples neurotrophin signals to survival messages. *Neuron.* 25, 11-14.

Fiol C.J., Williams J.S., Chou C.H., Wang Q.M., Roach P.J., Andrisani O.M. (1994). A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J. Biol. Chem.* 269, 32187-32193.

Fletcher E.L., Hack I., Brandstatter J.H., Wassle H. (2000). Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 420, 98-112.

Franze K., Grosche J., Skatchkov S.N., Schinkinger S., Schild D., Uckermann O., Travis K., Reichenbach A., Guck J. (2007). Müller Cells are Living Optical Fibers in the Vertebrate Retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 8287–8292.

Frödin M., Gammeltoft S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol. Cell Endocrinol.* 151,65-77.

Fujita S. Horii M. (1963). Analysis Of Cytogenesis In Chick Retina By Tritiated Thymidine Autoradiography. *Arch. Histol. Jpn.* 23, 359-366.

Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 88, 373-376.

Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams, R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336, 385-388.

Gaston B.M., Carver J., Doctor A., Palmer L.A. (2003). S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol. Interv.* 3, 253-263.

Gerber U. (2003). Metabotropic glutamate receptors in vertebrate retina. *Doc. Ophthalmol.* 106, 83–87.

Gomes A.R., Cunha P., Nuriya M., Faro C.J., Haganir R.L., Pires E.V., Carvalho A.L., Duarte C.B. (2004). Metabotropic glutamate and dopamine receptors co-regulate AMPA receptor activity through PKA in cultured chick retinal neurons: effect on GluR4 phosphorylation and surface expression. *J. Neurochem.* 90, 673–682.

Gomes A.R., Correia S.S., Esteban J.A., Duarte C.B., Carvalho, A.L. (2007). PKC anchoring to GluR4 AMPA receptor subunit modulates PKC-driven receptor phosphorylation and surface expression. *Traffic* 8, 259-269.

Gonzalez G.A., Montminy M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675-680.

Grammer T.C., Blenis J. (1997). Evidence for MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases. *Oncogene*, 14, 1635 -1642.

Grimes C.A., Jope R.S. (2001). CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3b and facilitated by lithium. *J. Neurochem.* , 78, 1219-1232.

Gründer T., Kohler K., Kaletta A., Guenther E. (2000). The distribution and developmental regulation of NMDA receptor subunit proteins in the outer and inner retina of the rat. *J. Neurobiol.* 44, 333-342.

Hardingham G.E., Arnold F.J., Gading H. (2001). calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication. *Nat. Neurosci.* 4, 565-566.

Herskowitz I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80, 187-197.

Hess D.T., Matsumoto A., Nudelman R., Stamler J.S. (2001). S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat. Cell Biol.* 3, 46-49.

Huettner JE. (2003). Spine-tingling excitement from glutamate receptors. *Sci STKE.* (210):pe53.

Hori K., Burd P.R., Furuke K., Kutza J., Weih K.A., Clouse K.A. (1999). Human immunodeficiency virus-1-infected macrophages induce inducible nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) production in astrocytes: astrocytic NO as a possible mediator of neural damage in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 93, 1843-1850.

Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M., Wood K.S. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* 61, 866-879.

Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. (1981). Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 218, 739-749.

Impey S., Wayman G., Wu Z., Storm D.R. (1994). Type I adenylyl cyclase functions as a coincidence detector for control of cyclic AMP response element-mediated transcription: synergistic regulation of transcription by Ca²⁺ and isoproterenol. *Mol. Cell Biol.* 14, 8272-8281.

Jakobs, T.C., Ben, Y. & Masland, R.H. (2007). Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types. *Mol. Vis.* 13, 933-948.

Kahn AJ.(1974) An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev Biol.* 38, 30-40.

Kalloniatis, M., Sun, D., Foster, L., Haverkamp, S. & Wassle, H. (2004). Localization of NMDA receptor subunits and mapping NMDA drive within the mammalian retina. *Vis. Neurosci.* 21, 587-597.

Kamisaki Y., Wada K., Bian K., Balabanli B., Davis K., Martin E., Behbod F., Lee Y.C., Murad F. (1998). An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11584-11589.

Kimura K.A., Reynolds J.N., Brien J.F. (1999). Ontogeny of nitric oxide synthase I and III protein expression and enzymatic activity in the guinea pig hippocampus. *Dev. Brain Res.* 116, 211-216.

Kingsbury T.J., Bambrick L.L., Roby C.D., Krueger B.K. (2007). Calcineurin activity is required for depolarization-induced, CREB-dependent gene transcription in cortical neurons. *J. Neurochem.* 103, 761–770.

Kinkl N., Sahel J., Hicks D. (2001). Alternate FGF2-ERK1/2 Signaling Pathways in Retinal Photoreceptor and Glial Cells *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* 276, 43871–43878.

Kornhauser J.M., Cowan C.W., Shaywitz A.J., Dolmetsch R.E., Griffith E.C., Hu L.S., Haddad C., Xia Z., Greenberg M.E. (2002). CREB Transcriptional Activity in Neurons Is Regulated by Multiple Calcium-Specific Phosphorylation Events. *Neuron*, 34, 221–233.

Koulen P., Brandstätter J.H. (2002). Pre- and Postsynaptic Sites of Action of mGluR8a in the Mammalian Retina. *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.* 43, 1933-1940.

Koulen P., Kuhn R., Wässle H., Brandstatter JH. (1999). Modulation of the intracellular calcium concentration in photoreceptor terminals by a presynaptic metabotropic glutamate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9909–9914.

Kreimborg K.M., Lester M.L., Medler K.F., Gleason E.L. (2001). Group I metabotropic glutamate receptors are expressed in the chicken retina and by cultured retinal amacrine cells. *J. Neurochem.* 77, 452-465.

Kubrusly R.C., Guimarães M.Z., Vieira A.P., Hokoç J.N., Casarini D.E., de Mello M.C., de Mello F.G. (2003). L-DOPA supply to the neuro retina activates dopaminergic communication at the early stages of embryonic development. *J. Neurochem.* 86, 45-54.

Kusaka S., Dabin I., Barnstable C.J., Puro D.G. (1996). cGMP-mediated effects on the physiology of bovine and human retinal Müller (glial) cells. *J Physiol.* 497, 813-824.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lamas M., Lee-Rivera I., Lopez-Colome A.M. (2005). Cell-specific expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in Muller glia and neurons from the chick retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 3570-3577.

Lamas M., Lee-Rivera I., Ramirez M., Lopez-Colome A.M (2007) d-Serine regulates CREB phosphorylation induced by NMDA receptor activation in Muller glia from the retina. *Neurosci. Lett.* 427:55-60.

Layer, P.G., Willbold, E.. (1993). histogenesis of the avian retina in reaggregation culture: from dissociated cells to laminar neuronal networks. *Int. Rev. Cytol.* 146, 1-47.

Lee B., Hoyt G.Q., Butcher K.R., Impey S., Obrietan K. (2005). Activity-Dependent Neuroprotection and cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): Kinase Coupling, Stimulus Intensity, and Temporal Regulation of CREB Phosphorylation at Serine 133. *J. Neurosci.* 25, 1137–1148.

Lee, S., Stull, J. T. (1998). Calmodulin-dependent regulation of inducible and neuronal nitric-oxide synthase.

Lafevre-Bernt M., Corbin J.D., Francis S.H., Miller W.T. (1998). Phosphorylation and activation of cGMP-dependent protein kinase by Src. *Biochim. Biophys. Acta* 1386, 97-105.

Livesey F.J., Cepko C.L. (2001). Vertebrate Neural Cell-Fate Determination: Lessons From The Retina. *Nature Rev. Neurosci.* 2, 109-118.

Lin AC, Holt CE. (2008). Outsourcing CREB translation to axons to survive. *Nat Cell Biol.* 10, 115-118.

Lolley RN. (1969). Light-induced alterations in retinal pyruvate and high-energy phosphates, in vivo. *J. Neurochem.* 16, 1469-1476.

Lonze B.E., Ginty D.D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 35, 605-623.

López-Colomé A.M., López E. (2003). Glutamate receptors coupled to nitric oxide synthesis in embryonic retina. *Dev. Neurosci.* 25, 293-300.

MacDermott A.B., Mayer M.L., Westbrook G.L., Smith S.J., Barker J.L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321, 519-522.

Magalhães C.R., Socodato R.E.S., Paes-de-Carvalho R. (2006) Nitric oxide regulates the proliferation of chick embryo retina cells by a cyclic GMP-independent mechanism. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24, 53-60.

Mao L.M., Tang Q., Wang J.Q. (2007). Protein kinase C-regulated cAMP response element-binding protein phosphorylation in cultured rat striatal neurons. *Brain Res. Bull.* 72, 302-308.

Marshall H.E., Hess D.T., Stamler J.S. (2004). S-nitrosylation: physiological regulation of NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8841-8842.

Matsui K., Hosoi N., Tachibana M. (1999). Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci.* 19, 6755-6756.

Mayr B., Montminy M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 599-609.

McMahon D.G., Schmidt K.F. (1999). Horizontal cell glutamate receptor modulation by NO: mechanisms and functional implications for the first visual synapse. *Vis. Neurosci.* 16, 425-433.

Mejía-García T.A., Paes-de-Carvalho R. (2007) Nitric oxide regulates cell survival in purified cultures of avian retinal neurons: involvement of multiple transduction pathways. *J. Neurochem.* 100, 382-394.

Meurer S., Pioch S., Gross S., Muller-Esterl W. (2005) Reactive Oxygen Species Induce Tyrosine Phosphorylation of and Src Kinase Recruitment to NO-sensitive Guanylyl Cyclase. *J. Biol. Chem.* 280, 33149-33156.

Mey J., Thanos S. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32, 343-379.

Monteiro, H.P. (2002). Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? *Free Rad. Biol. Med.* 33, 765-773.

Montminy M.R., Bilezikjian L.M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*, 328, 175-178.

Montminy M.R., Sevarino K.A., Wagnertt J.A., Mandel G., Goodman R.H. (1986). Identification Of A Cyclic-Amp-Responsive Element Within The Rat Somatostatin Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 83, 6682-6686.

Morigiwa K., Vardi N. (1999). Differential expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the outer retina. *J. Comp. Neurol.* 405, 173-184.

Nagai-Kusuhara A., Nakamura M., Mukuno H., Kanamori A., Negi A., Seigel G.M. (2007). cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuro-glial progenitor cells. *Exp. Eye. Res.* 84, 152-162.

Nakahara S., Yone K., Setoguchi T., Yamaura I., Arishima Y., Yoshino S., Komiya S. (2002). Changes in nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in spinal cord after acute traumatic injury in rats. *J. Neurotrauma* 19, 1467-1474.

Nakamura Y., Okuno T.S., Satot F., Fujisawa H. (1995). An Immunohistochemical Study Of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Iv In The Rat Central Nervous System: Light And Electron Microscopic Observations. *Neurosci.* 68, 181-194.

Nawy S. (1999). The Metabotropic Receptor mGluR6 May Signal Through Go, But Not Phosphodiesterase, in Retinal Bipolar Cells. *J. Neurosci.* 19, 2938–2944.

Newman E., Reichenbach A. (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 19, 307-312.

Newman E.A., Zahs K.R. (1998). Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J. Neurosci.* 18, 4022-4028.

Nilius B., Reichenbach A. (1988). Efficient K⁺ buffering by mammalian retinal glial cells is due to cooperation of specialized ion channels. *Pflugers Arch.* 411, 654-660.

Oh-Hashi K., Maruyama W., Yi H., Takahashi T., Naoi M., Isobe K. (1999). Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 263, 504-509.

Okada D. (1992). Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J. Neurochem.* 59, 1203-10.

Okada T., Schultz K., Geurtz W., Hatt H., Weiler R. (1999). AMPA-preferring receptors with high Ca²⁺ permeability mediate dendritic plasticity of retinal horizontal cells. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1085-1095.

Ong WY, Lim HM, Lim TM, Lutz B. (2000). Kainate-induced neuronal injury leads to persistent phosphorylation of cAMP response element-binding protein in glial and endothelial cells in the hippocampus. *Exp. Brain Res.* 131, 178-86

Paes-de-Carvalho, R. & de Mattos, J.C. (1996). Development of nitric oxide synthase in the avian retina. *Rev. Bras. Biol.* 56, 145-152.

Paes-de-Carvalho R., Dias B.V., Martins R.A., Pereira M.R., Portugal C.C., Lanfredi C. (2005). Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal cells: Possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem. Intern.* 46, 441-451.

Pagliari P. (2003). Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sci.* 73, 2137-2149.

Palmer R.M., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

Paoletti P., Neyton J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 39-47.

Papadia S., Stevenson P., Hardingham N.R., Bading H., Hardingham G.E. (2005). Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J. Neurosci.* 25, 4279-4287.

Pearson R, Catsicas M, Becker D, Mobbs P. (2002). Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *J Neurosci.* 22, 7569-7579.

Perkinton M.S., Sihra T.S., Williams R.J. (1999). Ca²⁺-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J. Neurosci* 19, 5861-5874.

Peunova N, Enikolopov G. (1993). Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* 364, 450-453.

Pin J.P., Duvoisin R. (1995). Neurotransmitter receptors I - The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions. *Neuropharmacol* 34, 1-26.

Prada C., Puga J., Pérez-Méndez L., López R., Ramírez G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur. J. Neurosci.* 3, 559-569.

Puro D.G., De Mello F.G., Nirenberg M. (1977). Synapse turnover: the formation and termination of transient synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4977-4981.

Radenovic L., Selakovic V. (2005). Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. *Brain Res. Bull.* 67, 133-141.

Rauhala P., Andohb T., Chiueh C.C. (2005). Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 91 –95.

Riccio A., Alvania R.S., Lonze B.E., Ramanan N., Kim T., Huang Y., Dawson T.M., Snyder S.H., Ginty D.D. (2006). A Nitric Oxide Signaling Pathway Controls CREB-Mediated Gene Expression in Neurons. *Mol. Cell* 21, 283-294.

Roychowdhury S., Noack J., Engelmann M., Wolf G., Horn T.F.W. (2006). AMPA receptor-induced intracellular calcium response in the paraventricular nucleus is modulated by nitric oxide: Calcium imaging in a hypothalamic organotypic cell culture model. *Nitric Oxide* 14, 290–299.

Sampaio L.F.S., Paes-de-Carvalho R. (1998). Developmental regulation of group III metabotropic glutamate receptors modulating adenylate cyclase activity in the avian retina. *Neurochem. Int.* 33, 367-374.

Santos A.E., Carvalho A.L., Lopes M.C., Carvalho, A.P. (2001). Differential postreceptor signaling events triggered by excitotoxic stimulation of different ionotropic glutamate receptors in retinal neurons. *J. Neurosci. Res.* 66, 643-655.

Savchenko A., Barnes S., Kramer R.H. (1997). Cyclic-nucleotide-gated channels mediate synaptic feedback by nitric oxide. *Nature*. 390, 694-698.

Schlosshauer B., Grauer D., Dutting D., Vanselow J. (1991) Expression of a novel Muller glia specific antigen during development and after optic nerve lesion. *Development* 111, 789-799.

Sen M., Gleason E. (2006). Immunolocalization of metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in the synaptic layers of the chicken retina. *Vis. Neurosci.* 23, 221-231.

Shaywitz A.J., Greenberg M.E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 821-861.

Shen Y., Zhang M., Jin Y., Yang X.L. (2006). Functional N-methyl-D-aspartate receptors are expressed in cone-driven horizontal cells in carp retina. *Neurosignals* 15, 174-179.

Sladeczek F., Pin J.P., Rtcasens M., Bockaert J., Weiss S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurons. *Nature* 317, 717-719.

Somohano F., Roberts P.J., López-Colomé A.M. (1988). Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. *Brain Res.* 470, 59-67.

Stuehr D.J., Kwon N.S., Gross S.S., Thiel B.A., Levi R., Nathan C.F. (1989). Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 420-426.

Sugioka M, Yamashita M. (2003). Calcium signaling to nucleus via store-operated system during cell cycle in retinal neuroepithelium. *Neurosci. Res.* 45, 447-458.

Sugioka M., Fukuda Y., Yamashita M. (1998). Development of glutamate-induced intracellular Ca²⁺ rise in the embryonic chick retina. *J. Neurobiol.* 34, 113-125.

Sun P., Enslin H., Myung P.S., Maurer R.A. (1994). Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev.* 8, 2527-2539.

Sweatt JD. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 311-317.

Takemori H., Kajimura J., Okamoto M. (2007). TORC-SIK cascade regulates CREB activity through the basic leucine zipper domain. *FEBS J.* 274, 3202-3209.

Taylor S., Srinivasan B., Wordinger R.J., Roque R.S. (2003). Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Muller cells. *Brain Res.* 111, 189-197.

Thoreson W.B., Witkovsky P. (1999). Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog. Ret. Eye Res.* 18, 765-810.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

Wong W.T., Faulkner-Jones B.E., Sanes J.R., Wong R.O. (2000). Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *J. Neurosci.* 20, 5024-5036.

Wong W.T., Wong R.O.L. (2001). Changing specificity of neurotransmitter regulation of rapid dendritic remodeling during synaptogenesis *Nat. Neurosci.* 4, 351-352.

Wang H., Pineda V.V., Chan G.C., Wong S.T., Muglia, L.J., Storm D.R. (2003). Type 8 Adenylyl Cyclase Is Targeted to Excitatory Synapses and Required for Mossy Fiber Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.*, 23, 9710 –9718.

Wässle H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 747-757.

Wu G., Deisseroth K., Tsien R.W. (2001). Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2808–2813.

www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-mbio/kennkyu.html

www.dosenation.com/listing.php?smlid=1940

Xu L., Eu J.P., Meissner G., Stamler J.S. (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 279, 234-237.

Yamada, K. & Nabeshima, T. (1997). Two pathways of nitric oxide production through glutamate receptors in the rat cerebellum in vivo. *Neurosci. Res.* 28, 93-102.

Yamagata, M. & Sanes, J.R. (1995). Lamina-specific cues guide outgrowth and arborization of retinal axons in the optic tectum. *Development* 121, 189-200.

Yamamoto K.K., Gonzalez G.A., Biggs W.H., Montminy M.R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334, 494-498.

Yamauchi T., Kashii S., Yasuyoshi H., Zhang S., Honda Y., Ujihara H., Akaike A. (2003). Inhibition of glutamate-induced nitric oxide synthase activation by dopamine in cultured rat retinal neurons. *Neurosci. Lett.* 347, 155–158.

Yamazaki M., Chiba K., Mohri T. (2005). Fundamental role of nitric oxide in neuritogenesis of PC12h cells. *Br. J. Pharmacol.* 146, 662-669.

Yang X.L. (2004). Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol.* 73,127-150.

Young R.W., Bok D. (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J. Cell Biol.* 42, 392-403.

Yun H.Y., Dawson V.L., Dawson T.M. (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10, 291-316.

Zhang Y., Coleman J.E., Fuchs G.E., Semple-Rowland S.L. (2003). Circadian oscillator function in embryonic retina and retinal explant cultures. *Brain Res.* 114, 9-19.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)