



Programa de Neuroimunologia



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

ANDREZA ROZENDO DE SOUZA

**FGFb E O CRESCIMENTO DE PROCESSOS
DAS CÉLULAS DA RETINA**

**NITERÓI
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANDREZA ROZENDO DE SOUZA

**FGFb E O CRESCIMENTO DE PROCESSOS DAS
CÉLULAS DA RETINA**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Hertha Meyer do Departamento de Neurobiologia, Programa de Neuroimunologia, Instituto de Biologia – UFF.

Dissertação de mestrado submetida à
Universidade Federal Fluminense
como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em
Neuroimunologia

Orientador: Prof^ª. ELIZABETH GIESTAL DE ARAUJO

**NITERÓI
2006**

S 729 Souza, Andreza Rozendo de
FGFb e o crescimento de processos das células da
retina/ Andreza Rozendo de Souza. – Niterói – RJ: [s.n.],
2006.
78 f.

Dissertação – (Mestrado em Neuroimunologia) –
Universidade Federal Fluminense, 2006.

1. Sistema nervoso. 2. Desenvolvimento da retina. 3.
FGFb. I. Título.

CDD 591. 188

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o sino que tine. Ainda que tivesse o Dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes e não tivesse amor, nada seria.

(Coríntios 13: 1-2)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que surgiram na minha vida, por me dar coragem e força de vontade para superar obstáculos e não temer desafios. Obrigada meu Pai por todas as graças alcançadas e todo o aprendizado que me proporcionou!

Aos meus pais, Fátima e Itanael, que são exemplo de vida e de perseverança. Obrigada por todo apoio, amor e compreensão que me deram durante a minha vida!

A minha filha, Ariel, pelo amor, carinho e por todos os sorrisos que tanto me alegam. Muito obrigada por existir, sem você não seria tão feliz! Te amo muitíssimo!

Ao meu irmão, Max Pierre, pelas conversas e conselhos. Mesmo depois de sua partida é um exemplo de inteligência e amizade.

A minha amiga, Juciléia, pelo companheirismo. Obrigada por estar por perto sempre que preciso! Te adoro!

Ao meu namorado, Leo, que enche a minha vida de felicidade. Obrigada pelo apoios, paciência e carinho. Te amo!

Aos meus amigos pelo carinho e companheirismo.

A minha orientadora Beth, mais que orientadora é um exemplo de responsabilidade, dedicação e amizade. Obrigada pela paciência, apoio e carinho!

A Carla, por ter compartilhado seus conhecimentos. Você foi uma pessoa muito importante para o meu crescimento. Obrigada pela dedicação e paciência.

A todo o pessoal do laboratório, inclusive aos técnicos, pelo carinho e companheirismo. Vocês tornam o laboratório um ambiente divertido e agradável.

SUMÁRIO

	Lista de Abreviaturas.....	vii
	Resumo.....	x
	Abstract.....	xi
1	Introdução.....	1
1.1	Histórico.....	1
1.2	FGFs no sistema nervoso.....	4
1.3	Receptores para FGF.....	6
1.4	Vias de sinalização celular mediadas por FGFs.....	13
1.5	Fator de crescimento de fibroblasto básico.....	17
1.6	Diferentes efeitos do FGFb.....	21
1.6.1	FGFb na proliferação.....	21
1.6.2	FGFb na diferenciação.....	22
1.6.3	FGFb na sobrevivência.....	24
1.6.4	FGFb na morte celular.....	25
1.7	A retina.....	26
1.8	FGF na retina.....	30
2	Objetivos.....	34
3	Materiais e métodos.....	35
3.1	Materiais.....	35
3.2	Culturas de células da retina.....	35
3.3	Contagem das células.....	36
3.4	Fotomicrografias.....	37
3.5	Análise estatísticas dos resultados.....	37
4	Resultados.....	38
5	Discussão.....	53
6	Conclusão.....	61
7	Perspectivas futuras.....	62
8	Referências bibliográficas.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPC – 3'5'adenosina monofosfato cíclico
Anti-FGFb – Anticorpo anti-FGFb
Ca²⁺ – Cálcio
ChaT – Colina acetiltransferase
CMF – Solução salina sem cálcio e magnésio
CO₂ – Dioxido de carbono
Crk – ciclina relacionada a cinase
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DI – Domínio 1 parecido com imunoglobulina
DII – Domínio 2 parecido com imunoglobulina
DIII – Domínio 3 parecido com imunoglobulina
EGF – Fator de crescimento epidermal
ERK – Cinase reguladas por sinais extracelulares
E 14 – Dia embrionário 14
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto
FGFa – Fator de crescimento de fibroblasto ácido
FGFb – Fator de crescimento de fibroblasto básico
FGF7 – Fator de crescimento de fibroblasto 7
FGF19 – Fator de crescimento de fibroblasto 19
FGFR – Receptor para FGF
FHF – Fator homólogo a FGF
FRS2 - Proteína adaptadora substrato 2 para receptor de FGF
GDP – guanosina difosfato
GFAP – proteína fibrilar ácida glial
GPI – glicosilfosfatidil inositol
Grb2 – Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento
GTP – guanosina trifosfato
HBS – sítio de ligação a heparina
HSPG – Proteoglicana sulfato de heparan
INL – Camada nuclear interna

IPL – Camada plexiforme interna
IP3 – Inositol trifosfato
 K^+ - Potássio
KDa – Quilo Dalton
LTP – Potenciação de longa duração
MAPK – Proteína cinase ativadora de mitose
MEK – Cinase ativadora da MAP cinase
mL - Mililitro
mm - Milímetro
mM - Milimolar
N – Normal
 Na^+ - Sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
NGF – Fator de crescimento do nervo
ONL – Camada nuclear externa
OPL – Camada plexiforme externa
PC-PLC – fosfolipase C específica de fosfatidil colina
PE – Epitélio pigmentado
pI – Ponto isoelétrico
PI3K – Fosfaditilinositol-3 cinase
PKC – Proteína cinase C
PLC γ - Fosfolipase C γ
P0 – Dia pós-natal 0
p75 – Receptor de baixa afinidade para NGF
Raf – Cinase que ativa a MEK
Ras – Proteína de sarcoma de rato
RGC – Camada de células ganglionares
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
Ser – Serina
SH2 – domínio homólogo a Src
SNC – Sistema nervoso central
Src – sarcoma de retina de galinha
Thr – Treonina
TRK – Tirosina cinase

U/mL – Unidades por mililitro

μL – Microlitro

μM – Micromolar

RESUMO

O fator de crescimento de fibroblasto básico desempenha um importante papel durante o desenvolvimento do sistema nervoso mediando diferentes eventos, tais como: proliferação, migração, sobrevivência e crescimento de neuritos. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do fator de crescimento de fibroblasto básico no crescimento de processos das células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura, bem como identificar as vias de sinalizações envolvidas nesse efeito. Nossos resultados demonstram claramente que o FGFb – 25ng/mL aumenta a quantidade de células com processos maiores que o corpo celular sem que haja aumento do número total de células. Os inibidores da MEK (PD 98059 - 50µM), da PI3-quinase (LY294003 - 25µM), da PKC (Cloreto de quelitrina – 1,25µM) e da Src (PP1 – 1,0µM) aboliram completamente o efeito do FGFb. Entretanto, os bloqueadores dos receptores do fator de crescimento da epiderme (tirfostina – 2,5µM), dos canais de Ca^{2+} do tipo L (nifedipina - 5µM) e o quelante de cálcio intracelular (BAPTA-AM - 20µM) não foram capazes de bloquear o crescimento de processos induzido pelo FGFb. Dado interessante é que o inibidor da via da p38 (SB 202190 - 20µM) foi capaz de aumentar também o número de células com processos e quando foi incubado com FGFb houve uma soma dos efeitos. Baseados em nossos resultados podemos concluir que há participação das vias da MEK, da PI3-quinase, da PKC e da Src no efeito do FGFb sobre o crescimento de processos de células da retina mantidas em cultura.

ABSTRACT

Basic fibroblast growth factor plays an important role during the development of the nervous system mediating different events such as proliferation, migration, survival and neurite outgrowth. The aim of this work was to analyze the effect of basic fibroblast growth factor on the outgrowth of processes from neonatal retinal cells kept in culture. We also investigated the intracellular pathways involved in this effect. Our results clearly show that 25ng/mL bFGF increases the amount of cells with process greater than cell soma but, the total number of the cells was not affected. The inhibitors of MEK (50 μ M PD98059), PI3-kinase (25 μ M LY294002), PKC (1,25 μ M queleritrine) and Src (1,0 μ M PP1) blocked completely the effect of bFGF whereas the inhibitors of epidermal growth factor receptor (2,5 μ M tyrfostin), L type Ca²⁺ channel (5,0 μ M nifedipine) and intracellular Ca²⁺ chelator (20 μ M BAPTA-AM) were not able to blocky the effect of bFGF. An interesting effect was observed when cells were treated with a p38 inhibitor (20 μ M SB 202190). This drug induced an increase in process outgrowth and when incubated with bFGF we observed a synergistic effect. Our results indicate that MEK, PI3-kinase, PKC and Src play an important role in the effect of FGFb on process outgrowth from retinal cells.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Histórico

A história do FGF (Fator de crescimento de fibroblasto) teve início em 1939 com a observação de que o extrato de cérebro bovino era capaz de promover a proliferação de fibroblastos *in vitro*. Anos depois, em 1973, foi demonstrado que o extrato de hipófise apresentava a propriedade de induzir a proliferação de fibroblastos de camundongos. Posteriormente, Gospodarowicz purificou, a partir de extrato de cérebro bovino, um fator que tinha grande afinidade pela heparina. Este fator era capaz de reproduzir o efeito do extrato de hipófise sobre a proliferação dos fibroblastos. Baseados nesta função os pesquisadores o chamaram de fator de crescimento de fibroblasto. Seu peso molecular foi determinado (17-34 KDa) e seu ponto isoelétrico conhecido (pI = 9,6). Logo a seguir um outro polipeptídeo que apresentava ponto isoelétrico ácido e que também induzia a proliferação de fibroblastos foi caracterizado. À medida que os estudos foram sendo realizados, verificou-se que existiam as duas formas do FGF, a ácida e a básica e que estes fatores agiam sobre diferentes tipos celulares, como por exemplo, neurônios, células gliais, condrócitos e células endoteliais tornando esta citocina de ação plural no organismo (Basílico e Moscatelli, 1992 para revisão) (Mohammadi *et al.*, 2005, para revisão).

A estrutura bioquímica do FGFa (fator de crescimento de fibroblasto ácido) e do FGFb (fator de crescimento de fibroblasto básico) foi conhecida em 1985. O FGFb é um polipeptídeo de 146 aminoácidos enquanto o FGFa é composto por 140 aminoácidos. Os genes para estes dois fatores foram clonados em 1986, a partir de bibliotecas de DNA complementar. Com a identificação destas moléculas e de seus genes houve um avanço nas técnicas de estudo de suas ações nos diferentes tecidos do organismo (Basílico e Moscatelli, 1992 para revisão).

Atualmente já foram descritos 23 membros pertencentes à família dos FGFs. Porém, o FGFa e o FGFb, são os elementos desta família melhor estudados. A distribuição destes fatores é bem ampla e eles estão envolvidos tanto nos fenômenos de desenvolvimento como na homeostase dos tecidos adultos. Cada membro desta família desempenha um papel específico nos tecidos alvo que apresentam receptores específicos para estes fatores (Boilly *et al.*, 2000).

Estudos filogenéticos sugeriram distribuir os membros dos FGFs em sete subfamílias: FGF-1, FGF-4, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-11 e FGF-19, cada uma contendo de dois a quatro membros (fig. 1) (Itoh e Ornitz, 2004, para revisão).

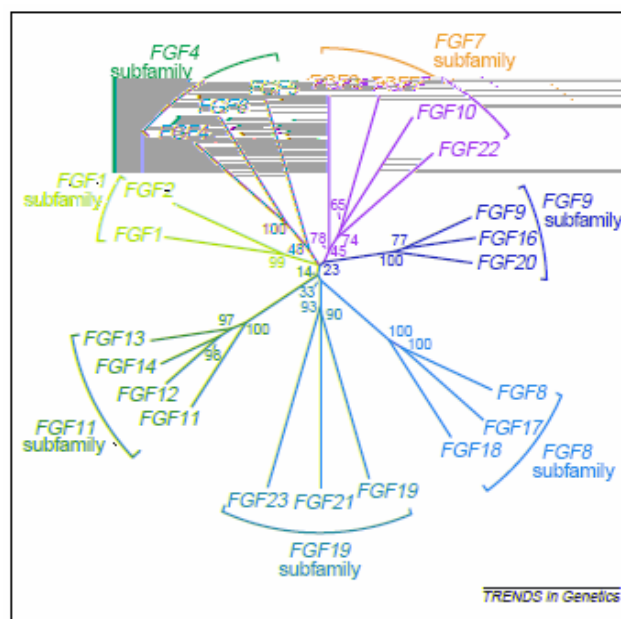


Figura 1: Relação da evolução dos genes humanos dos FGFs. A análise filogenética sugere que estes genes podem ser agrupados em sete subfamílias. O tamanho das ramificações é proporcional a distância evolutiva entre cada gene. (Itoh e Ornitz, 2004).

Ao serem estudados os processos de geração e crescimento de tumores, foi observado que eles eram acompanhados de uma expressiva angiogênese. Desta maneira, os pesquisadores voltaram seu interesse para elucidar os mecanismos através dos quais esses tumores obtinham aporte sanguíneo suficiente para manter a proliferação e a sobrevivência celular. Com avanço das pesquisas, foi observado que células tumorais eram capazes de induzir a angiogênese. A partir disso, observou-se que alguns fatores tumorais apresentavam atividade mitogênica sobre células endoteliais e tinham afinidade pela heparina. Surgiu, então, a hipótese do FGF ser um fator produzido por células tumorais. Com a continuidade das investigações demonstrou-se que tumores secretavam FGF e que esse fator estava relacionado com a angiogênese por eles apresentada (Folkman e Klagsbrun, 1987).

Outra importante área de pesquisa investiga o potencial uso dos FGFs como uma estratégia terapêutica com o objetivo de reduzir a progressão de doenças neurodegenerativas (Kinkl *et al.*, 2002).

Recentemente foi demonstrado uma família de fatores homólogos aos FGFs (FHFfs) que possuem uma seqüência marcadamente homóloga aos FGFs. Entretanto, recentes estudos bioquímicos e estruturais revelaram que FHFfs não possuem uma homologia funcional aos FGFs (Mohammadi *et al.*, 2005 para revisão).

1.2 – FGFs no sistema nervoso

No adulto, o FGFa pode ser localizado em neurônios da ponte, núcleos geniculado lateral e oculomotor, formação reticular, substância nigra, hipotálamo, tálamo, córtex cerebral e estriatum. O FGFb é expresso tanto em neurônios quanto em glia, ao contrário do FGFa, podendo ser detectado no tálamo, bulbo olfatório, córtex cerebral, colículo, substância nigra, hipocampo e estriatum (Reuss *et al.*, 2003, para revisão).

Alguns pesquisadores evidenciaram a atividade neurotrófica do FGFb utilizando cultura de neurônios corticais e hipocampais de ratos embrionários. Durante a embriogênese, o FGF participa da diferenciação do

mesoderma e do ectoderma. Este efeito lhe confere um papel chave neste período do desenvolvimento (Olwin e Hauschka, 1990).

Após lesão no tecido nervoso, ocorre normalmente a proliferação das células gliais e a subsequente formação da escara glial. Tanto o FGFa quanto o FGFb são capazes de induzir proliferação glial, sugerindo que ele possa estar envolvido no processo de formação da cicatriz glial (Mena *et al.*, 1995).

Astrócitos tratados com FGFb apresentam um aumento na síntese e na secreção de NGF, demonstrando que pode haver um mecanismo de retroalimentação positiva entre a estimulação pelo FGF e a produção de neurotrofinas (Beck, 1994). Outros autores demonstraram que o tratamento de astrócitos com FGF resulta em um aumento na proliferação e na diferenciação destas células sendo que os efeitos mitogênicos são mediados por FGFR1 (receptor 1 para FGF) (Bayatti e Engele, 2002). Células de Schwann sintetizam FGFb que se liga às HSPG (proteoglicana sulfato de heparan) presente na lâmina basal e induz a regeneração de axônios que estejam em contato com esta estrutura (Boilly *et al.*, 2000).

Tem sido demonstrada, a ação do FGF sobre diferentes células do sistema nervoso. Tanto o FGFa como o FGFb desempenham um importante papel na sobrevivência, diferenciação, crescimento e resposta à injúria em neurônios dopaminérgicos. (Mena *et al.*, 1995).

Os FGFs podem também ter uma função no aprendizado e plasticidade neuronal pelo fato do FGFb ter a capacidade de modular a transmissão sináptica, promovendo a indução de potenciação de longa duração (LTP), no hipocampo de rato adulto. Este dado sugere que o FGFb module a transmissão sináptica excitatória de forma atividade-dependente (Abe e Saito, 2001 para revisão).

Evidências recentes sugerem envolvimento de FGFs em transtornos mentais. Vários membros da família dos FGFs tem sua expressão diminuída em pessoas com depressão severa. O tratamento com antidepressivos aumenta a expressão de FGFb no hipocampo e especula-se que esse efeito possa ser um dos mecanismos de ação dessas drogas. Após estresse ou ativação experimental do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal a expressão de FGFb é aumentada no hipocampo e córtex pré-frontal, dado o efeito neuroprotetor e neurotrófico, o aumento da expressão do FGFb pode ser uma resposta fisiológica para diminuir o impacto negativo do estresse (Turner *et al.*, 2006 para revisão).

1.3 – Receptores para FGF

Existem 4 tipos de receptores de alta afinidade para FGF do tipo tirosina cinase (FGFR1-4) produzidos por genes distintos (Nugent e Iozzo, 2000 para revisão). Um quinto receptor de alta afinidade foi identificado (FGFR5), sendo expresso no cérebro, pulmões e principalmente no pâncreas. Porém, este

receptor não apresenta o domínio tirosina cinase intracelular, mas possui 32% de homologia com os outros receptores de alta afinidade e tem grande afinidade pelo FGFb, mas não pelo FGF-17 (Sleeman *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001).

Também existe uma classe de receptores de baixa afinidade, as proteoglicanas *sulfato de heparan* (HSPGs) (Boilly *et al.*, 2000 para revisão). Proteoglicanas são moléculas ubíquas e expressas na superfície celular ou secretadas como um componente da matriz extracelular. Elas tem um núcleo protéico e várias cadeias de carboidratos. O núcleo protéico pode estar ancorado a glicosilfosfatidil inositol (GPI) ou podem ser transmembrana. Os carboidratos (glicosaminoglicanas) são polímeros de dissacarídeos altamente sulfatados e de carga negativa. As principais glicosaminoglicanas encontradas nas proteoglicanas são: sulfato de heparan, sulfato de dermatam, sulfato de condroitina e heparina (Wiedlocha e Sorensen, 2004, para revisão).

O sulfato de heparan tem sítios sulfatados de forma irregular, enquanto a heparina apresenta sítios sulfatados dispostos mais uniformemente (Wiedlocha e Sorensen, 2004, para revisão).

A ligação do FGFb às HSPGs se dá de forma rápida e apresenta grande reversibilidade cinética. Tanto a matriz extracelular como a lâmina basal, funcionam como regiões de estoque e de liberação do FGFb. Na superfície celular pode haver a formação do complexo ternário (FGFR-FGFb-HSPGs), a

magnitude e o tipo de resposta celular pode depender da formação desse complexo (Fig. 2) (Nugent e Iozzo, 2000 para revisão). A ligação do FGF com HSPG protege o FGF da degradação pela temperatura, pH e proteólise. Alterações na interação entre o FGFb e as HSPGs podem induzir um aumento drástico na concentração de FGFb. Estas alterações podem ser induzidas tanto pelas heparinas como por proteases (Boilly *et al.*, 2000, para revisão).

Sabe-se que sinalização eficiente mediada pelo FGFb depende da presença de sulfato de heparan, mas esse mecanismo não está bem claro. Células que respondem ao FGFb podem não responder quando tratadas com clorato (interrompe a síntese do sulfato de heparan). Essa resposta pode ser restaurada pela adição de heparina, uma molécula produzida por mastócitos que é estruturalmente relacionada ao sulfato de heparan (Ludin *et al.*, 2003; Pye e Kumor, 1998). Tem sido atribuída uma função de co-receptor ao sulfato de heparan na sinalização iniciada pelo FGF no FGFR. Heparina e sulfato de heparan aumentam a afinidade do FGF pelo seu receptor, facilitam a dimerização e aumentam a atividade cinase do FGFR (Ludin *et al.*, 2003).

Já foi descrita a estrutura do complexo molecular de FGF-1, domínio extracelular de FGFR-2 e heparina e FGFb, domínio extracelular de FGFR-1 e heparina. Os estudos revelam que a heparina é posicionada entre os complexos FGF-FGFR, estabilizando desta maneira o dímero (Ludin *et al.*, 2003). Porém, alguns estudos demonstraram que FGFb não é completamente dependente da

heparina/sulfato de heparan para a ativação da cinase de FGFR-1. A estimulação, pelo FGFb, de células que não expressam sulfato de heparan causa ativação da ERK, porém o efeito é transiente se comparado quando a heparina é adicionada juntamente com FGFb (Delehedde *et al.*, 2000).

FGFb sozinho induz fosforilação de tirosina de certos substratos como Crk e SHP-2 e a adição de heparina não aumenta essa fosforilação. O sítio de fosforilação da tirosina que é necessário para a ligação desses substratos, o Y463, é fosforilado pela adição de FGFb. Porém, a fosforilação de tirosina de outros substratos como a PLC γ e Shb necessitam da adição de heparina. (Ludin *et al.* 2003).

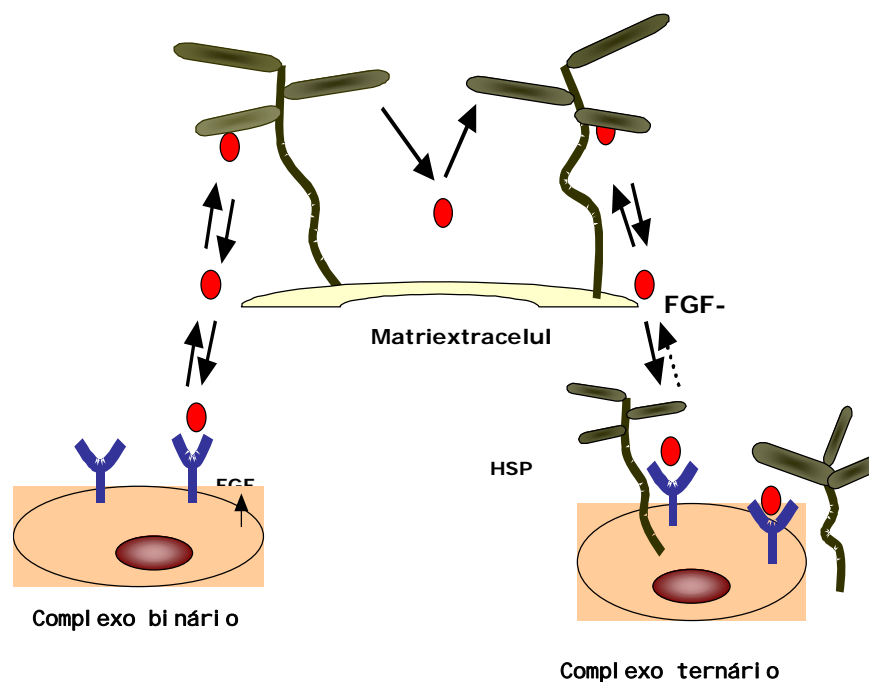


Figura 2 - Modelo de regulação do FGFb por proteoglicanas sulfato de heparan (HSPG). Através da ligação com o sulfato de heparan, o FGFb pode ser estocado na matriz extracelular ou pode formar um complexo ternário (HSPG-FGFb-FGFR). Há ainda a possibilidade do FGFb ser liberado e formar um complexo binário (FGFR-FGFb) (Nugent e Iozzo, 2000).

Os receptores de alta afinidade para FGF são proteínas transmembrana unipasso com três domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulina (DI, DII e DIII), uma parte com sete ou oito resíduos ácidos entre DI e DII denominado caixa ácida, um domínio transmembrana e um domínio tirosina cinase intracelular (Fig. 3). FGFR sem as regiões DI e a parte entre DI e DII é capaz de se ligar ao FGF e transmitir a resposta biológica, sugerindo que esses domínios extracelulares são dispensáveis para a ligação ao FGF. Em DIII, há dois “splicing” alternativos (DIIIb e DIIIc) para a segunda metade e um “splicing” (DIIIa) comum para a primeira metade de DIII. (Mohammadi *et al.*, 2005 para revisão).

Estudos de “binding” com FGF e heparina demonstraram que a afinidade de ambos é aumentada em células que expressam FGFR com deleção do domínio DI e da caixa ácida, sugerindo uma função de autoinibição desses domínios (Mohammadi *et al.*, 2005 para revisão).

Um importante aspecto dos receptores de FGF é a variedade de isoformas que são geradas por “splicing” alternativos de transcritos de FGFR. As diferentes isoformas incluem FGFR com domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulina solúveis e “splicing” alternativos em DIII que alteram profundamente a especificidade de ligação do receptor de membrana com FGF. Os “splicing” alternativos em DIII existem no FGFR1, 2 e 3, mas não no

FGFR4. As isoformas solúveis são encontradas em diversos fluidos biológicos, incluindo o sangue (Mohammadi *et al.*, 2005 para revisão)

A afinidade dos receptores para FGF pelos seus ligantes é altamente variável com diferentes afinidades para cada um dos membros da família dos FGFs (Mohammadi *et al.*, 2005, para revisão). Os receptores FGFR-1 e FGFR-2 ligam com a mesma afinidade tanto com FGFa como com FGFb. Entretanto, o FGFR-3 apresenta maior afinidade pelo FGFa. Vários membros da família do FGF podem se ligar ao FGFR-4, mas cada um destes membros também pode se ligar a outros receptores. Porém, o FGF19 é o único que se liga somente ao FGFR-4 (Boilly *et al.*, 2000).

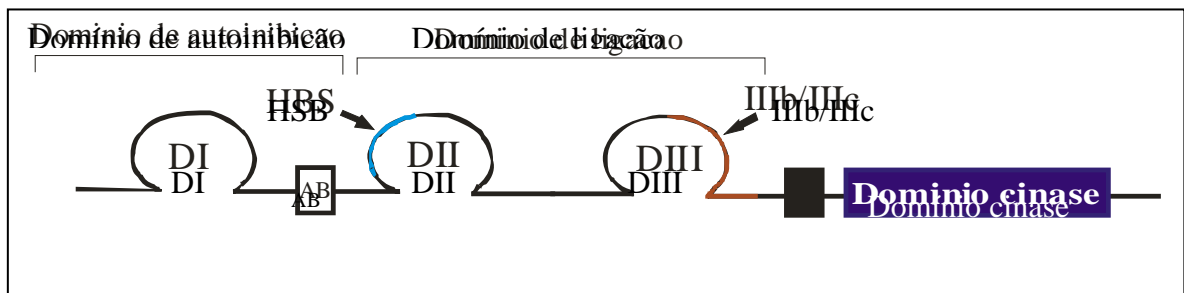


Figura 3: Esquema do Receptor para FGF (FGFR). Apresentando um sítio de ligação a heparina (HBS) em azul. A caixa ácida é representado pelo retângulo AB. O “splicing” alternativo para segunda metade do domínio DIII é colorido em vermelho. E há indicação do domínio de ligação ao FGF. Adaptado de Mohammadi *et al.*, 2005.

A dimerização induzida por ligante é um pré-requisito para a ativação dos receptores para FGFs. Alguns modelos foram propostos para explicar o mecanismo pelo qual FGF e heparina cooperam para a dimerização do

FGFR. Ornitz e colaboradores propuseram um modelo para “dimerização do FGF” onde a heparina facilita esta dimerização (Mohammadi *et al.*, 2005 para revisão).

Porém, alguns pesquisadores propuseram a formação de um complexo binário FGFb-FGFR independente da heparina e a adição desta aumentaria a afinidade do FGFb pelo receptor. Interessantemente estes autores detectaram a interação direta entre FGFR e heparina e sugeriram que um FGF interage bivalentemente com dois receptores (Mohammadi *et al.*, 2005 para revisão).

A ativação do receptor causa autofosforilação e conseqüente ativação do receptor e o recrutamento e fosforilação de moléculas de sinalização intracelulares (Reuss and Halbach, 2003, para revisão). Sete resíduos de tirosina no domínio intracelular do FGFR1 tem sido identificados como sítios potenciais de autofosforilação: Y463; Y583; Y585; Y653; Y654; Y730 e Y766. (Ludin *et al.*, 2003).

Alguns estudos demonstram que FGFRs estão presentes no cérebro de várias espécies. RNAm para FGFR 1, 2 e 3 está amplamente distribuído em neurônios cerebrais de ratos. FGFR1 e FGFR2 são expressos em astrocitomas humanos, RNAm para FGFR1 e seu produto e RNAm para FGFR3 foram detectados em células neuroepiteliais derivadas de cérebro de ratos embrionários. Mais recentemente RNAm para FGFR3 foi detectado no órgão de

Corti de ratos. FGFR1 e 2 são expressos no gânglio da raiz dorsal, e RNAm para FGFR4 foi detectado em baixa quantidade no cerebelo. Em culturas de cérebro fetal humano, neurônios expressam altos níveis dos quatro membros do FGFR enquanto astrócitos expressam principalmente FGFR4 e baixos níveis de FGFR1. Microglia expressa principalmente FGFR3 e baixos níveis de todos os outros RNAm. Por imunocitoquímica encontrou-se o FGFR1 tanto no corpo celular como em processos neuronais. Em culturas de astrócitos, observou-se fraca marcação na superfície celular em culturas de microglia somente membranas de células amebóides apresentaram-se fortemente marcadas (Gremo e Presta, 2000 para revisão).

Não se sabe se FGFRs são co-expressos em uma mesma célula ou subpopulação de células ou se cada subpopulação expressa um único tipo de receptor. (Gremo e Presta, 2000 para revisão).

1.4 – Vias de sinalização celular mediadas por FGFRs

Uma importante classe de proteínas de sinalização que conhecidamente se ligam ao complexo do receptor ativo é um grupo chamado de proteínas com domínio homólogo à Src. O aspecto comum dessas proteínas é o domínio SH2 que interage com o complexo do receptor. Proteínas que contém domínio SH2 podem apresentar atividade enzimática como a fosfolipase C γ ou podem funcionar como proteínas adaptadoras para recrutar outras proteínas alvo como a Grb2 e Shc (Reuss and Halbach, 2003, para revisão).

A enzima PLC γ é a responsável pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato em inositol-3 fosfato (IP3) e diacilglicerol. O IP3 induz a liberação de cálcio dos estoques do retículo endoplasmático e o diacilglicerol junto com a fosfatidilserina e em alguns casos o cálcio, promoverão a ativação da PKC (Fig. 4). (Nugent e Iozzo, 2000 para revisão).

A proteína Ras é ativada a partir da formação do complexo Grb2-Sos. Depois de ativada, a Ras estimula a cascata da MAP cinase que envolve as proteínas Raf, MEK e as isoformas ERK1/2 (Fig. 4). A sinalização via Ras é crucial para a proliferação celular, induzida pelo FGF, em diferentes populações celulares. Entretanto, nem sempre os efeitos proliferativos são mediados pela via da MAP cinase. Já foi demonstrado que o efeito proliferativo do FGF pode envolver a ativação das proteínas cinase C e da proteína PI3 cinase (Boilly *et al.*, 2000 para revisão).

Um aspecto único relativo a sinalização promovida pelo FGF é o recrutamento de moléculas de sinalização para o FGFR através da proteína adaptadora substrato 2 para receptor de FGF (FRS2). FRS2 se associa diretamente com FGFRs e aumenta a fosforilação de tirosina durante a sinalização do FGFR. Tem a função de recrutar proteínas com domínio SH2, como Grb2 estimulando uma variedade de vias de sinalização (Fig. 4). FRS2 exhibe uma grande quantidade de resíduos fosforiláveis serina-treonina tanto quanto tirosina. A função da fosforilação dos resíduos serina-treonina na FRS2 não é bem clara, mas pode promover

especificidade à sinalização do FGFR por regular vias distintas de fosforilação de resíduos tirosina de FRS2. (Ridyard e Robbins, 2003, para revisão).

Quando ocorre o silenciamento do gene para FRS2 ocorre um alto grau de morte celular durante o desenvolvimento de camundongos e células derivadas desses embriões demonstram distúrbios de migração, proliferação e ativação da MAP cinase (Ridyard e Robbins, 2003, para revisão).

Ridyard e Robbins (2003) sugeriram que a ativação da proteína cinase C, cinases da família das Srcs e MEK1/2 podem ser reguladas pela fosforilação de resíduos serina-treonina de FRS2. Estes mesmos autores também demonstraram que Grb2 é recrutada para os “lipid rafts” durante os eventos de sinalização e que a ativação da MEK1/2 por diferentes mecanismos dentro de “lipid rafts” pode causar respostas celulares diferentes.

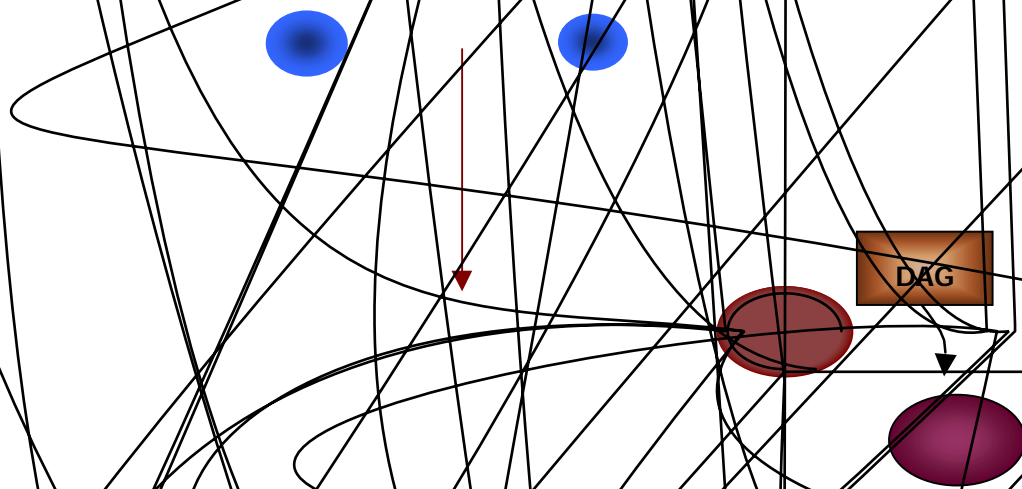


Figura 4 – Esquema das vias de sinalização do FGFb. Tem sido demonstrado que o FGFb é capaz de ativar várias vias de sinalização intracelulares. A ligação do FGFb com seu receptor é aumentada pelas HSPGs e acarreta na autofosforilação do FGFR em vários resíduos tirosínicos. Na figura estão ilustradas as vias da MEK e da PKC. Adaptado de Nugent e Iozzo, 2000.

1.5 – Fator de crescimento de fibroblasto básico

O FGF básico (FGFb) ou FGF-2 é um polipeptídeo que existe em múltiplas isoformas (18, 22, 22.5, 24 e 34 KDa) (Delrieu, 2000), sendo que a mais estudada é a isoforma de 18 KDa. A estrutura tridimensional desta molécula é composta por 12 folhas β -pregueadas antiparalelas, organizadas em uma estrutura piramidal (Fig. 5). Nelas estão presentes 4 resíduos cisteína, um grande número de resíduos básicos, dois sítios (Ser 64 e Thr 112) que podem, respectivamente, ser fosforilados pela proteína cinase C e A e dois sítios de ligação aos FGFRs, o que lhe permite ligar-se a dois receptores simultaneamente ou a um único em duas posições diferentes (Nugent e Iozzo, 2000 para revisão).

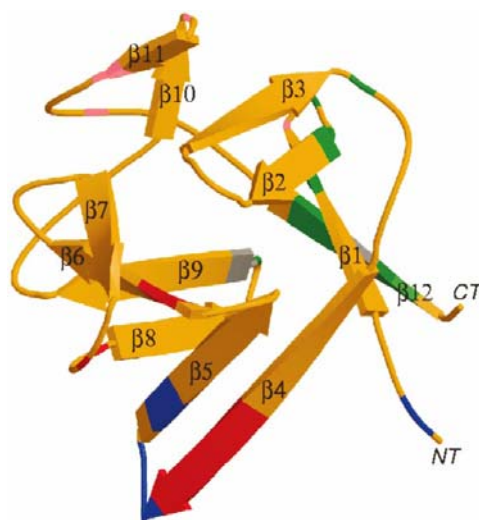


Figura 5 - Estrutura tridimensional do FGFb, região de ligação com a heparina em rosa, região de ligação com FGF em verde (região que pode entrar em contato com domínio DII), azul (região que pode entrar em contato com domínio DIII) e vermelho (região que pode entrar em contato com splicing alternativo de domínio DII). Região de junção (linker region) em cinza. (Ornitz e Itoh, 2001).

O FGFb está presente tanto na matriz extracelular como na membrana basal (Dowd *et al.*, 1999). Esta citocina apresenta grande afinidade tanto por sulfato de heparan como pela heparina (Nugent e Iozzo, 2000 para revisão).

O mecanismo de secreção do FGFb ainda é desconhecido (Bifkalvi *et al.*, 1997). Sabe-se que o FGFb não é liberado pela via vesicular clássica de secreção de polipeptídios, entretanto após dano celular, morte ou rompimento parcial da membrana, a liberação pode ocorrer (Delrieu, 2000). Proteínas que são secretadas através da via vesicular clássica possuem um peptídeo sinal N-terminal (Backhaus *et al.*, 2003). O FGFb, assim como o FGF-1 e o FGF-9 não possuem esse peptídeo sinal (Dahl *et al.*, 2000).

Florkiewicz e colaboradores em 1998 observaram que em células COS-1 tratadas com cardenolidas, substância que pode inibir a subunidade α da bomba de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase, havia inibição da secreção de FGFb. Outros autores demonstraram que a secreção de FGFb é inibida pela ouabaína (inibidor específico da bomba de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase) em células HEV 293 e CV-1. Entretanto, em células expressando a subunidade $\alpha 1$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase resistente a ouabaína, a secreção de FGFb não foi afetada, mesmo com altas concentrações de ouabaína. Além disso, a subunidade α da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase e o FGFb podem ser co-imunoprecipitados, indicando uma potencial interação entre eles (Dahl *et al.*, 2000). A exposição ao anvirzel (extrato de planta que contém diversos glicosídeos cardíacos que vem

sendo investigado no tratamento do câncer) e à oleandrina (glicosídeo cardíaco) é capaz de inibir a secreção de FGFb de cultura de células da linhagem PC3 e DU145 (Smith *et al.*, 2000).

Após a ligação do FGFb aos seus receptores de membrana ocorre a internalização e a degradação lisossomal. FGFb ligado à proteoglicanas sulfato de heparan pode sofrer internalização direta ou pode haver internalização do complexo ternário (FGFb-HSPG-FGFR) (Delrieu, 2000). Apesar de haver degradação após a internalização, tem sido observada a presença de FGFb em frações nucleares de diferentes tipos celulares (fig. 6). A translocação do FGFb depende do ciclo celular e ocorre na transição das fases G1-S, indicando mediar um aumento na atividade mitótica (Bikfalvi *et al.*, 1997).

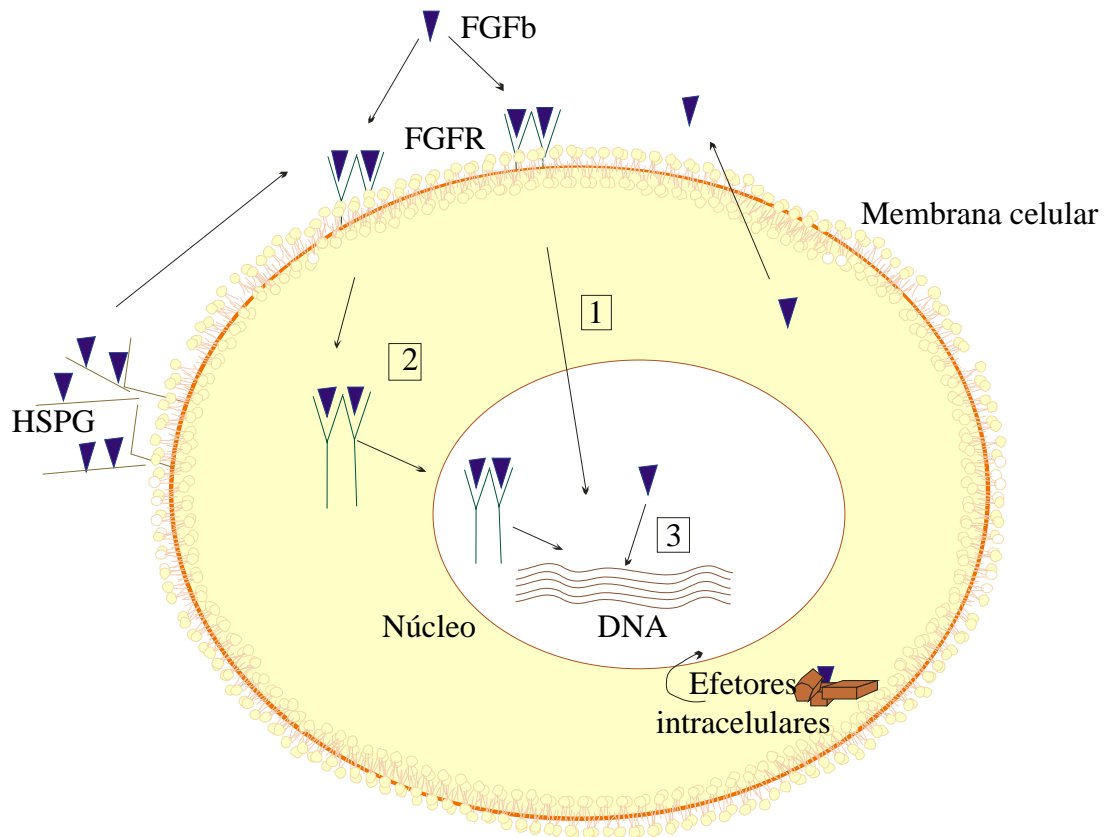


Figura 6 – Quando secretado na superfície, o FGFb pode se ligar às proteoglicanas sulfato de heparan e aos receptores de alta afinidade, agindo de uma maneira autócrina e/ou parácrina. Duas vias são apresentadas, cada uma responsável pela ativação subsequente de genes específicos. A transdução das vias de sinalização desencadeadas por receptores tirosina cinase (1), além da internalização e colocalização do ligante e do receptor no núcleo (2) ou FGFb diretamente no núcleo celular (3). Figura adaptada de Delrieu (2000).

Estudos recentes demonstraram que o FGFb é fosforilado e a ligação do fosfato é resistente ao pH alcalino. A adição de fosfatase alcalina resulta em uma desfosforilação tempo e dose dependente e concomitantemente num bloqueio do efeito neuroprotetor do FGFb em culturas de neurônios corticais e hipocâmpais (Klump *et al.*, 2006).

1.6 – Diferentes Efeitos do FGFb

O FGF induz várias respostas tais como: proliferação, migração e diferenciação celular. Interessantemente, ele é capaz de mediar mais de um efeito em um mesmo tipo celular, neste caso não se sabe se a mesma via de sinalização dispara respostas múltiplas da célula ou se vias distintas medeiam os fenômenos (Boilly *et al.*, 2000 para revisão).

1.6.1 – FGFb na proliferação

Estudos demonstraram que o FGFb induz a proliferação de progenitores de oligodendrócitos e causa inibição da diferenciação destas células maduras, além de bloquear completamente a diferenciação terminal e expressão gênica para produção de mielina (Baron *et al.*, 1998). A via de sinalização envolvida nas respostas de aumento na proliferação de progenitores de oligodendrócitos englobam tirosinas cinases, p42/p44 MAPK, p38 MAPK e p70 S6 cinase. O aumento nos níveis intracelulares de AMPc reduzem o efeito proliferativo induzido pelo FGFb (Baron *et al.*, 2000).

A proliferação de células neuroepiteliais de embriões de rato (E13) induzida pelo FGFb é inibida de maneira dose-dependente pelo etanol. Desta maneira, os efeitos do etanol nos períodos iniciais do desenvolvimento, comprometem as ações do FGFb neste processo (Ma *et al.*, 2003).

Progenitores de neurônios multipotentes presentes em culturas de células corticais também têm sua taxa de proliferação aumentada pelo FGFb (Pappas e Parnavelas, 1997). Pesquisas *in vitro* demonstraram que a inibição da proliferação de astrócitos abole o efeito trófico do FGFb em neurônios dopaminérgicos (Engele e Bohn, 1991).

1.6.2 – FGFb na diferenciação

Tem sido demonstrado o papel do FGFb na diferenciação de diferentes tipos celulares. Em progenitores tardios de oligodendrócitos o FGFb causa a inibição da diferenciação não estando a PKC envolvida neste efeito (Baron *et al.*, 2000). FGF é capaz de induzir a diferenciação de astrócitos do prosencefalo (Abbraccio *et al.* 1995) sendo, o efeito precedido por uma forte e transiente ativação da ERK e uma modesta ativação da p38 MAP cinase (Heffron e Mandell, 2004).

FGFb e FGF 5 endógenos regulam a expressão de GFAP em regiões específicas (córtex, estriatum e mesencéfalo). O defeito na diferenciação de astrócitos em camundongos knockout para FGFb e FGF 5 é acompanhada por um defeito na permeabilidade da barreira hemato-encefálica que pode decorrer de uma ação direta ou indireta dos FGFs (Reuss B. *et al.*, 2003).

O FGFb é capaz de estimular o crescimento de neuritos em cultura de neurônios da retina de ratos embrionários (E6), através da ativação da via da ERK (Perron e Bixby, 1999). Tanto o FGFa quanto o FGFb estimulam a transdiferenciação do epitélio pigmentado da retina em tecido neural e também promovem a diferenciação de fotorreceptores de pinto (Tcheng *et al.*, 1994) e de células ganglionares da retina em culturas de explantes (Ferrari *et al.*, 1989; Knüsel *et al.*, 1990). Em *Xenopus laevis* o FGFb participa da regulação do direcionamento axonal de células ganglionares da retina promovendo o crescimento e repulsão, sendo as vias da MAPK, PC-PLC e PLC γ necessárias para a extensão axonal, enquanto para a repulsão são necessárias as vias da PC-PLC e PLC γ (Webber *et al.*, ntonaonao

Em neurônios cerebelares o FGFb induz o crescimento de neuritos e esse efeito é mediado pela cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina. (Williams *et al.*, 1995).

O FGFb é capaz de aumentar a diferenciação induzida por trauma em culturas de camadas do hipocampo (Laskowski *et al.*, 2005) e promove a diferenciação de neurônios colinérgicos em culturas de células do prosencéfalo basal de ratos durante estágios precoces do desenvolvimento (Ferrari *et al.*, 1989; Knüsel *et al.*, 1990).

As isoformas de 18 e 23 KDa de FGFb aumentam o número de ramificações axonais em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal obtidas de ratos, mas não promovem o alongamento axonal (Klimaschewski *et al.*, 2004).

1.6.3 – FGFb na sobrevida

O FGFb regula a sobrevida de células da retina de pinto *in vitro* (Kinkl *et al.*, 2001) e promove a sobrevida de células ganglionares da retina de ratos tanto *in vitro* como *in vivo* (Meyer-Franke *et al.*, 1995). O efeito em células ganglionares de retina de ratos neonatos é elevado com tratamento combinado com ceramida C2 (Ito, 2003).

O FGF protege neurônios da retina de ratos albinos da degeneração induzida por isquemia. Retinas tratadas com FGFb apresentam melhor preservação da camada de células ganglionares e da camada nuclear externa quando comparadas às controle, indicando um importante papel dessa molécula na sobrevivência neuronal após injúria isquêmica da retina (Zhang *et al.*, 1994).

Neurônios dopaminérgicos de embriões de ratos (Mena *et al.*, 1995), neurônios do núcleo hipoglossal e da medula espinhal também têm um aumento em sua sobrevivência quando tratados com FGFb. Em ratos no período pós-natal, o FGF resgata uma sub-população de motoneurônios após lesão do nervo ciático, além de regular a atividade da ChAT (colina-acetil transferase) durante o desenvolvimento embrionário (Groethe e Wewetzes, 1996).

1.6.4 – FGFb na morte celular

Em algumas situações experimentais e em alguns tipos celulares o FGFb promove parada do crescimento e morte celular. Condrócitos estacionam na fase G1 do ciclo celular quando submetidos ao tratamento com FGFb (Krejci *et al.*, 2004).

O FGFb pode induzir a morte celular de muitos tipos celulares tumorais. Este efeito está associado com parada do ciclo celular em G1 e

ativação das caspases iniciadoras (caspase 2, 8 e 10) e executoras (caspases 3,6 e 7) (Burchill e Westwood, 2002 para revisão).

1.7 – A retina

A retina faz parte do Sistema Nervoso Central (SNC), pois se origina do ectoderma neural que também dá origem às demais áreas do cérebro (Dowling, 1991 para revisão). Este tecido possui uma localização periférica privilegiada, a qual permite sua fácil obtenção, livre de tecido conjuntivo adjacente e de outras populações neuronais e gliais. Esta característica, aliada a uma organização em camadas sinápticas e nucleares, muito semelhante ao observado em outras estruturas do sistema nervoso, torna a retina um excelente modelo experimental para o estudo do desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência de células do SNC tanto *in vitro* como *in vivo* (Adler, 1993; Cepko, 1993; Dowling, 1991 para revisão). Uma outra característica importante do tecido retiniano é a presença de apenas cinco classes de tipos neuronais e, em geral, apenas um tipo de célula glial: a célula de Müller que pertence à linhagem astrocítica. Oligodendrócitos estão completamente ausentes na retina da maioria das espécies e os astrócitos se encontram apenas nas camadas de fibras do nervo óptico de mamíferos (Newman e Reichenbach, 1996).

Em vertebrados adultos, a retina está organizada em cinco camadas principais, organizadas histologicamente (fig. 7).

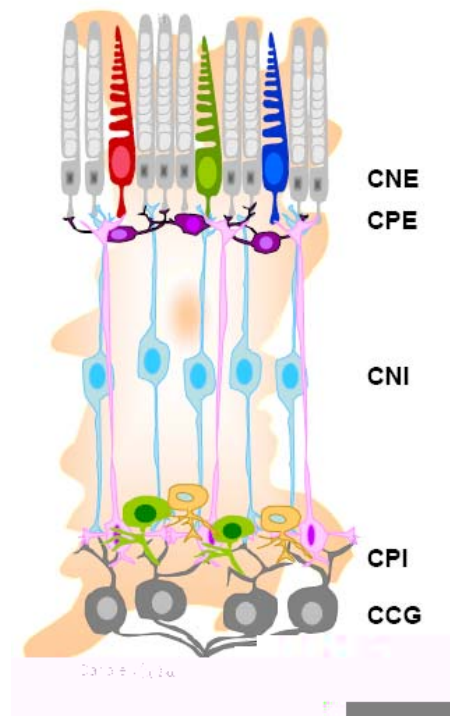


Figura 7 – Disposição em camadas das células da retina. Camada de células ganglionares (CCG); camada plexiforme interna (CPI); camada nuclear interna (CNI); camada plexiforme externa (CPE); camada nuclear externa (CNE).

Na figura 7 podemos observar as seguintes camadas: camada de células ganglionares (CCG), onde encontramos os corpos de células amácrinas deslocadas e células ganglionares; camada plexiforme interna (CPI) onde fazem sinapses prolongamentos de células bipolares, amácrinas, interplexiformes e ganglionares; camada nuclear interna (CNI) onde encontramos os corpos celulares de células bipolares, horizontais, amácrinas e interplexiformes, camada plexiforme externa (CPE) onde fazem conexões sinápticas prolongamentos de fotorreceptores, células bipolares e horizontais e interplexiformes (Dowling, 1991 para revisão; Rodieck, 1998); camada nuclear externa (CNE) onde encontramos os corpos celulares dos fotorreceptores, que se dividem em dois subtipos: os cones e os bastonetes (Yau, 1994). Na INL encontram-se também os corpos celulares da glia

de Müller, cujos prolongamentos podem ser encontrados em todas as outras camadas da retina. Além dessas camadas ainda podemos observar na figura o epitélio pigmentado da retina, que não faz parte da retina neural e uma de suas funções é absorver a luz não capturada por fotorreceptores, evitando a degradação e a distorção da imagem (Dowling, 1991 para revisão).

As células da retina se desenvolvem obedecendo a uma determinada seqüência que é caracterizada por duas fases: um estágio de proliferação, durante o qual as células estão no período mitótico e o estágio de diferenciação, quando os neurônios pós-mitóticos imaturos começam a expressar suas características neuronais individuais (Goustin *et al.*, 1986; Sporn *et al.*, 1987).

O tempo de geração e diferenciação das células da retina pode variar dependendo da espécie animal, mas invariavelmente as ganglionares são as primeiras a serem geradas e a diferenciarem-se (vide tabela 1). Este processo depende não apenas de um programa genético pré-determinado como de sinais ambientais intra-retinianos, tais como a expressão de moléculas de adesão e da matriz extracelular, assim como a liberação de citocinas diversas (Cepko, 1993).

1.8 – FGFb e seus receptores na retina

No tecido retiniano, foi demonstrado que o FGFb é capaz de induzir regeneração após lesão constituindo-se num fator importante nos estudos que envolvem degeneração deste tecido (Park e Hollenberg, 1989).

Ao longo dos anos, vários autores demonstraram a presença de FGFb na retina. Gao e Hollyfield (1995), isolaram FGFb da retina de camundongos e demonstraram sua atividade mitótica sobre células da linhagem 3T3 mantidas em cultura. González-Fernandes e colaboradores (1993) mostraram a expressão de RNAm para FGFb na retina de ratos durante o desenvolvimento e observaram que, a partir de P18, não foi detectada mais a presença desse fator.

Em retinas expostas à luz, foi observada a presença de FGFb nas células de Müller e em núcleos das camadas nuclear interna e externa. Na macroglia e em células do epitélio pigmentado, a marcação para FGFb foi proeminente no núcleo das células, mas em alguns neurônios, como fotorreceptores e células ganglionares, houve detecção na região citoplasmática (Walsh *et al*, 2001).

No que concerne aos receptores para o FGF, pesquisadores demonstraram a expressão de FGFR1-4 em culturas de células da retina após 3 dias *in vitro*. Todas as células apresentaram, de forma global estes receptores, entretanto os receptores FGFR-2 tinham uma localização preferencial

em células gliais. Os fotorreceptores possuem os 4 tipos de receptores sendo que os FGFR1 e FGFR4 encontram-se em maior densidade (Kinkl e col., 2002).

A presença de receptores para FGFb nos fotorreceptores (Fontaine *et al.*, 1998) sugere que uma liberação de FGFb, pela microglia, possa contribuir de forma a prevenir a degeneração de fotorreceptores na retina de ratos (Harada *et al.*, 2000). A inativação do FGFR nos fotorreceptores leva à degeneração da retina de camundongos, sugerindo que esses receptores são essenciais para a sobrevivência deste tipo celular (Campochiaro *et al.*, 1996).

A partir da década de 80, vários estudos foram realizados com o objetivo de avaliar as influências dos fatores de crescimento sobre a proliferação e diferenciação de vários tipos celulares *in vitro*. Nesta época, foi postulado que estes fatores poderiam estar envolvidos nos mecanismos de controle *in vivo* envolvendo tanto a regulação parácrina quanto autócrina da proliferação e diferenciação celular. Como já se sabia que os fatores de crescimento tinham a capacidade de modular diversas atividades celulares, seria possível que estes mesmos fatores participassem do complexo evento morfogênético que ocorre durante o desenvolvimento (Goustin *et al.*, 1986; Sporn *et al.*, 1987).

Sendo o FGFb um fator trófico presente na retina ele é candidato a participar do desenvolvimento e da regeneração deste tecido. Estudos demonstraram que o FGFb estimula uma grande atividade mitogênica na retina

neural em embriões de pinto (Mascarelli et al, 1987). Os pesquisadores Park e Hollenberg (1989) foram os primeiros a demonstrar que o FGFb induzia a regeneração da retina de embriões de pinto *in vivo*.

Estudos demonstraram que após injeções intraoculares de FGFb havia redução na degeneração de fotorreceptores em animais modelos para retinite pigmentosa, uma distrofia retiniana que resulta na perda progressiva de fotorreceptores, levando a redução da acuidade visual. Posteriormente, este mesmo grupo observou o efeito do FGFb na sobrevivência de fotorreceptores em ratos modelos para degeneração de fotorreceptores induzida por exposição à luz (Faktorovich *et al.*, 1992). O FGFb também é capaz de induzir e estimular a sobrevivência em culturas de fotorreceptores purificados, estando a via da MEK relacionada com este efeito (Kinkl *et al.*, 2001).

A degeneração da retina é acompanhada de um aumento na expressão do receptor de baixa afinidade para as neurotrofinas, o p75^{NTR}, nas células de Müller, o que resulta na diminuição da síntese de FGFb, por estas células, levando à apoptose dos fotorreceptores. Nestes mesmos estudos foi demonstrado que a produção do FGFb é modulada pelas neurotrofinas. A neurotrofina 3 estimula a síntese enquanto o NGF inibe (Harada *et al.*, 2000).

Posteriormente foi descrito que o meio condicionado de microglia era capaz de reduzir a expressão do RNAm para o FGFb em células de

Müller. Esse efeito foi revertido pela adição de anticorpo contra o receptor p75, mas não pelo K252a (bloqueador específico para TRK), sugerindo que o p75 esteja relacionado à regulação da expressão de FGFb nas células de Müller (Harada *et al.*, 2002).

2 – OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do fator de crescimento de fibroblasto básico na neuritogênese das células da retina em cultura.
- Identificar possíveis vias bioquímicas envolvidas com o efeito do FGFb na neuritogênese.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Materiais

O fator de crescimento de fibroblastos básico recombinante humano (bFGF) foi comprado da Invitrogen Life Technologies (USA). A penicilina G, sulfato de estreptomicina, L-glutamina, a ornitina e o BAPTA-AM foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA). Meio 199 foi comprado da Gibco (Gaithersburg, MD, USA) e a tripsina da Worthington (Freehold, NJ, USA). Genisteína, cloreto de queleritrina e a nifedipina foram comprados da RBI/Sigma (Natick, MA, USA). O PD98059 e LY 294002 vieram da BIOMOL (Plymouth Meeting, PA, USA). O SB 202190 foi comprado da Calbiochemical (Darmstadt, Germany). As placas de Petri foram compradas da TPP (Switzerland).

3.2 – Culturas de células da retina

Ratos da linhagem Lister-Hooded dias pós-natal 0 e 1 (P0 e P1) foram sacrificados por decapitação, seus olhos removidos por enucleação e colocados em placa de Petri com uma solução salina sem cálcio e magnésio (CMF), acrescida de antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL). Depois, as retinas foram dissecadas e colocadas em tubo de ensaio contendo CMF acrescido de antibiótico onde a tripsina 0,1% foi adicionada para a dissociação química por aproximadamente 35 minutos. Para a inativação da tripsina o CMF foi

retirado e as retinas lavadas por três vezes com meio de cultura contendo 5% de soro fetal bovino, glutamina 2,0mM, estreptomicina 100µM e penicilina 100U/mL. Posteriormente, realizamos a dissociação mecânica através de uma pipeta Pasteur de ponta afilada, por cerca de 10 vezes. A suspensão de células obtidas foi contada em um hemocítômetro, ao microscópio óptico em campo claro, em um aumento de 200 vezes, para estabelecer o quanto de meio de cultura precisou ser acrescido àquela suspensão de células para a obtenção da densidade de 5×10^5 células/placa.

As células foram, então, plaqueadas em placas de Petri de 35 mm previamente tratadas com Poli-L-ornitina (50µg/mL), num volume inicial de 1mL de meio completo (meio 199, soro fetal bovino, glutamina e antibiótico). Imediatamente após o plaqueamento foi adicionado mais 1mL de meio completo (culturas controle) ou mais 1mL de meio contendo FGFb e/ou outra droga testada. Todas as culturas foram mantidas a 37°C, em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ por 24, 48 ou 72 horas.

Todos os procedimentos de dissecação, dissociação e semeadura das células foram feitos em capela de fluxo laminar.

3.3 – Contagem das células

Para a análise da neuritogênese primeiramente fixamos as culturas com aldeídos por 30 minutos e lavamos com tampão fosfato a 0.1% e

mantivemos em tampão até a contagem. Posteriormente realizamos a contagem de 10 campos aleatórios em cada placa, ao microscópio de campo claro em aumento de 200X. Foram contadas células com neuritos menores ou maiores que o corpo celular. Os neuritos foram caracterizados pela sua morfologia, esse tipo de processo celular é fino e mais ramificado quando comparado com os processos emitidos pelas células gliais que são mais espessos e possuem menos ramificações.

3.4 – Fotomicrografias

As culturas foram fixadas com aldeídos por 30 minutos e montadas com diacilglicerol 95% e PBS (salina tamponada com fosfato) 5% e fotografamos em microscopia de contraste de fase num aumento de 400X.

3.5 – Análise estatística dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas e a análise estatística expressa em porcentagem do controle \pm erro padrão da média ou expressa no número total de células. Utilizamos o teste de análise de variância ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Newman-Keuls.

4 – RESULTADOS

O FGFb é uma citocina capaz de induzir diferentes respostas celulares tais como: proliferação, diferenciação e sobrevivência. Ao longo de muitos anos tem sido estudada a ação desta molécula tanto no sistema nervoso central como no sistema nervoso periférico (Boilly *et al.*, 2000). Em estudos prévios realizados em nosso laboratório, observamos que o tratamento de células da retina de ratos neonatos com FGFb induzia o crescimento de processos numa população de células presentes nas culturas. Com o intuito de quantificarmos este efeito passamos a fazer culturas mais diluídas e nestas condições experimentais comparamos o tratamento com FGFb por diferentes intervalos de tempo com as culturas controle.

Em nosso primeiro passo avaliamos o efeito do tratamento com FGFb sobre o tamanho dos processos das células em cultura. Quantificamos o número de células com processos maiores e menores do que o corpo celular. Baseados em estudos preliminares do laboratório utilizamos inicialmente as concentrações de 25 e 50 ng/mL de FGFb e analisamos o efeito após 24, 48 e 72h em cultura.

O FGFb foi capaz de induzir o aumento no número de células com processos maiores que o corpo celular quando comparado com o controle (100% de aumento) em ambas as concentrações utilizadas. E que esse

efeito foi evidente já nas primeiras 24 horas e o perfil permanece o mesmo em 48 e 72 h (Fig 9,10 e 11). Assim sendo resolvemos utilizar em todos os experimentos subsequentes a concentração de 25ng/mL de FGFb e o período de incubação de 24h.

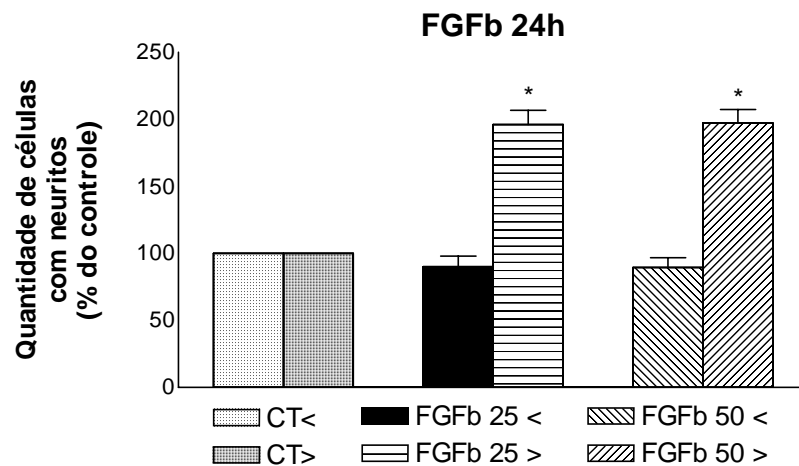


Figura 9: Efeito do FGFb em células da retina mantidas em cultura por 24 horas. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular; células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb 25 <) e maiores (FGFb 50 >) que o corpo celular; células tratadas com 50ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb 50 <) e maiores (FGFb 50 >) que o corpo celular. (n = 12). Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. * p< 0,001.

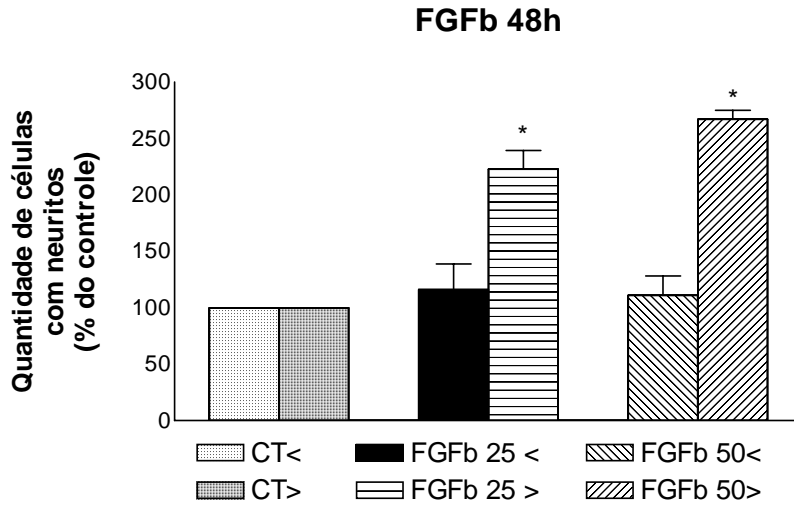


Figura 10: Efeito do FGFb em células da retina mantidas em cultura por 48 horas. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular (n=9); células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb 25 <) e maiores (FGFb 25 >) que o corpo celular (n=9); células tratadas com 50ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb 50 <) e maiores (FGFb 50 >) que o corpo celular (n=8). Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. * p< 0,001.

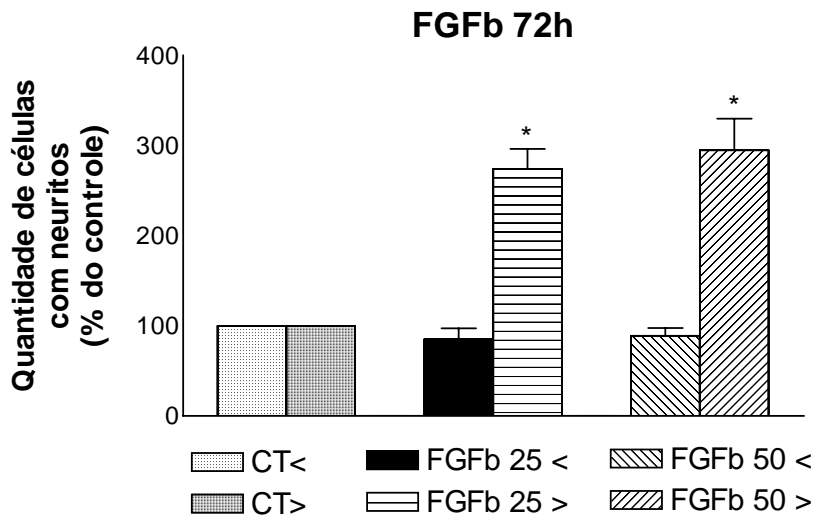


Figura 11: Efeito do FGFb em células da retina mantidas em cultura por 72 horas. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular (n=9); células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb 25 <) e maiores (FGFb 25 >) que o corpo celular (n=9); células tratadas com 50ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb 50 <) e maiores (FGFb 50 >) que o corpo celular (n=8). Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. * p< 0,001.

Na figura 12 podemos observar a diferença na morfologia entre as culturas tratadas com FGFb e controle. As culturas tratadas apresentam mais processos maiores que o corpo celular tanto na incubação por 24 horas quanto por 72 horas.

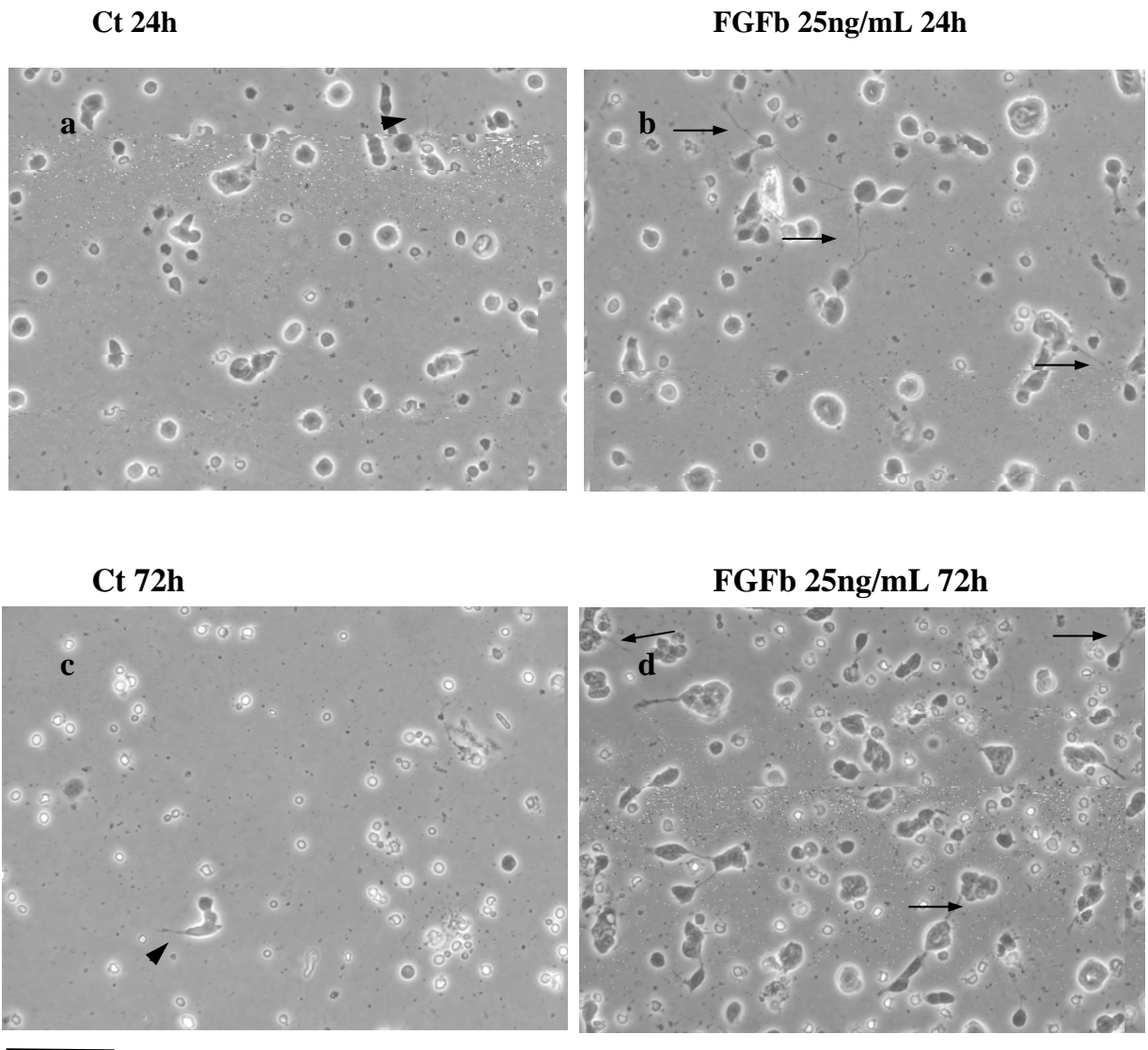


Figura 12: Fotomicrografias representativas, em contraste de fase, das culturas controles e tratadas com FGFb 25ng/mL, numa incubação de 24 horas (a,b) e 72 horas (c,d). As setas apontam para neuritos maiores que o corpo celular e as cabeças de setas para neuritos menores que o corpo celular. Escala de 5 μ m.

Como o FGFb é capaz de influenciar diversos tipos celulares induzindo diversos efeitos, como a sobrevivência e a proliferação, nosso próximo passo foi verificar se havia alteração no número total de células.

Para responder esta questão quantificamos o número total de células. O FGFb, nessas condições experimentais, não foi capaz de alterar significativamente o número total de células, sugerindo que o FGFb não esteja induzindo sobrevivência nem proliferação (Fig. 13).

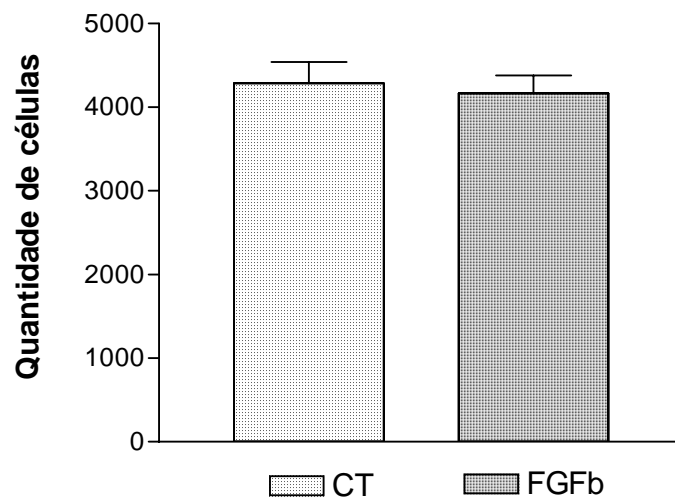


Figura 13: Efeito do FGFb na quantidade total de células da retina. As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina ($50\mu\text{g/mL}$). Culturas controle (CT) e tratadas com 25ng/mL de FGFb (FGFb).

Uma vez caracterizado o efeito do FGFb sobre o crescimento de processos resolvemos estudar quais as vias bioquímicas que estariam mediando este efeito. Os diferentes FGFs exercem muitos de seus efeitos através da estimulação de receptores de alta afinidade do tipo tirosina cinase. A

ligação do FGF com estes receptores acarreta a dimerização e sua autofosforilação. (Lundin *et al.*, 2003 citando Klint e Claesson-Welsh, 1999). Assim sendo, decidimos avaliar a participação de receptores tirosina cinase no efeito do FGFb e para tal utilizamos a genisteína que é uma droga capaz de inibir a atividade de tirosinas cinase.

O tratamento com genisteína, na concentração de 10 μ M, inibiu completamente o efeito do FGFb (fig. 14) indicando que seu efeito dependa da ativação de tirosinas cinases, sejam elas parte do receptor de alta afinidade, sejam elas citoplasmáticas.

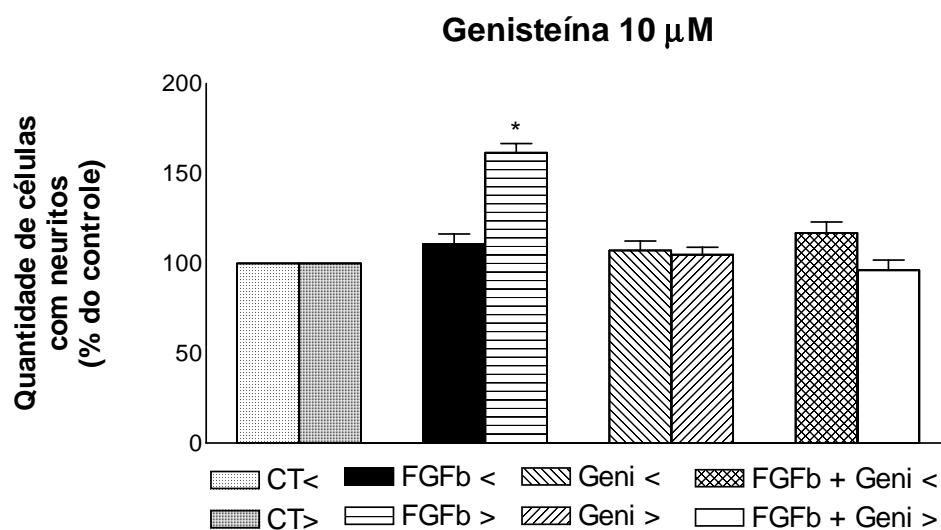


Figura 14: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença de 10 μ M de Genisteína. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular (n = 9); células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb <) e maiores (FGFb >) que o corpo celular (n = 9); células tratadas com 10 μ M de Genisteína com processos menores (Geni <) e maiores (Geni >) que o corpo celular (n = 8); células tratadas com FGFb 25ng/mL e Genisteína 10 μ M com processos menores (FGFb + Geni <) e maiores (FGFb + Geni >) que o corpo celular (n = 8). Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. * p< 0,001.

Como os receptores para FGF podem ativar proteínas Src (proteínas cinases citoplasmáticas) (Reuss e Halbach, 2003), utilizamos o PP1 (inibidor de Src) para avaliar o envolvimento dessa proteína no efeito do FGFb em nossas culturas.

O efeito do FGFb no crescimento dos processos foi completamente bloqueado pelo PP1 na concentração de 1 μ M (fig. 15).

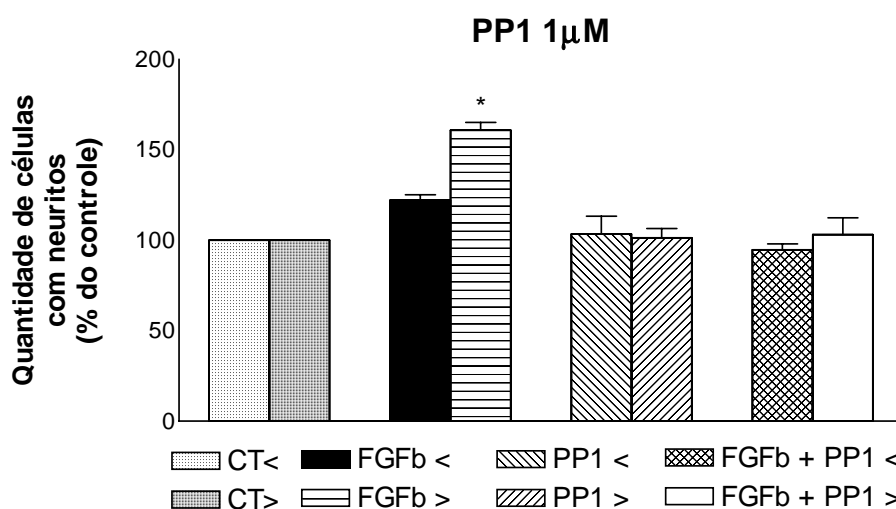


Figura 15: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença de 1 μ M de PP1. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular; células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb<) e maiores (FGFb>) que o corpo celular; células tratadas com 1 μ M de PP1 com processos menores (PP1<) e maiores (PP1>) que o corpo celular; células tratadas com FGFb 25ng/mL e PP1 1 μ M com processos menores (FGFb + PP1<) e maiores (FGFb+PP1>) que o corpo celular. Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. (n = 6) * p< 0,001.

A via da PI3-cinase também pode estar envolvida nos efeitos do FGFb em alguns tipos celulares. Hollborn *et al.* 2004 demonstraram que a via da PI3-cinase é indispensável para a proliferação de linhagem de células de

Müller. Essa via também é necessária para a migração e sobrevivência de células endoteliais durante a angiogênese promovida por FGF (Qi *et al.*, 1999).

Para avaliar a participação da PI3 cinase no efeito do FGFb na neuritogênese utilizamos um inibidor desta enzima (LY 294002). Na concentração de 25 μ M houve um bloqueio completo do efeito do FGFb (fig. 16). Porém houve uma diminuição estatisticamente significativa nas células com processos maiores e menores que o corpo celular quando tratadas apenas com o LY, sugerindo uma possível toxicidade da concentração dessa droga. Com o objetivo de investigar essa possibilidade

proe3.1(e)(nzi<)men.1(e)(LY>) noreso(o)-ci35 Tw;tiva nas qua

P

O LY na concentração de 12,5 μ M também bloqueia completamente o efeito do FGFb, entretanto, não houve diminuição estatisticamente significativa de células com processos como observado com a dose de 25 μ M (Fig. 17).

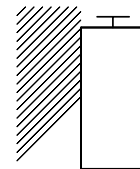


Figura 17: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença da 12,5 μ M de LY 294002. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular; células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb <) e maiores (FGFb >) que o corpo celular; células tratadas com 12,5 μ M de LY com processos menores (LY <) e maiores (LY>) que o corpo celular; células tratadas com FGFb 25ng/mL e LY 12,5 μ M com processos menores (FGFb+LY<) e maiores (FGFb+LY>) que o corpo celular. Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. (n = 6). * p< 0,001.

Neurônios do hipocampo tratados com FGFb apresentam neuritos mais ramificados quando comparados ao controle. Este efeito é mediado por um aumento intracelular de Ca^{2+} mediado por canais do tipo L (Shitaka *et al.*, 1996). Resolvemos, então, avaliar a possível relação deste tipo de canal com o efeito promovido pelo FGFb, utilizando um inibidor desse tipo de canal (nifedipina). **LY 29404 12,5 μ M**050100150200CT

Nossos resultados demonstram que 5 μ M de nifedipina não foi capaz de bloquear o efeito do FGFb (figura 18). Observando o gráfico é possível inferir que há um aumento na quantidade de células com processos maiores que o corpo celular quando trata-se com nifedipina sozinha, porém esse dado não é estatisticamente significativo.

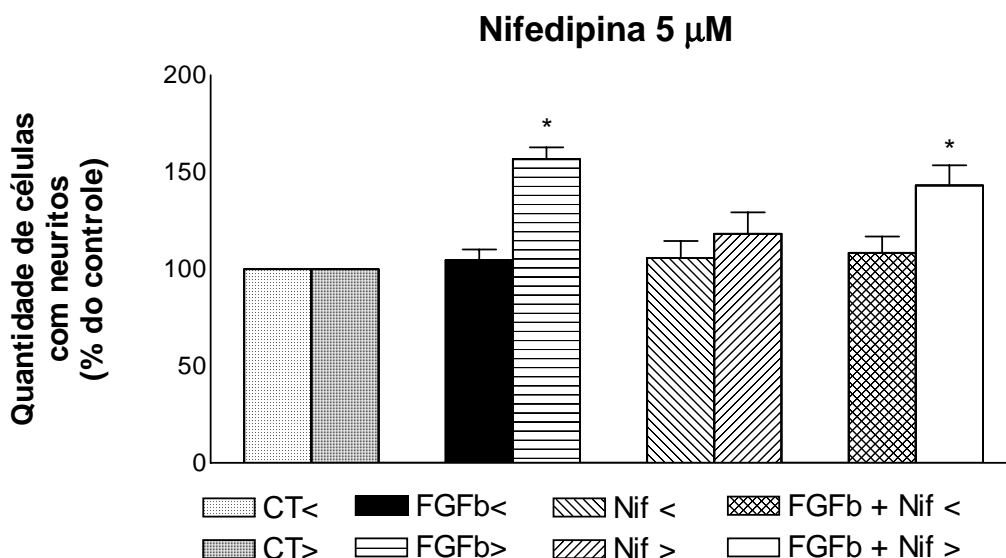


Figura 18: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença de 5 μ M de nifedipina. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular; células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb <) e maiores (FGFb>) que o corpo celular; células tratadas com 5 μ M de nifedipina com processos menores (NIF <) e maiores (NIF>) que o corpo celular; células tratadas com FGFb 25ng/mL e nifedipina 5 μ M com processos menores (FGFb+NIF<) e maiores (FGFb+NIF>) que o corpo celular. Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média.(n = 9). * p< 0,001.

A ativação dos receptores de alta afinidade para FGF causa ativação de várias cascatas de sinalização intracelulares, incluindo a via da Src e da fosfolipase C γ levando à ativação da PKC (Reuss e Halbach, 2003). Corroborando, Wert e Palfrey (2000) relatam que a sobrevivência promovida pelo FGFb

em células PC12 envolve a via da PKC. Para avaliarmos o envolvimento desta proteína no efeito do FGFb encontrado em nosso trabalho, utilizamos o cloreto de queleritrina que é um inibidor da PKC.

O tratamento com o cloreto de queleritrina na concentração de 1,25 μM foi capaz de bloquear completamente o efeito do FGFb nas culturas (Fig. 19).

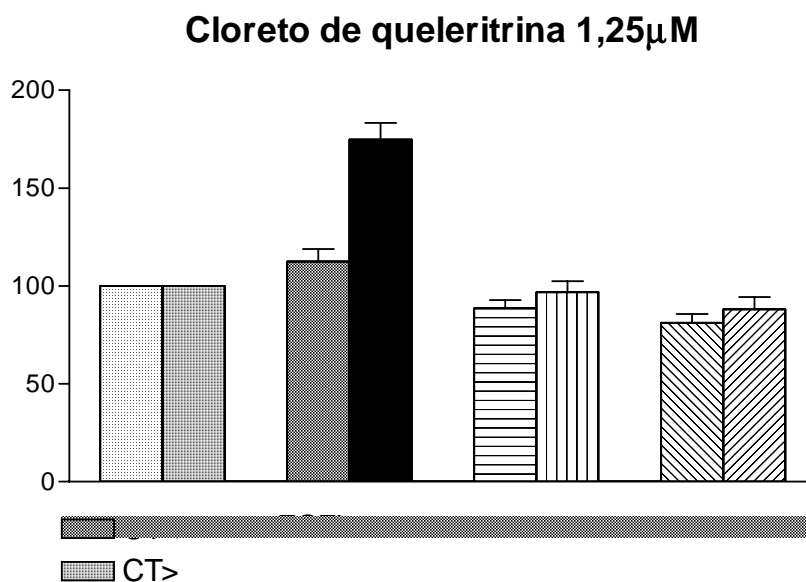


Figura 19: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença de 1,25 μM de cloreto de queleritrina. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular; células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb <) e maiores (FGFb>) que o corpo celular; células tratadas com 1,25 μM de cloreto de queleritrina com processos menores (CC <) e maiores (CC>) que o corpo celular; células tratadas com FGFb 25ng/mL e CC 1,25 μM com processos menores (FGFb+CC<) e maiores (FGFb+CC>) que o corpo celular. Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média.(n = 6). * $p < 0,001$.

A ligação do FGF ao seu receptor de alta afinidade pode acarretar o aumento na liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} levando à ativação de PKCs dependentes desse cátion (Ludin *et al.*, 2003). Como já havíamos

observado que o efeito do FGFb dependia da PKC decidimos utilizar o BAPTA-AM (quelante intracelular de Ca^{2+}) para averiguar a participação desta via.

O tratamento com BAPTA-AM na concentração de 20 μM não foi capaz de alterar o efeito induzido pelo FGFb (Fig. 20).

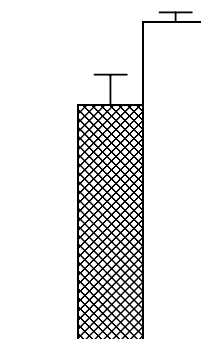


Figura 20: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença de 20 μM de Bapta-AM. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular; células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb <) e maiores (FGFb >) que o corpo celular; células tratadas com 20 μM de BAPTA-AM com processos menores (BAPTA <) e maiores (BAPTA >) que o corpo celular; células tratadas com FGFb 25ng/mL e Bapta-AM 20 μM com processos menores (FGFb + BAPTA<) e maiores (FGFb+BAPTA>) que o corpo celular. Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. (n = 6). * p< 0,001.

Alguns autores tem demonstrado o envolvimento da via da MEK em diversos efeitos promovidos pelo FGFb. FGFb induz a fosforilação da ERK1 e da ERK2 em cultura de neurônios hipocampais e corticais de ratos e a sobrevida promovida pelo FGFb é bloqueada por inibidores da MEK (Abe e Saito, 2000 para revisão). Essa via também está envolvida na extensão de neuritos de

células ganglionares da retina de *Xenopus laevis* (Webber *et al.*, 2005). Por isso resolvemos utilizar o PD 98059, um inibidor da MEK, para avaliar o envolvimento dessa via no processo de neuritogênese induzida pelo FGFb.

O tratamento com PD 98059 na concentração de 50 μ M foi capaz de bloquear o efeito do FGFb nas culturas de células da retina (Fig. 21). Este resultado sugere que a via da MEK esteja envolvida no efeito do FGFb no crescimento de processos de células da retina.

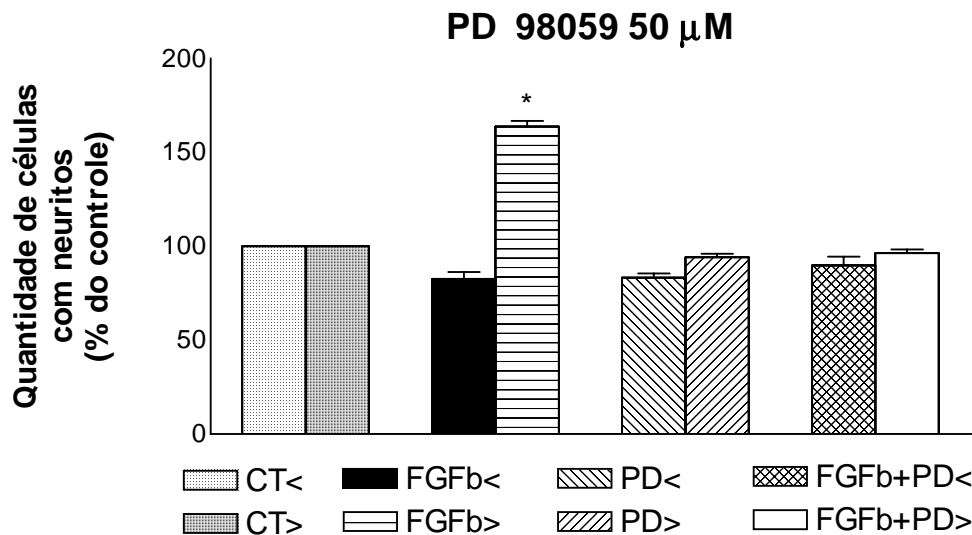


Figura 21: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença da 50 μ M de PD 98059. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular (n = 6); células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb <) e maiores (FGFb >) que o corpo celular (n = 6); células tratadas com 50 μ M de PD com processos menores (PD <) e maiores (PD>) que o corpo celular (n = 5); células tratadas com FGFb 25ng/mL e PD 50 μ M com processos menores (FGFb + PD <) e maiores (FGFb + PD >) que o corpo celular (n = 7). Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. * p< 0,001.

O FGFb tem a capacidade de ativar a cascata de sinalização da MAP cinase p38. Foi demonstrado a participação da p38 na

proliferação mediada por FGFb em fibroblastos (Maher, 1999), em linhagem de células de Müller (Hollborn *et al.*, 2004) e em progenitores de oligodendrócitos (Baron *et al.*, 2000). Além disso, a extensão de processos astrogliais induzida pelo FGFb é precedida por uma modesta ativação da MAP cinase p38. Então, utilizamos o SB 202190 (inibidor da p38) para avaliarmos o envolvimento dessa via no efeito do FGFb.

O SB não foi capaz de bloquear o efeito do FGFb, muito pelo contrário, sozinho foi capaz de induzir um aumento dos processos maiores que o corpo celular. Observamos também uma potenciação do efeito do FGFb quando na presença do SB (Fig. 22).

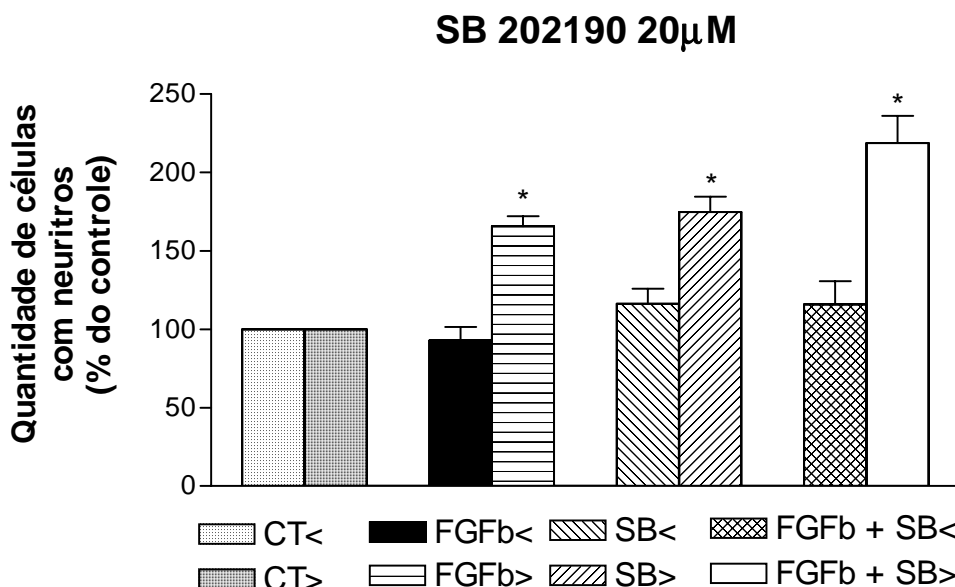


Figura 22: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença da 20 μ M de SB 202190. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular; células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb <) e maiores (FGFb >) que o corpo celular; células tratadas com 20 μ M de SB com processos menores (SB <) e maiores (SB>) que o corpo celular; células tratadas com FGFb 25ng/mL e SB 20 μ M com processos menores (FGFb + SB <) e maiores (FGFb + SB >) que o corpo celular. (n = 6). Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. * p< 0,001.

Avaliamos o efeito de um inibidor dos receptores EGF (tirfostina) já que dados anteriores do laboratório mostraram efeito inibitório parcial na proliferação celular induzida pelo FGFb. Então, para analisarmos a participação do EGFR sobre a neuritogênese induzida pelo FGFb, utilizamos o inibidor tirfostina.

Porém, a tirfostina não foi capaz de inibir o efeito do FGFb sobre a neuritogênese (fig. 23).

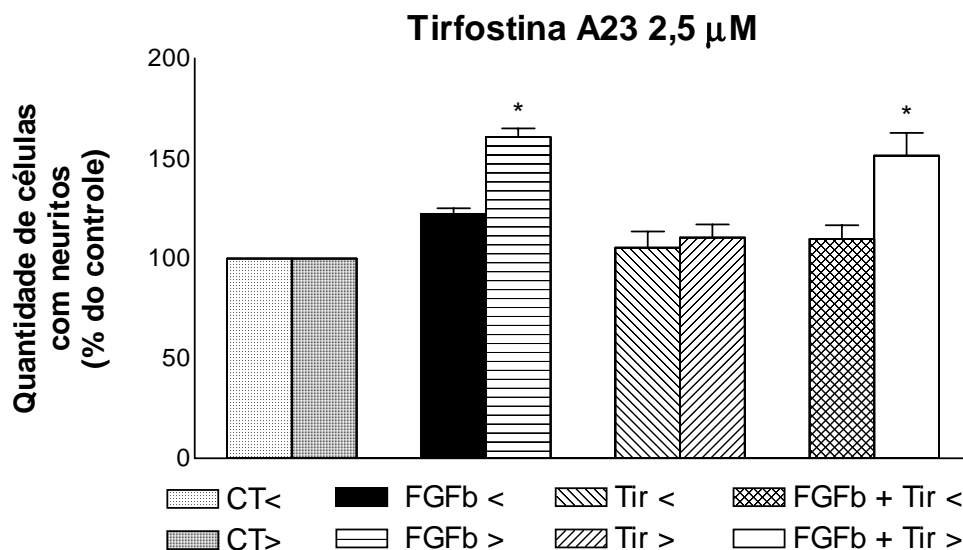


Figura 23: Efeito do FGFb 25ng/mL na presença de 2,5 μ M de tirfostina. Células tratadas com meio 199 com processos menores (CT<) e maiores (CT>) que o corpo celular; células tratadas com 25ng/mL de FGFb com processos menores (FGFb<) e maiores (FGFb>) que o corpo celular; células tratadas com 2,5 μ M de tirfostina com processos menores (PP1<) e maiores (PP1>) que o corpo celular; células tratadas com FGFb 25ng/mL e tirfostina 2,5 μ M com processos menores (FGFb + PP1<) e maiores (FGFb+PP1>) que o corpo celular. Os resultados são expressos em % do controle \pm erro padrão da média. (n = 6). * p< 0,001.

5 – DISCUSSÃO

Anteriormente foi observado que o FGFb induzia um aumento na proliferação e poderia induzir um aumento no número de células com processos. Esses resultados nos sugeriram que o FGFb fosse capaz de agir de forma distinta sobre as diferentes populações celulares presentes em nossas culturas. Por isso, o objetivo deste trabalho foi quantificar o efeito do FGFb sobre o crescimento de processos e identificar as vias de sinalização intracelular envolvidas neste efeito. Para realizarmos este estudo foi necessário reduzir a densidade de células nas culturas de maneira a possibilitar a quantificação. Desta forma passamos a trabalhar com uma densidade de plaqueamento de 500.000 células por placa de Petri de 35mm. Nesta densidade é fácil evidenciar as células isoladas e conseqüentemente os processos por elas emitidos. Para facilitar a abordagem inicial quantificamos células que apresentavam morfologia neuronal. Pela análise morfológica das células presentes nas culturas inferimos que sejam células neuronais já que praticamente não observamos células com a morfologia glial.

Com a finalidade de estabelecermos o período de incubação necessário para a obtenção de um efeito significativo, fizemos a contagem das células com processos menores ou maiores que o corpo celular por 24, 48 e 72 horas de tratamento. Nossos resultados mostraram que não houve alteração da quantidade de células com processos menores que o corpo celular, porém a quantidade de células com processos maiores que o corpo celular aumentou

consideravelmente já em 24 horas. Este resultado nos sugere que o FGFb esteja induzindo um crescimento maior dos processos em uma população celular presente nas culturas analisadas. Um dado interessante diz respeito ao FGFb não estar influenciando no número total de células presentes em nossas culturas já que ao realizarmos a contagem do número total de células observamos os mesmos valores tanto nas culturas controle como nas tratadas.

Muitas citocinas a exemplo do BDNF e da NT-4 influenciam o crescimento de neuritos. Entretanto, tem sido demonstrado que o FGFb participa efetivamente deste processo em diferentes populações. A ramificação axonal de neurônios corticais é muito aumentada após o tratamento com FGFb. No hipocampo, o FGFb promove a bifurcação e crescimento axonal, resultando no aumento da complexidade da árvore axonal. Essa aceleração na arborização axonal na presença do FGFb pode ser revertida com a remoção do FGFb, indicando que a ação do FGFb necessita da presença contínua desse fator (Reuss *et al.*, 2003 para revisão).

O FGFb é considerado por muitos autores mais um fator indutor da ramificação do que do alongamento axonal (Abe e Saito, 2001 para revisão). Porém, neste estudo não foi avaliado a ramificação, nem houve distinção entre axônios e dendritos. Mas o crescimento dos processos foi bastante evidente.

Começamos a avaliar as vias bioquímicas envolvidas com os efeitos do FGFb verificando o envolvimento das proteínas tirosina cinase. Utilizamos a genisteína que é um inibidor desse tipo de proteína e nossos resultados mostram um bloqueio completo do efeito do FGFb pela genisteína. Portanto, proteínas tirosina cinase são necessárias para a extensão de processos mediada pelo FGFb.

Os receptores de alta afinidade para FGFb possuem atividade tirosina cinase e são capazes de ativar direta ou indiretamente outras proteínas com atividade tirosina cinase (Reuss e Halbach, 2003). Desta maneira nossos resultados indicam que o efeito do FGFb depende da ativação de seu receptor, além de um possível envolvimento de proteínas tirosina cinase citoplasmáticas como veremos a seguir.

Após a ativação do receptor para o FGF a proteína cinase Src medeia a via de ativação da cortactina, uma proteína associada a adesão focal que liga filamentos de actina e pode mediar alterações no citoesqueleto celular (Reuss e Halbach, 2003, para revisão). De forma semelhante, o efeito do FGFb sobre as células endoteliais parece envolver a via da Src, da ERK e da MAP cinase p38 (Boilly et al, 2000, para revisão). Em nosso modelo experimental o tratamento com PP1, inibidor seletivo das proteínas da família Src, foi capaz de bloquear completamente o efeito do FGFb, demonstrando que essas proteínas participam do crescimento dos processos induzido pelo FGFb.

A PI3-quinase pertence a uma família de proteínas cinases responsáveis pela fosforilação de fosfatidilinositol na posição 3. Além disso, tem sido descrito que a PI3-quinase tem atividade serina quinase (Qi *et al.*, 2000). Uma das principais vias de sinalização intracelulares ativadas por FGFR é a via da PI3-quinase e já foi demonstrado a participação desta via na orientação do cone de crescimento de axônios de *Xenopus* (Webber *et al.*, 2005) e na sobrevivência e migração de células endoteliais (Qi *et al.*, 2000). O aumento do número de células com processos induzido pelo FGFb mostrado neste estudo foi dependente da PI3-quinase, pois o LY 294002, inibidor desta enzima, bloqueou completamente o efeito do FGFb.

Alguns trabalhos mostram o envolvimento dos canais de Ca^{2+} do tipo L nos efeitos do FGFb. Quando culturas de células do epitélio pigmentado da retina e de neurônios do cérebro de ratos são tratadas com FGFb há um aumento da amplitude da corrente desses canais (Rosenthal *et al.*, 2001). Células do hipocampo tratadas com FGFb apresentam aumento da expressão dos canais de Ca^{2+} do tipo L e isso parece mediar o efeito do FGFb no aumento da neuritogênese (Shitaka *et al.*, 1996). Em nosso sistema a nifedipina, bloqueador de canais de cálcio do tipo L, não conseguiu inibir o efeito do FGFb. Este resultado nos sugeriu que estes canais não estejam participando do efeito do FGFb nas culturas de células retinianas.

A proteína quinase C (PKC) é uma serina/treonina que classicamente depende de Ca^{2+} e encontra-se em altas concentrações em tecidos

neurônais. Esta proteína está envolvida na regulação de diversos eventos celulares como proliferação e diferenciação mediada por várias citocinas e fatores de crescimento (Roisin e Barbin, 1997). Quando ativa, a PKC fosforila resíduos de serina e treonina em proteínas alvo, as quais incluem histonas, substratos de cinases C ricos em alanina (MARCKS) e Raf (Cross *et al.*, 2000). Utilizamos o cloreto de queleritrina para verificarmos o papel da PKC em nosso sistema e observamos que essa droga foi capaz de inibir completamente o efeito do FGFb, sugerindo o envolvimento da PKC na neuritogênese induzida por esse fator.

O cálcio é um mensageiro intracelular envolvido em vários eventos celulares como proliferação e diferenciação celular. Além disso, os níveis intracelulares de cálcio são capazes de regular várias vias de sinalização ativadas por diferentes fatores (Franklin e Johnson, 1994). Sabedores desses efeitos e de que algumas isoformas de PKC dependem de cálcio para serem ativadas, resolvemos testar o BAPTA-AM, um quelante de cálcio intracelular. Os resultados deste estudo demonstrou claramente que não é necessário haver um aumento na concentração intracelular de cálcio para que o FGFb induza o crescimento dos processos. Então, possivelmente a isoforma de PKC que medeia o efeito do FGFb é independente de cálcio.

Uma isoforma de PKC independente de Ca^{2+} é a PKC δ . A sobrevivência, em células PC12, promovida pelo FGFb envolve essa isoforma de PKC pois células expressando fragmento dominante negativo de PKC δ não

apresentam aumento da sobrevivência com o tratamento com FGFb (Wert e Palfrey, 2000). Por este motivo pretendemos analisar se o efeito do FGFb é mediado pela ativação desta enzima tanto através da utilização de inibidores farmacológicos da PKC δ como através da marcação imunocitoquímica desta enzima em sua forma ativa.

Cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) são ativadas por mitógenos e por fatores de crescimento e estão principalmente envolvidas na proliferação e diferenciação celular (Lambeng *et al.*, 2003). Algumas classes de proteínas regulam positivamente o crescimento axonal, muitas delas ativam a cascata de sinalização MAPK/ERK. O FGFb é capaz de ativar a ERK em neurônios embrionários da retina de pinto, ocasionando o crescimento de neuritos (Perron e Bixby, 1999). Corroborando estes resultados experimentais, o efeito do FGFb em células da retina de rato em cultura foi totalmente bloqueado pelo PD 98059, sugerindo a importância da via da MEK neste fenômeno.

A PKC é capaz de ativar a via da MEK (Wert e Palfrey, 2000) e nossos resultados revelam o bloqueio completo do efeito do FGFb pelos inibidores da PKC e da MEK. Um estudo demonstra o envolvimento dessas vias na sobrevivência celular e que a ativação da MEK não depende da PKC, porém bloqueadores dessas vias inibem apenas parcialmente o efeito mediado pelo FGFb (Wert e Palfrey, 2000). Seria possível, em nosso sistema, que a PKC se comunicasse com a via da MEK desencadeando eventos celulares que culminariam

no aumento no crescimento dos processos. Porém, para afirmar tal relação mais estudos precisam ser realizados.

A cinase p38 é ativada principalmente por citocinas pró-inflamatórias, hiperosmolaridade e outros estresses celulares e está envolvida preferencialmente com morte celular por apoptose (Lambeng *et al.*, 2003). Dados da literatura mostram que o FGFb é capaz de ativar a via da p38. Foi demonstrado que a extensão de processos astrogliais induzida pelo FGFb é precedida por uma modesta ativação da p38 e o bloqueio dessa proteína acarretou no aumento do crescimento de processos e potencializou muito o efeito do FGFb (Heffron e Mandell, 2005). Em nossa preparação observamos que apenas com o bloqueio da p38 houve um aumento no número de células que apresentavam processos em nossas culturas. Já quando inibimos a p38 e adicionamos FGFb houve um efeito ainda maior sobre o número de células com processos. Isso sugere uma possível auto-regulação do FGFb. Poderíamos especular que o FGFb ativasse a via da p38 e este efeito regularia o efeito do FGFb sobre o crescimento dos processos. Futuramente pretendemos analisar se o FGFb ativa simultaneamente a via da p38 e da MEK.

Estudos anteriores de nosso laboratório revelam que o efeito do FGFb na proliferação é parcialmente bloqueado pela tirfostina, inibidor de receptores EGF. Testamos esse mesmo inibidor para verificarmos o envolvimento dos receptores para EGF no efeito do FGFb. Observamos que a tirfostina não inibiu

o efeito do FGFb, sugerindo que os receptores para EGF não estejam mediando o efeito do FGFb.

Em nosso estudo demonstramos o envolvimento das proteínas tirosina cinase, Src, PI3-cinase, PKC e MEK no efeito mediado pelo FGFb. Como os inibidores dessas proteínas inibiram completamente o efeito do FGFb, possivelmente há comunicação sequencial dessas vias para desencadear o aumento no crescimento dos processos. Porém mais estudos precisam ser realizados para analisarmos melhor a possível comunicação entre as vias de sinalização ativadas pelo FGFb em nossas culturas.

6 – CONCLUSÃO

Baseados em nossos resultados, podemos concluir que:

- O FGFb é capaz de aumentar o número de células que emitem neuritos maiores que o corpo celular sem alterar o número total de células;
- Esse efeito já é evidente em 24 horas e o perfil das culturas em relação a neuritogênese permanece o mesmo em 48 e 72 horas;
- As proteínas tirosina cinases bem como as vias da MEK, PI3-cinase, PKC e Src estão envolvidas no efeito do FGFb;
- O efeito do FGFb parece não depender de canais de cálcio do tipo L nem do aumento de cálcio intracelular;
- Os receptores para EGF não estão envolvidos no aumento da neuritogênese induzido pelo FGFb.
- O inibidor da MAP cinase p38 (SB 202190) aumenta a quantidade de células com neuritos maiores que o corpo celular e há uma somação dos efeitos quando SB é incubado com FGFb.

7 – PERSPECTIVAS FUTURAS

- Pretendemos num futuro próximo analisar se os processos que crescem em resposta ao FGFb são de natureza dendrítica ou axonal, além de caracterizar a população ou as populações que estão respondendo a este fator trófico.
- Identificar qual isoforma de PKC não dependente de Ca^{2+} está envolvida no efeito do FGFb.
- Analisar o envolvimento da JNK no efeito do FGF.
- Verificar se o FGFb é capaz de ativar a MAP cinase p38 em nosso sistema.
- Analisar a convergência das vias da Src, MEK, PI3K e PKC, visto que inibidores destas vias inibem completamente o efeito do FGFb.
- Identificar a influência do soro fetal bovino no aumento da neuritogênese induzida pelo FGFb.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRACCHIO, M.P., CERUTI, S., LANGFELDER, R., CATTABENI, F., SAFFREY, M.J, BURNSTOCK, G. (1995). Effects of ATP analogues and basic fibroblast growth factor on astroglial cell differentiation in primary cultures of rat striatum. *Int. J. Devl. Neuroscience*. V. 13 (7), p. 685-693.

ABE K., SAITO H. (2001). Effects of fibroblast growth factor on central nervous system functions. *Pharm. Research*. V. 43, p. 307-312.

ADLER, R. (1993). Determination of cellular types in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* V. 24, p. 1677-1682.

BACKHAUS, R., ZEHE C., WEGEHINGEL., S., KEHLENBACH A., SCHWAPPACH B., NICKEL W. (2003). Unconventional protein secretion: membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *Journal of Cell Science* V.117, p. 1727-1736.

BARON, W., DE JONGE, J. C., de VRIES, H., HOEKSTRA, D. (1998). Regulation of oligodendrocyte differentiation: Protein Kinase C activation prevents differentiation of O2A progenitor cell towards oligodendrocytes. *Glia*. V. 22. p. 121-129.

- BARON, W., METZ, B., BASAL, R., HOEKSTRA, D., DE VRIES, H. (2000). PDGF and FGF-2 signaling in oligodentocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiply intracellular signaling pathways. *Mol. and Cellular Neuroscience*. V. 15, p. 314-329.
- BASILICO, C., MOSCATELLI, D. (1992). The FGF family of growth factors and oncogenes. *Advances in Cancer Resarch*, V. 39, p. 115-161.
- BAYATTI, N., ENGELE, J. (2002). Cyclic AMP differentially regulates the expression of fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors in culture cortical astroglia. *Neuroscience*. V. 14 (1), P. 81-89.
- BECK, K. D. (1994) Functions of Brain-derived neurotrophic factor, insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Progress in Neurobiology*. V. 44, p 497-516.
- BIKFALVI, A., KLEIN, S., PINTUCCI, G., RIFKLIN, D.B. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *End. Rev.* V. 18, p. 26-45.
- BOILLY, B. VERCOUTTER-EDOURT, A.S., HONDERMARCK, H. NURCOMBE, V., LE BOURHIS, X. (2000). FGF signals for cell proliferation

and migration through different pathways. *Cytokines e Growth Factor Reviews*. V. 11, p. 295-302.

BURCHILL, S. A., WESTWOOD, G. (2002). Mechanism of basic fibroblast growth factor-induced cell death. *Apoptosis*. V. 7, p. 5-12.

CAMPOCHIARO P. A., CHANG M., OHSATO M., VINORES S. A., NIE Z., HJELMELAND L., MANSUKHANI A., BASILICO C., ZACK D. J. (1996). Retinal degeneration in transgenic mice with photoreceptor-specific expression of a dominant-negative fibroblast growth factor receptor. *J. Neurosci*. V. 16, p. 1679-1688.

CEPKO, C.L. (1993). Retinal cell fate determination. In: *Pog. Retinal Res*. V. 12, p. 1-12.

CROSS, T. G., SCHEEL-TOELLNER, D., HENRIQUEZ, N. V., DEACON, E., SALMON, M., LORD, L. M. (2000). Serine-threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res*. V. 256, p. 34-41.

DAHL J. P., BINDA A., CANFIELD V A., LEVENSON R. (2000). Participation of Na,K-ATPase Secretion: Rescue of ouabain-inhibitable FGF-2 Secretion by

ouabain-resistant Na,K-ATPase α subunits. *Biochemistry*. V. 39 (48), p. 14877-14883.

DELEHEDDE, M., SEVE, M., SERGEANT, N., WARTELL, L., LYON, M., RUDLAND, P.S., FRENING, D.G. (2000). Fibroblast growth factor-2 stimulation of p42/44 MAPK phosphorylation and ikappa B degradation is regulated by heparan sulfate/heparin in rat mammary fibroblasts. *Journal Biological Chemistry*. V. 275, p. 33905-33910.

DELRIEU, I. (2000). The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism *FEBS Letters*. V. 468(1), p. 6-10.

DOWLING, J.E. (1991). Retina. *Enc. Human Biol*. V. 6, p. 615-631.

DOWD, C.J. CONNEU, C.L., NUGENT, M.A. (1999). Heparan sulfate mediates FGFb transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. *J. Biol. Chem*. V. 274, p. 5236-5244.

ENGELE, J., BOHN, M. C. (1991). The neurotrophic effects of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons *in vitro* are mediated by mesencephalic glia. *J. Neurosci*. V. 11, p. 3070-3078.

FAKTOROVICH E. G., STEINBERG R. H., YASUMURA D., MATTHES M. T.,
and LA VAIL M. M. (1992). Basic fibroblast growth factor and local injury
protect photoreceptors from light damage in the rat. *J. Neurosci.* V. 12, p.
3554-3567.

FERRARI, G., MINOZZI, M.C., TOFFANO, G. LEON, A., SKAPER, S.D. (1989).
Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of
mesencephalic neurons in culture. *Devl. Biol.* V. 133, p. 140-147.

FLOKIEWICZ R.B., ANCHIN J., BAIRD A., (1998). The Inhibition of Fibroblas
Growth Factor-2 Export by cardenolides implies a novel Funcion for Catalytic
Subunit of Na⁺, K⁺-ATPase. *The Jornal of Biological Chemistry.* V. 273, p.
544-551.

FOLKMAN, J., KLAGSBRUN, M. (1987). Angiogenic factors. *Science*, V. 235, p.
442-447.

FONTAINE V., KINKL N., SAHEL J., DREYFUS H., HICKS D. (1998). Survival
of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast
growth factor-2. *J. Neurosci.* V. 18, p. 9662-9672.

- FRANKLIN, J.L., JOHNSON, J. E. M. (1994). Block of neural apoptosis by a sustained increased of steady-state free Ca²⁺ concentration. *Phil. Trans. R. Soc. V. 245*, p. 251-256.
- GAO, H, HOLLYFIELD, J.G. (1995). Basic fibroblast growth factor in retinal development: differential levels of FGFb expression and content in normal and retinal degeneration (rd) mutant mice. *Developmental Biology. V. 169*, p. 168-184.
- GONZALEZ-FERNANDEZ, F., VANNIEL, E., EDMONDS, C., BEAVER, H., NICKERSON, J. M., GARCIA-FERNANDEZ, J. M., CAMPOCHIARO, P. A., FOSTER, R.G. (1993). Differential Expression of Interphotoreceptor Retinoid-binding Protein, Opsin, Cellular Retinaldehyde-binding Protein, and Basic Fibroblastic Growth Factor. *Experimental Eye Research, V. 56*, p.411-427.
- GOUSTIN, A.S., LEOF, E.B., SHIPLEY, G.D., MOSES, H.L. (1986). Growth factors and cancer. *Cancer Res. V. 46*, p. 1015-1029.
- GREMO, F., PRESTA, M. (2000). Role of fibroblast growth factor-2 in human brain: a focus on development. *International Journal of Developmental Neuroscience. V.18*, p. 271-279.

GROTHE, C., WEWETZER, K. (1996). Fibroblast growth factor and its implications for developing and regenerating neurons. *Int. J. Dev. Biol.* V. 40, p. 403-410.

HARADA T., HARADA C., KOHSAKA S., WADA E., YOSHIDA K., OHNO S., MAMADA H., TANAKA K., PARADA, L. F., WADA K. (2002). Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *The Journal of Neuroscience.* V. 22 (21), p. 9228-9236.

HARADA T., HARADA C., NAKAYAMA N., OKUYAMA S., YOSHIDA K., KOHSAKA S., MATSUDA H., WADA K. (2000). Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron.* V. 16, p. 533-541.

HEFFRON D. S., MANDELL J.W. (2004). Opposing roles of ERK and p38 MAP kinases in FGF2-induced astroglial process extension. *Molecular and Cellular Neuroscience.* V. 28, p. 779-790.

HOLLBORN, M., JAHN, K., LIMB, G. A., KOHEN, L., WIEDEMANN, P., BRINGMANN, A., (2004). Characterization of the basic fibroblast growth factor-evoked proliferation of the human Müller cell line, MIO-M1. *Graefes Arch Clin. Exp. Ophthalmol.* V. 242. p. 414-422.

- ITO, M., (2003). Insulin or bFGF and C2 ceramide increase newborn rat retinal ganglion cell survival rate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 301, p.564-571
- ITOH, N., ORNITZ, D. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *TRENDS in Genetics*. V. 20 (11), p. 563-569.
- KIM, I., MOON, S., YU, K., KIM, U., KOH, G. Y. (2001). Novel fibroblast growth factor receptor-5 Preferentially expressed in the pancreas. *Biochim Biophys Acta*. V. 1518, p. 152-156
- KINKL, N., HAGEMAN, G. S., SAHEL, J., HICKS, D. (2002). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) and candidate signaling molecule distribution within rat and human retina. *Molecular Vision*. V. 8, p. 149-160.
- KINKL, N., SAHEL, J, HICKS, D. (2001). Alternate FGF2-ERK1/2 signaling pathways in retinal photoreceptor and glial cells in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 276, p. 43871-43878.
- KLIMASCHEWSKI, L., NINDL, W., FEURLE, J., KAVAKEBI, P., KOSTRON H. (2004). Basic fibroblast growth factor isoforms promote axonal elongation

and branching of adult sensory neurons *in vitro*. *Neuroscience*, V. 126, p. 347-353

KLUMP, S., KRIHA, D., BECHMANN, G., MAABEN, A., MAIER, S., PALLAST, S., HOELL, P., KRIEGLSTEIN J. (2006). Phosphorylation of the growth factors bFGF, NGF and BDNF: A requisite for their biological activity. *Neurochemistry International*. V. 48 p. 131-137.

KNÜSEL B. MICHEL P. P., SCHWABER J., HEFTI F. (1990). Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and the insulin-like growth factor. *J. Neurosci*. V. 10, p. 558-570.

KREJCI, P., BRYJA, V., PACHERNIK, J., HAMPL, A., POGUE, R., MEKIKIAN, P., WILCOX, W. R. (2004) FGF2 inhibits proliferation and alters the cartilage-like phenotype of RCS cells. *Experimental Cell Research*, V. 297, p.152-164.

LAMBENG, N., WILLAIME-MORAWEK, S., MARIANI, J., RUBERG, M., BRUGG, B. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase pathways during the death of PC12 cells is dependent on the state of differentiation. *Molecular Brain Research*, V. 111, p. 52-60.

LASKOWSKI A., SCHMIDT W., DINKEL K., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ M., REYMANN K. (2005). bFGF and EGF modulate trauma-induced proliferation and neurogenesis in juvenile organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research*. V. 1037(1-2), p. 78-89.

LUDIN L., RÖNNSTRAND L., CROSS M., HELLBERG C., LINDAHL U., CLAESSION-WELSH (2003). Differential tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 and receptor proximal signal transduction in response to FGF-2 and heparin. *Experimental Cell Research*. V. 287, p. 190-198.

MA, W., LI, B. S., MARIC, D., ZHAO, W.Q., LIN, H.J., ZHANG, L., PANT, H.C., BARKER, J.L. (2003). Ethanol blocks both basic fibroblast growth factor and carbachol-mediated neuroepithelial cell expansion with differential effects on carbachol signalin pathways. *Neurosci*. V. 11, p. 37-47.

MAHER P. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *J. Biol. Chem*. V. 274, p. 17491-17498.

MASCARELLI, F., RAULAIS, D., COUNIS, M.F., COURTOIS, Y. (1987). Characterization of acidic and basic fibroblast growth factors in brain, retina

and vireous of the chick embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 146, p. 478-486.

MENA M. A., CASAREJOS M. J., GIMENÉZ-GALLEGO G., GARCIA DE YEBENES J. (1995). Fibroblast growth factors: structure-activity on dopamine neurons *in vitro*. *Journal of Neural Transmission.* V. 9, p. 1-14.

MEYER-FRANKE, M.R., KAPLAN, F.W., PFRIEGER, F.W., BARRES, B.A. (1995). Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron.* V. 15, p. 805-819.

MOHAMMADI, M., OLSEN, S. K., IBRAHIMI, O. A. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine e Growth Factors Reviews.* V. 16, p. 107-137.

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

NUGENT, M.A., IOZZO, R.V. (2000). Fibroblast growth factor-2. *The International Journal of Biochemistry e Cell Biology.* V. 33, p. 115-120.

- OLWIN, B.B., HAUSCHKA, S.D. (1990). Fibroblast growth factor receptor levels decrease during chick embryogenesis. *The Journal of Cell Biology*. V. 110, p. 503-509.
- ORNITZ, D. M., ITOH N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology*. V. 2. p. 3005.1-3005.12.
- PAPPAS I. S., PARNAVELAS J.G. (1997). Neurotrophins and basic fibroblast growth factor induce the differentiation of calbindin-containing neurons in the cerebral cortex. *Exp Neurol*. V.144, p. 302-314.
- PARK, C.M., HOLLENBERG, M.J. (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Developmental Biology*. V. 134, p. 201-205.
- PERRON, J.C., BIXBY, J. L. (1999). Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation. *Molecular and Cellular Neuroscience*. V. 13. p. 362-378.
- PYE, D. A., KUMOR, S. (1998). Endothelial and Fibroblast Cell-Derived Heparan Sulphate Bind with Differing Affinity to Basic Fibroblast Growth Factor *Biochemical and Biophysical Research Communications*, V. 248, p. 889-895.

- QI, J., MATSUMOTO, T., HUANG, K., OLAUSSON, K., CHRISTOFFERSON R., CLAESSION-WELSH L. (1999). Phosphoinositide 3 kinase is critical for survival, mitogenesis and migration but not for differentiation of endothelial cells. *Angiogenesis*. V. 3, p. 371-380.
- REUSS B., DONO R., UNSICKER K. (2003). Functions of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF-5 in astroglial differentiation and blood-brain barrier permeability: evidence from mouse mutants. *The Journal of Neuroscience*. V. 23, p 6404-6412.
- REUSS, B., HALBACH, O. B. (2003). Fibroblast growth factor and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Reseach*. V. 313, p. 139-157.
- RIDYARD, M. S., ROBBINS S. M. (2003). Fibroblast growth factor-2 induced signaling through lipid rafts-associated fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2). *The Journal of Biological Chemistry*. V. 278, p. 13803-13809.
- ROISIN, M. P., BARBIN, G. (1997). Differential expression of PKC isoforms in hippocampal neural cultures: modifications after basic FGF treatment. *Neurochem. Int*. V. 30, p. 261-270.
- RODIECK, R.W. (1998). Cell types. The first steps in seeing.p. 225-265.

- ROSENTHAL, R., THIEME, H., STRAUSS, O. (2001). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in brain neurons and retinal pigment epithelial cell act via stimulation of neuroendocrine L-type channels (Cav 1.3). *The FASEB Journal*. V.15, p. 970-977.
- RUSSEL, C. (2003). The roles of hedgehogs and fibroblast growth factors in eye development and retinal cell rescue. *Vision Research*. V. 43, p. 899-912.
- SHITAKA Y., MATSUKI N, SAITO H., KATSUKI H. (1996). Basic fibroblast growth factor increases functional L-type Ca²⁺ channels in fetal rat hippocampal neurons: implications for neurite morphogenesis *in vitro*. *The Journal of Neuroscience*. V. 16, p. 6476-6489.
- SLEEMAN, M., FRASER, J., MCDONALD, M., YUAN, S., WHITE, D., GRANDISON, P., KUMBLE, K., WATSON, J.D., MURISON, J.G. (2001). Identification of new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene*, V. 271, p. 717-182.
- SMITH J. A., MADDEN T., VIJESWARAPU M., NEWMAN R. (2000). Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. *Biochemical Pharmacology*. V. 62, p. 469-472.

- SPORN, M. B., ROBERTS, A. B., LALAGE, M., WAKEFIELD, M., DECROMBRUGGHE, B. (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* V. 105, p 1039-1045.
- TCHENG, M., OLIVER, L., COURTOIS, Y., JEANNY, J.C. (1994). Effects of Exogenous FGFs on Growth, Differentiation, and Survival of Chick Neural Retina Cells. *Experimental Cell Research*, V. 212, p. 30-35.
- TURNER, C. A., AKIL, H., WATSON, S. J., EVANS, S. J. (2006). The Fibroblast growth factor system and mood disorders. *Biol. Psychiatry*.V.59, p1128-1135.
- UGOLINI, G., CREMISI, F., MAFFEI, L. (1995). TrkA, TrkB and p75 m RNA expression is developmentally regulated in the rat retina. *Brain Res.* V. 704, p. 121-124.
- VON BARTHELD, C.S. (1998). Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol. Histopathol.* V.13, p.437-459.
- WALSH, N., VALTER, K., STONE, J. (2001). Subcellular and developmental expression of alternatively spliced forms of fibroblast growth factor 14. *Mechanism of Development.* V. 90, p. 283-287.

- WEBBER, C. A., CHEN, A. A., HEHR C. L., JOHNSTON, J., MCFARLANE. (2005). Multiply signaling pathways regulate FGF-2-induced retinal ganglion cell neurite extension and growth cone guidance. *Molecular and Cellular Neuroscience*. V. 30, p. 37-47.
- WERT, M., PALFREY, H. C. (2000). Divergence in the anti-apoptotic signalling pathways used by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor (bFGF) in PC12 cells: rescue by bFGF involves protein kinase C δ . *Biochemical Society*. V. 352, p. 175-182.
- WIEDLOCHA, A., SORENSEN V. (2004) Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*V. 286, p. 45-79.
- WILLIAMS, E., METTAL, B., WALSH F., DOHERTY, P. (1995). A Ca²⁺/calmodulina kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Molecular and Cellular Neuroscience*, V.6, p. 69-79.
- YAU, K.W. (1994). Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. *Inv. Ophthalmol. Vis, Sci*. V. 35, p. 9-32.
- ZHANG, C., TAKAHASHI, K., LAM, T.T., TSO, M.O.M. (1994). Effects of basic fibroblast growth factor in retinal ischemia. *Investigative Ophthalmology e Visual Science*. V. 35 (8), p. 3163-3168.

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](#)