



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



**GUSTAVO MATARUNA DA SILVA**

**IL- MODULA A RESPOSTA PROLIFERATIVA INDUZIDA  
POR FGFb EM CÉLULAS DA RETINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE VISANDO À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM NEUROIMUNOLOGIA**

Orientadora: Elizabeth Giestal de Araujo

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**

**2 6**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**GUSTAVO MATARUNA DA SILVA**

**IL- MODULA A RESPOSTA PROLIFERATIVA INDUZIDA POR FGFb EM CÉLULAS DA RETINA.** Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Hertha Meyer do Departamento de Neurobiologia, Instituto de Biologia – UFF

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

Orientadora: Elizabeth Giestal de Araujo

**NITERÓI**

**2 6**

S 581 Silva, Gustavo Mataruna da  
IL-4 modula a resposta proliferativa induzida por FGFb  
em células da retina/Gustavo Mataruna da Silva □ Niterói-  
RJ,:[s.n.], 2006.

79 f:il.

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

1. Retina animal. 2. Fator de crescimento de fibroblasto  
básico. 3. Interleucina-4. 4. Proliferação celular. I. Título.

CDD 591.48

"Para descobrir novos caminhos é preciso sair dos trilhos."

Albert Einstein.

**GUSTAVO MATARUNA DA SILVA**

**IL- MODULA A RESPOSTA PROLIFERATIVA INDUZIDA  
POR FGF $\beta$  EM CÉLULAS DA RETINA**

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

Aprovada em setembro de 2006

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Karin da Costa Calaza  
UFF

---

Dr. Ricardo Augusto de Mello Reis  
UFRJ

---

Dr. Roberto Paes de Carvalho  
UFF

**REVISOR E SUPLENTE**

---

Dr. Luiz Roberto Leão Ferreira  
UFF

NITERÓI  
2006

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Wilson e Ercilea, que sempre me deram muito apoio e tiveram muita paciência e atenção com a minha educação. Agradeço muito a Deus por vocês.

Ao meu irmão Fabiano por também ter me incentivado.

A minha noiva Cleide pelo apoio e paciência nos momentos difíceis. Te amo!

A minha orientadora Beth, exemplo de dedicação profissional, excelente amiga, a quem considero minha segunda mãe. Muito obrigado.

Aos professores Chico, Charlotte e Ronald, que acima de tudo são grandes amigos.

A minha grande amiga Carla que tem me aturado por todos estes anos e tido muita paciência comigo. Não tenho palavras para te agradecer.

Aos amigos Thiago, Juliana e Marcelinho (fofucho) que me acompanham desde a graduação.

A todos amigos do laboratório Aline, Andreza, Babu, Karinne, Raphael (Fafá, Rorô, João, Talibã, Carmen, Membrana, Sahyd, Label, Slave...), Ellen, Daniel Caroline, Patrícia, Simone, Tatiana e Lucienne. Obrigado pelos momentos de boas risadas.

## SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviaturas.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
↑ INTRODUÇÃO.....	1
↑↑ HISTÓRICO.....	1
↑2 FGFs NO SISTEMA NERVOSO.....	4
↑3 FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO BÁSICO.....	7
↑ RECEPTORES PARA OS FGFs.....	11
↑. ↑ Receptores de alta afinidade.....	11
↑. 2 Proteoglicanas sulfato de heparan (HSPG ).....	13
↑. 3 Sinaliza ao celular via FGFRs.....	14
↑5 DIFERENTES AÇÕES DO FGFb.....	16
↑5.↑ FGFb na proliferação.....	16
↑5.2 FGFb na diferenciação.....	17
↑5.3 FGFb na sobrevivência.....	18
↑6 RETINA.....	20
↑6.↑ FGFb na retina.....	23
2 OBJETIVOS.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.↑ Materiais.....	29
3.2 Cultura de células da retina.....	29
3.3 Incorporação de [ <sup>3</sup> H]- timidina.....	30
3. Fotomicrografia das células.....	31
3.5 Análise estatística dos resultados.....	31
RESULTADOS.....	32
↑ Perfil de proliferação das células da retina <i>in vitro</i> .....	32
2 Efeito proliferativo do FGFb é dose e tempo dependente.....	33
3 Morfologia das células tratadas com FGFb.....	35
. Efeito do FGFb independente da presença de soro fetal bovino no meio.....	37
.5 FGFb induz proliferação em culturas de até 5 dias.....	41
.6 Interleucina- potencializa o efeito proliferativo induzido pelo FGFb...	43
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÃO.....	58
/ PERSPECTIVAS PARA O DOUTORADO.....	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AMPc:** 3`5`-adenosina monofosfato cíclico  
**BFA:** brefeldina A  
**CHAT:** colina acetiltransferase  
**CMF:** solução salina sem cálcio e magnésio  
**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono  
**DNA:** ácido desoxirribonucléico  
**ERK:** quinases reguladas por sinais extracelulares  
**FCS:** soro fetal bovino  
**FGFa ou FGF- $\alpha$ :** fator de crescimento de fibroblasto ácido  
**FGFb ou FGF- $\beta$ :** fator de crescimento de fibroblasto básico  
**FGFR:** receptor com atividade tirosina quinase para os FGFs  
**FRS<sub>2</sub>:** substrato 2 do receptor FGF  
**GCL:** camada de células ganglionares  
**GPI:** ligação glicosil-fosfatidilinositol  
**HSPG:** proteoglicana sulfato de heparan  
**Ig:** imunoglobulina  
**IL- $\alpha$ :** interleucina 1 $\alpha$   
**IL- $\beta$ :** interleucina 1 $\beta$   
**IL-4:** interleucina 4  
**IL-8:** interleucina 8  
**INL:** camada nuclear interna  
**IPL:** camada plexiforme interna  
**JAK:** família de proteínas tirosina quinases associadas a receptores de citocinas, chamadas de Janus quinases (um grupo que inclui as seguintes quinases: JAK1, JAK2, JAK3 e TyK2)  
**M $\alpha$ 199:** meio 199  
**MAPK:** proteína quinase ativadora de mitose  
**NaOH:** hidróxido de sódio  
**NGF:** fator de crescimento do nervo  
**NT-3:** neurotrofina-3  
**ONL:** camada nuclear externa  
**OPL:** camada plexiforme externa  
**P $\beta$ 5:** receptor de baixa afinidade para as neurotrofinas  
**PI:** ponto iselétrico  
**PI3:** inositol-3 fosfato  
**PI3K:** fosfatidilinositol-3 quinase  
**PKA:** proteína quinase A  
**PKC:** proteína quinase C  
**PLC $\gamma$ :** fosfolipase C $\gamma$   
**Ras:** subtipo monomérico de proteína ligante de nucleotídeos de guanina (proteína G) que auxilia na cascata de ativação das MAPKs  
**RNA:** ácido ribonucléico  
**RNAm:** ácido ribonucléico mensageiro  
**Ser:** serina

**Sh<sub>2</sub>**: domínio de homologia src

**Shc**: proteína semelhante ao colágeno com homologia src

**SN**: sistema nervoso

**SNC**: sistema nervoso central

**Src**: família de proteínas quinases nomeada a partir do produto do genev-src do vírus do sarcoma Rous

**STAT**: membros de uma família de fatores de transcrição denominados genericamente de transdutores de sinal e ativadores de transcrição

**TCA**: ácido tricloroacético

**TGF $\beta$** : fator de necrose tumoral  $\beta$

**Thr**: treonina

**Trk**: tirosina quinase

**TrKA**: tirosina quinase A

**TrkB**: tirosina quinase B

## Resumo

O fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb) é uma citocina multifuncional envolvida na proliferação, diferenciação e sobrevivência de uma grande variedade de tipos celulares de origem mesodérmica e neuro-ectodérmica. A maioria dos trabalhos sobre o FGFb tem focado as vias de sinalização que medeiam seus efeitos biológicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o efeito proliferativo promovido por esta citocina sobre as células da retina poderia ser influenciado pelo tratamento com IL-4 e se o tempo poderia alterar a resposta ao FGFb. Nossos dados mostram que o FGFb induz um aumento na incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina de modo dose e tempo dependente. Também observamos que após 5 dias *in vitro* as células retinianas ainda são capazes de responder ao FGFb 25ng/mL. Entretanto, essa responsividade não era mais observada em culturas de 7 dias. Quando as culturas eram tratadas com IL-4 50U/mL por 24h e então estimuladas com FGFb 25ng/mL por 48h, observamos um aumento no efeito do FGFb. Este efeito não foi atenuado pela adição de brefeldina A, sugerindo que a IL-4 não estava induzindo a translocação de receptores de FGF para a membrana plasmática. Nossos dados sugerem um provável papel da IL-4 controlando a responsividade de células retinianas ao FGFb.

## Abstract

Basic fibroblast growth factor (bFGF) is a multifunctional cytokine involved in proliferation, differentiation and survival of a broad spectrum of mesodermal and neuro-ectodermal cell types. Most investigations about bFGF have been focused on the signalling pathways that mediate its biological effects. The aim of this work was to evaluate if the proliferative effect promoted by this cytokine on retinal cells could be influenced by IL-4 treatment and if the time in culture could alter the response to FGFb. Our data show that bFGF induces an increase on [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation in a dose-and-time-dependent manner. We also observed that after 5 days *in vitro* retinal cells are still able to respond to 25ng/mL bFGF. However, this responsiveness was not observed in 7 day-old cultures. When cultures were treated with 50U/mL IL-4 for 24h and then stimulated with 25ng/mL bFGF for 48h we observed an increase in the FGFb effect. This effect was not attenuated by addition of 30ng/mL Brefeldin A, suggesting that IL-4 was not inducing a translocation of fibroblast growth factor receptors to the plasma membrane. Our data suggest a possible role of IL-4 controlling the responsiveness of retinal cells to FGFb.

## ↑ INTRODUÇÃO

## ↑↑ HISTÓRICO

Em 1973, Armelin demonstrou que o extrato de hipófise era capaz de induzir a proliferação de fibroblastos de camundongos (Armelin, 1973). No ano seguinte, Gospodarowicz conseguiu purificar, a partir de extrato de cérebro bovino, um fator protéico que tinha grande afinidade por heparina e que reproduzia os efeitos sobre fibroblastos até então obtidos por Armelin. Devido a esta característica, o peptídeo recebeu do autor o nome de fator de crescimento de fibroblasto (FGF). A purificação do FGF permitiu que fossem conhecidos o seu peso molecular (17-34KDa) e seu ponto isoelétrico (pI=9,6). Em seguida, foi isolado um outro polipeptídeo que apresentava ponto isoelétrico ácido e que também induzia a proliferação de fibroblastos. À medida que os estudos avançavam, verificou-se a existência de duas formas do FGF, a ácida (FGFa ou FGF-1) e a básica (FGFb ou FGF-2). Além disso, foi observado que estes fatores agiam sobre diferentes tipos celulares, tais como, neurônios, células gliais, condrócitos e células endoteliais (Basilico & Moscatelli, 1992 para revisão).

Sempre houve na literatura um grande interesse em se saber de que maneira células tumorais obtinham o suporte sanguíneo indispensável à sobrevivência e à proliferação. Com o avanço das pesquisas nesta área, observou-se que tumores eram capazes de induzir a angiogênese. Com a observação de que alguns dos fatores tumorais também apresentavam atividade mitogênica sobre células endoteliais e que tinham afinidade pela heparina, surgiu a hipótese do FGF ser um fator produzido por células tumorais. Posteriormente, um grupo de pesquisadores liderado por Judah

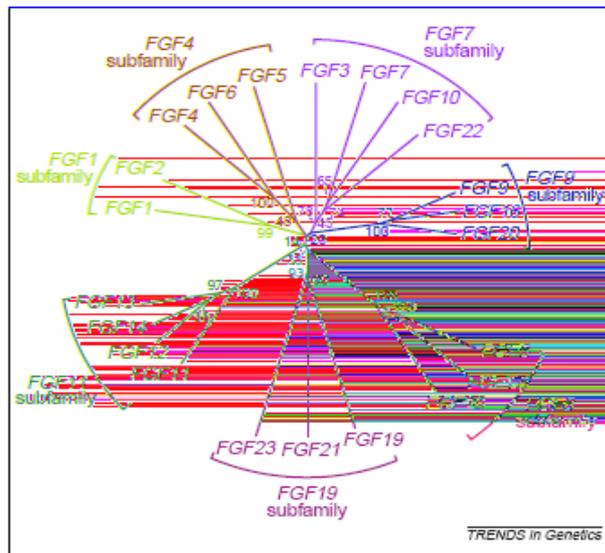
Folkman demonstrou que os tumores secretavam FGF e que esta era uma das moléculas responsáveis pela angiogênese. Esses dados contribuíram para estimular os estudos acerca dos FGFs nos processos neoplásicos e principalmente na elaboração de uma nova abordagem para terapia anti-câncer (Folkman & Klagsbrun, 1987 para revisão).

Desde 1985, a estrutura bioquímica do FGF ácido e do FGF básico é conhecida. O FGFb é um polipeptídeo de 155 aminoácidos e 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 dos genes codificantes, houve um avanço nas técnicas de estudo dos efeitos destas moléculas nos diferentes tecidos do organismo (Basilico & Moscatelli, 1992 para revisão).

Nas últimas três décadas, a maioria das pesquisas tem focado na interação dos FGFs com seus receptores e nos mecanismos de transdução de sinal resultante dessa interação, além da identificação de novos membros desta família. Até o presente momento, foram descritos 23 membros da grande família FGF. Após estudos filogenéticos, sugeriu-se a distribuição em 7 subfamílias: FGF-1, FGF-4, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-11 e FGF-19 (figura 1). Fato interessante é que o FGFb pode ser encontrado desde nematódios até humanos, o que evidencia a participação desta citocina no processo evolutivo das espécies (Itoh & Ornitz, 2004 para revisão).

Em estudos mais recentes investiga-se o potencial uso dos FGFs como uma ferramenta farmacológica a fim de reduzir a progressão de doenças

neurodegenerativas, cada vez mais presentes na clínica neurológica (Riva *et al.*, 2005 para revisão).



**Figura 1** Relação evolutiva entre os genes humanos da família FGF. Análise filogenética sugere a distribuição desses genes em 7 subfamílias, cada uma contendo de 2 a 4 membros. O tamanho das ramificações é proporcional à distância evolutiva entre cada gene.

(Itoh & Ornitz, 2004)

## 2 FGFs NO SISTEMA NERVOSO

No SNC adulto, o FGFa é encontrado em neurônios do núcleo oculomotor, ponte, núcleo geniculado lateral, formação reticular, substância nigra, tálamo, estriatum, córtex cerebral e hipotálamo. Ao contrário do FGFa, o fator de crescimento de fibroblasto básico é expresso tanto em neurônios quanto em células gliais, podendo ser localizado no colículo, tálamo, bulbo olfatório, córtex cerebral, substância nigra, estriatum e hipocampo (Reuss & von Bohlen Und, 2003 para revisão).

Os diferentes subtipos de FGFRs também são expressos no SNC adulto. FGFR-1, FGFR-2 e FGFR-3 são altamente expressos no diencéfalo e no telencéfalo e moderadamente no mesencéfalo e metaencéfalo. O FGFR-1 é predominante em neurônios, ao passo que FGFR-2 e FGFR-3 são encontrados primariamente em células gliais. O quarto receptor de alta afinidade (FGFR-4) é descrito como sendo expresso somente durante os estágios iniciais de desenvolvimento do sistema nervoso central numa região bem específica, o núcleo habenular lateral (Reuss & von Bohlen Und, 2003 para revisão).

Uma gama de trabalhos relata importantes papéis dos FGFs na neurogênese, diferenciação, arborização axonal e sobrevivência neuronal (Reuss & von Bohlen Und, 2003 para revisão). As primeiras evidências da atividade neurotrófica do FGFb surgiram em 1986 com Morrison e Walicke em trabalhos independentes, utilizando culturas primárias de neurônios corticais e hipocampais de ratos embrionários (Morrison *et al.*, 1986; Walicke *et al.* 1986). Quando estas células eram dissociadas e

plaqueadas morriam gradualmente. Entretanto, quando tratadas com FGFb havia um aumento na sobrevivência destes neurônios.

Tanto FGFa como o FGFb desempenham importante papel na sobrevivência, diferenciação, crescimento e resposta a danos em neurônios dopaminérgicos. A detecção de altas concentrações de FGFa e de seu RNAm na substância nigra de roedores, reforça o papel do FGFb sobre estas populações neuronais durante o desenvolvimento (Mena *et al.*, 1995). Park e Hollenberg em 1989 observaram que o FGFb era capaz de induzir a regeneração da retina após retinectomia em embrião de pinto no estágio 22-24 de desenvolvimento (Park & Hollenberg, 1989). O trabalho de Park e Hollenberg foi o pioneiro em apresentar um fator de crescimento capaz de induzir a regeneração retiniana *in vivo*.

Astrócitos tratados com FGFb apresentam um aumento na síntese e secreção de NGF, demonstrando que pode haver um mecanismo de retroalimentação positiva entre a estimulação pelo FGFb e a síntese de neurotrofinas (Beck, 1994). Outros autores demonstraram um aumento na proliferação e na diferenciação de astrócitos tratados com FGFb, sendo que os efeitos mitogênicos eram mediados pelo FGFR-1 (Bayatti & Engele, 2002). O efeito proliferativo *in vitro* do FGFb

heparan (HSPGs) presentes na lâmina basal e desta forma induz a regeneração de axônios que estejam em contato com esta estrutura (Boilly *et al.*, 2000).

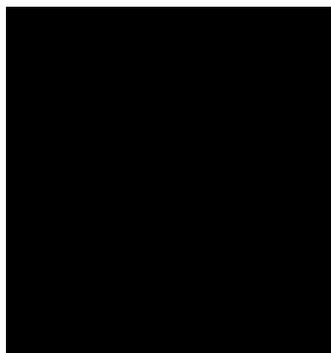
Com o crescente número de FGFs identificados, o papel destes no SNC ganhou importância, expandindo da influência clássica no desenvolvimento, reparo e proteção neuronal, para uma possível função no aprendizado e plasticidade neuronal. Tal papel foi atribuído pelo fato do FGFb ter a capacidade de modular a transmissão sináptica, promovendo a indução de potencial de longa duração (LTP), em fatias de hipocampo de rato adulto. Esse dado sugere que o FGFb module a transmissão sináptica excitatória de forma atividade-dependente (Abe & Saito, 2001 para revisão).

Evidências recentes sugerem que a expressão dos FGFs pode ser alterada em distúrbios do humor. Estudos *post-mortem* no córtex pré-frontal e cingulado, mostram que pacientes sofrendo de depressão severa apresentam uma significativa redução nos níveis de FGFs (FGFa e FGFb) e de seus receptores (FGFR-2 e FGFR-3) se comparados a pacientes controles (Riva *et al.*, 2005 para revisão).

O sistema FGF também pode ser modulado por tratamento com drogas psicotrópicas. É o caso de indivíduos com depressão recebendo inibidores seletivos da recaptção de serotonina. Estes indivíduos apresentam níveis de expressão de FGFb e FGFR-3 significativamente mais elevados que indivíduos deprimidos sem tratamento (Riva *et al.*, 2005 para revisão). Estes e outros resultados fornecem subsídios para a elaboração de uma nova abordagem terapêutica para as doenças psiquiátricas.

## **❧ FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO BÁSICO**

O FGFb ou FGF-2 é uma citocina multifuncional capaz de interferir no crescimento, diferenciação, migração, proliferação e sobrevivência de inúmeros tipos celulares. A exemplo de outros membros de sua família, ele se apresenta em múltiplas isoformas (18, 22, 22,5, 24 e 34 KDa) (Delrieu, 2000). Dentre estas, a mais estudada é a isoforma de 18 KDa que possui 155 aminoácidos, apresentando 4 resíduos cisteína sem pontes dissulfeto, um grande número de resíduos básicos (pI = 9,6) e dois sítios (Ser 64 e Thr 112) que podem ser fosforilados tanto pela proteína quinase A (PKA) como pela proteína quinase C (PKC). A estrutura tridimensional desta molécula é composta por 12 folhas  $\beta$ -pregueadas antiparalelas, dispostas em estrutura piramidal (Figura 2). O FGF-2 tem 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 & Iozzo, 2000).

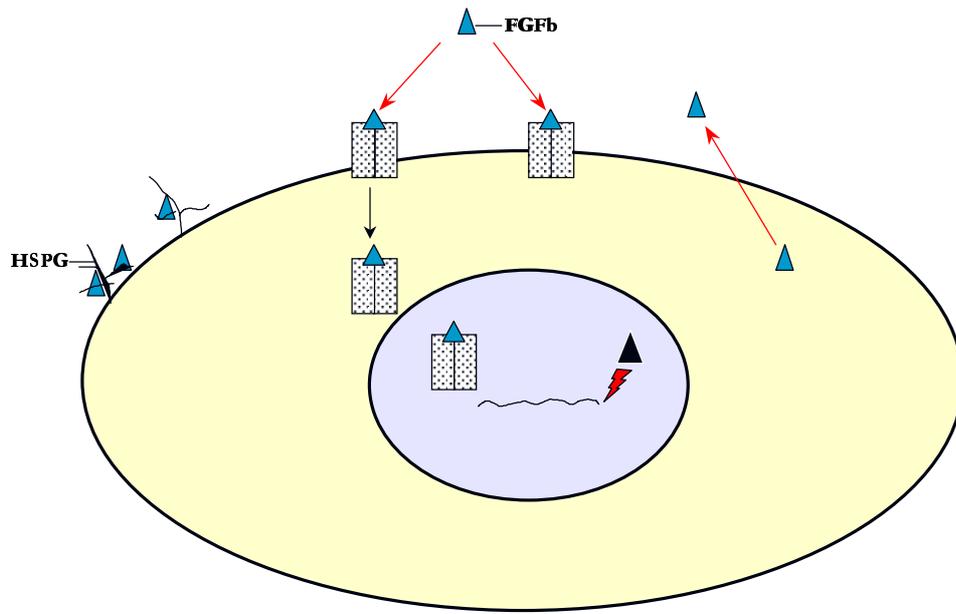


**Figura 2**· Estrutura tridimensional do FGFb. Sítio de ligação da heparina (rosa); resíduos de contato com o receptor de alta afinidade são mostrados em verde, azul e vermelho; folhas  $\beta$ -pregueadas numeradas em preto.

(Ornitz & Itoh, 2001)

Após a ligação do FGFb aos seus receptores de membrana (Figura 3) ocorre a internalização e a posterior degradação lisossomal. O FGFb ligado às proteoglicanas

sulfato de heparan pode sofrer internalização após a formação do complexo ternário (FGF-HSPG-FGFR) (Conrad, 1998). Apesar de haver degradação após a internalização, tem sido observada a presença de FGFb em frações nucleares de diferentes tipos celulares. A translocação do FGFb é dependente do ciclo celular e ocorre na transição de fases G1-S, parecendo mediar um aumento na atividade mitótica (Bifkalvi *et al.*, 1997 para revisão). Na década de 90 do século passado, estudos de imunofluorescência utilizando anticorpo contra FGFb mostraram a presença deste fator no núcleo de células endoteliais, astrócitos e oligodendrócitos. Tal fato pode ser explicado pela internalização da isoforma de 18KDa ou pela presença das isoformas de alto peso molecular (22, 22,5, 24 e 34KDa), que se localizam preferencialmente no núcleo celular (Delrieu, 2000). Sugere-se que tais isoformas desempenhem um papel regulatório na expressão de genes específicos (Delrieu, 2000).



ATPase que interagem com a subunidade  $\alpha$ , como por exemplo a ouabaína (Florkiewicz *et al.*, 1998). Nesta situação experimental foi observado o bloqueio da secreção do FGFb, evidenciando uma interação da subunidade  $\alpha$  com esta citocina. Estudos posteriores demonstraram que essa interação pode ocorrer com as três isoformas da subunidade  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) (Dahl *et al.*, 2000).

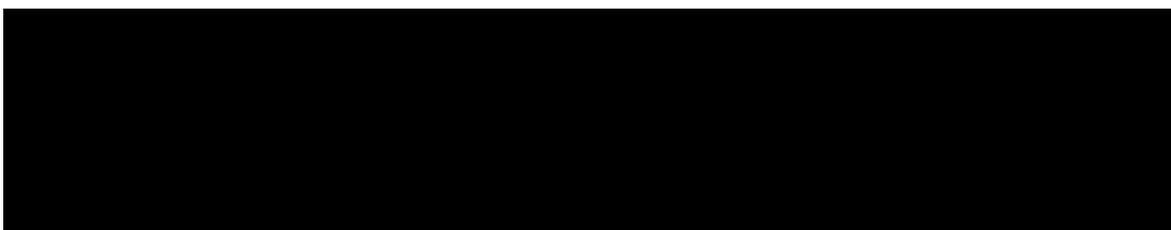
O FGFb pode ser encontrado tanto na matriz extracelular quanto na membrana basal. Nessas duas estruturas ele está associado às HSPGs (Dowd *et al.*, 1999). O FGFb também apresenta grande afinidade pela heparina. Esta última é produzida por mastócitos e está presente nos tecidos conjuntivos. A interação do FGFb com a heparina ou com a HSPG confere uma proteção contra a desnaturação tanto pela acidez como pelo calor, além de impedir a ação de proteases (Nugent & Iozzo, 2000).

A ligação do FGFb às HSPG ocorre de forma rápida e apresenta grande reversibilidade cinética, o que permite o armazenamento deste polipeptídeo nesta região (Nugent & Iozzo, 2000) e confere uma difusão rápida desta molécula através da matriz extracelular (Boilly *et al.*, 2000). Desta forma, tanto a matriz extracelular como a lâmina basal funcionam como regiões de estoque e de liberação do FGFb. Alterações na interação FGFb-HSPG podem induzir um aumento drástico na liberação de FGFb. Além disso, as HSPGs podem aumentar a afinidade do FGFb por seus receptores e facilitar a dimerização dos receptores (Nugent & Iozzo, 2000).

## 🚩 RECEPTORES PARA OS FGFs

### 🚩 🚩 Receptores de alta afinidade

As respostas celulares aos FGFs são mediadas pela ligação e ativação de uma família de receptores tirosina quinase (FGFRs) presentes na superfície celular. Como todos os receptores tirosina quinases, os quatro FGFRs (FGFR1-4) são compostos de um domínio extracelular com sítio para o ligante, uma região transmembrana e um domínio tirosina quinase formado por duas porções. A região extracelular apresenta três domínios imunoglobulina designados D-1, D-2 e D-3; uma região entre D1 e D2 apresentando de 7 a 8 resíduos ácidos, denominada caixa ácida; e por último uma região carregada positivamente em D2 na qual se ligam a heparina e as HSPGs (Eswarakumar & Schlessinger, 2005 para revisão) (Figura 4).



**Figura 4 - Estrutura esquemática do FGFR.**

Ig I (D1), Ig II (D2) e Ig III (D3) são os domínios imunoglobulina. O domínio tirosina cinase tem duas partes: um sítio catalítico e outro de ligação do ATP. AB: caixa ácida, TM domínio transmembrana.

Disponível em: <http://jorde-lab.genetics.utah.edu/people/reha/Reha.html>  
acesso em 1 mai 2006

Recentemente, um quinto receptor de alta afinidade foi identificado, o FGFR-5. Sendo expresso no cérebro, pulmões e preferencialmente no pâncreas. A peculiaridade desta proteína é não apresentar um domínio intracelular tirosina quinase. Entretanto, ela ainda apresenta 32% de homologia com os outros FGFRs. Sabe-se que ele

apresenta grande afinidade pelo FGFb, mas não pelo FGF-17. Especula-se que ele tenha papel na regulação de alguma função pancreática (Kim *et al.*, 2001; Sleeman *et al.*, 2001).

Uma importante característica da família FGFR é quanto à diversidade de isoformas geradas por *splicing* alternativos de transcritos de FGFRs. As diferentes isoformas incluem receptores com dois ou três domínios imunoglobulinas; receptores com alterações em D3 que modificam profundamente a especificidade aos ligantes. Também são encontrados isoformas de FGFRs solúveis em diversos fluidos biológicos, incluindo o sangue. A presença de tais receptores sugere uma função modulatória na atividade dos FGFs (Hanneken, 2001).

Os FGFR-1 (Flg) e FGFR-2 (Bek) possuem a mesma afinidade tanto para o FGFa quanto para o FGFb. Entretanto, o FGFR-3 apresenta maior afinidade pelo FGFa (Boilly *et al.*, 2000). Diversos membros da família dos FGFs têm afinidade pelo FGFR-4, mas cada um destes também pode se ligar a outros receptores, sendo exceção n

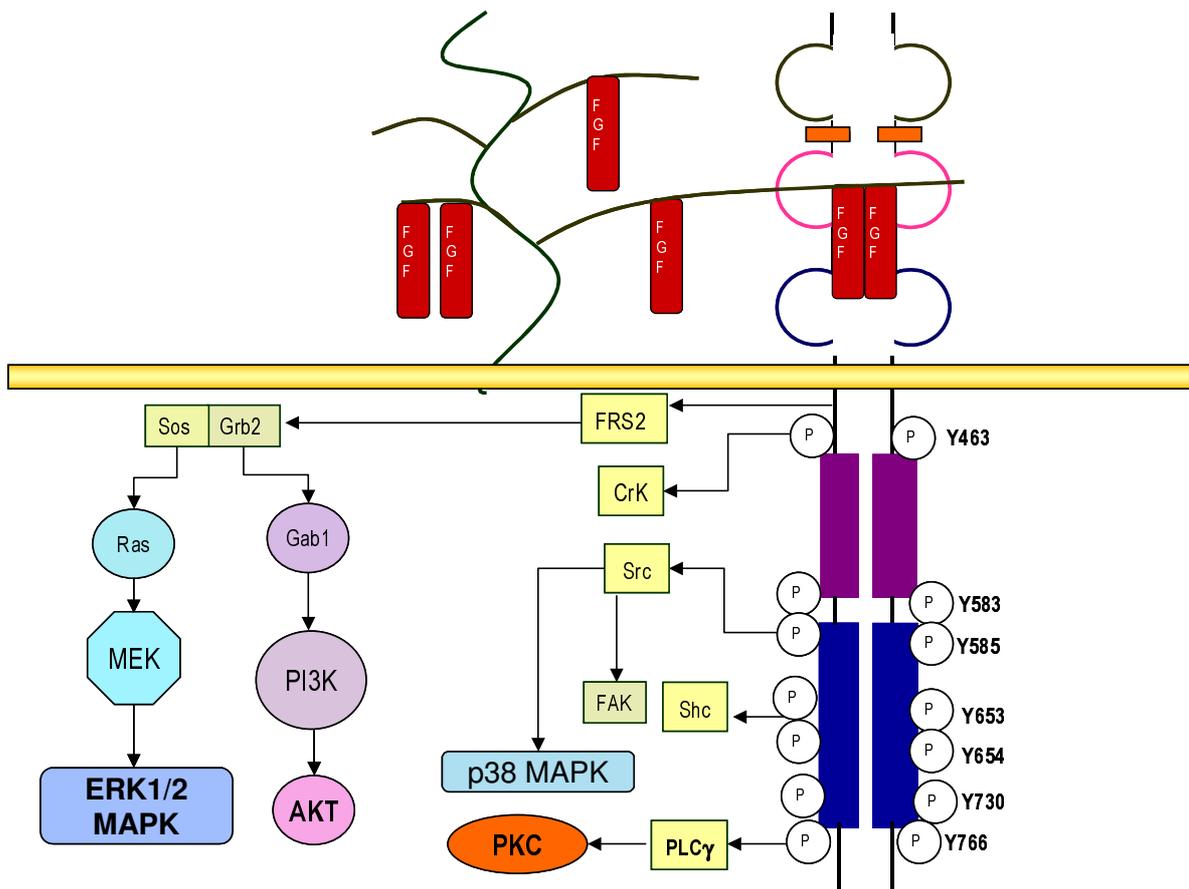
## ↑ .2 Proteoglicanas sulfato de heparan (HSPG )

As proteoglicanas são estruturas complexas localizadas predominantemente na superfície celular e na matriz extracelular de células eucarióticas. Elas consistem de um núcleo protéico e várias cadeias de carboidratos. O núcleo protéico pode ser (Lij 0 Tc 3.

### 3. Sinaliza ao celular via FGFRs

Após a formação do complexo ternário (FGF-sulfato de heparan-FGFR), ocorre a dimerização do receptor e a transfosforilação dos seus resíduos intracelulares de tirosinas. Os resíduos tirosinas fosforilados medeiam a ativação de proteínas que apresentam o domínio SH2, o qual reconhece a tirosina fosforilada. Essas proteínas podem apresentar atividade enzimática, como a fosfolipase  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ), ou são proteínas adaptadoras como a Grb2, Crk, Shb, Shc e o substrato 2 do receptor FGF (FRS2). Esta última liga-se ao receptor numa região onde não há tirosina fosforilada. Durante a ativação do receptor, FRS2 é fosforilado em múltiplos resíduos de tirosina, o que permite o recrutamento direto ou indireto de complexos multiprotéicos que são responsáveis tanto pela ativação como pela atenuação do sinal (Boilly *et al.*, 2000).

Uma das proteínas recrutadas por FRS2 é a Grb2, que posteriormente interage com a Sos formando o complexo Grb2-Sos, que possibilita a ativação da proteína Ras. A Ras ativada inicia uma cascata de sinalização envolvendo Raf, MEK e as isoformas de ERK1/2. A sinalização via Ras é crucial para a proliferação celular, induzida pelo FGFb, em algumas populações celulares (Boilly *et al.*, 2000). Em outras populações, o efeito proliferativo do FGF é mediado pelas proteínas quinase C (PKC) e pela PI3 quinase (Boilly *et al.*, 2000). A ativação da PLC $\gamma$  tem um papel importante na transdução de sinais biológicos do FGFb, resultando na hidrólise do fosfatidilinositol para inositol-3 fosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) levando à liberação de cálcio e a consequente ativação da PKC (Nugent & Iozzo, 2000) (figura 5).



**Figura 5:** Estrutura do FGFR, ligação do FGFb ao FGFR e vias intracelulares ativadas pelo FGF/FGFR.

(Adaptado de Wiedlocha & Sorensen, 2004)

As respostas celulares ao FGF dependem tanto dos tipos de receptores expressos, como também das proteínas citoplasmáticas mobilizadas após a estimulação. A literatura descreve inúmeros efeitos biológicos semelhantes, que podem ser obtidos através do estímulo de vias citoplasmáticas bem distintas, o que nos leva a crer na não exclusividade das cascatas intracelulares. Enfim, há muito a ser caracterizado sobre as vias de sinalização do complexo FGF/receptor.

## 5 DIFERENTES EFEITOS DO FGFb

### 5.1 FGFb na proliferação

Indubitavelmente este é o efeito mais proeminente do fator de crescimento de fibroblasto básico. Identificado inicialmente como um mitógeno para fibroblastos e células endoteliais, logo se mostrou versátil em induzir tal efeito sobre células de diferentes sistemas (Bikfalvi *et al.*, 1997 para revisão).

Baron e colaboradores em 2000 demonstraram que o FGFb é capaz de induzir a proliferação de progenitores de oligodendrócitos e inibir a sua diferenciação em oligodendrócitos maduros, além de bloquear completamente a diferenciação terminal e expressão gênica para produção de mielina. A via de sinalização envolvida nas respostas de aumento na proliferação de progenitores engloba tirosinas quinases, MAPK p42/p44, p38 MAPK e p70 S6. Observou-se também que o aumento na atividade da PKA reduzia o efeito proliferativo induzido pelo FGFb.

Progenitores de neurônios multipotentes presentes em cultura de células corticais também têm sua taxa de proliferação aumentada pelo FGFb (Pappas & Parnavelas, 1997). Estudos *in vitro* demonstraram que a inibição da proliferação de astrócitos abole o efeito trófico do FGFb em neurônios dopaminérgicos (Engel & Bohn, 1991). O efeito proliferativo do FGFb sobre células neuroepiteliais de embriões de rato (E13) é inibido de forma dose-dependente pelo etanol; tal fato poderia comprometer o papel desta citocina em estágios precoces do desenvolvimento (Ma *et*

*al.*, 2003). A elevação na proliferação em resposta ao FGFb também foi estudada em células de Müller da linhagem MIO-M1 provenientes de humanos. Neste caso, o efeito acontece via ativação da p44/p42 MAPK e da p38 MAPK (Hollborn *et al.*, 2004).

No entanto, muitos autores denominam de o “lado negro” do FGFb, o fato de em algumas situações experimentais ele induzir uma parada no crescimento, ou até mesmo a morte celular. É o que pode ser observado em cultura de condrócitos RCS, que submetidos ao tratamento com FGFb estacionam na fase G1 do ciclo celular (Krejci *et al.*, 2004). A indução da morte celular pela exposição ao FGFb está associada com uma parada no ciclo celular em G1 e ativação das caspases iniciadoras (caspase-2, -8 e -10) e executoras (caspase-3, -6 e -7), independentemente da p53 (Burchill & Westwood, 2002 para revisão).

### **5.2. FGFb na diferenciação**

O papel do FGFb na diferenciação de diferentes tipos celulares vem sendo descrito ao longo dos anos. Células gliais como oligodendrócitos (Baron *et al.*, 1998 e 2000) e astrócitos (Abbrachio *et al.*, 1995) têm seu processo de diferenciação controlado pelo FGFb. No caso de oligodendrócitos este processo é mediado pelas proteínas PLC $\gamma$  e PKC (Baron *et al.*, 1998 e 2000).

Na retina o FGFb é capaz de mediar diferentes respostas. FGFb pode promover o brotamento axonal e alongamento ao nível da membrana limitante interna, sendo este efeito mediado pelo receptor de baixa afinidade (Russell, 2003). O FGFb também

aumenta a diferenciação das células ganglionares da retina em cultura de explantes 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). Em 1996, Zhao e Barnstable descreveram o papel do FGFb na diferenciação de células ganglionares da retina de ratos em estágios iniciais de desenvolvimento. O FGFb também é capaz de estimular a neuritogênese em cultura de neurônios de ratos embrionários (E6), através da ativação da via da ERK (Perron & Bixby, 1999).

Outro efeito intrigante do FGF diz respeito a sua ação sobre as células do epitélio pigmentar. Foi demonstrado que tanto o FGFa como do FGFb induzem a transdiferenciação do epitélio pigmentar em tecido neural (Russell, 2003). Em cultura de células corticais FGFb foi capaz de aumentar o número de neurônios expressando a proteína ligadora de cálcio, calbindina (Pappas & Parnavelas, 1997).

### **5.3 FGFb na sobrevida**

O FGFb regula a sobrevida e o crescimento de neuritos de células da retina de pinto *in vitro* (Kinkl *et al.*, 2002), além de promover a sobrevida de células ganglionares da retina de rato tanto *in vitro* como *in vivo* (Meyer-Franke *et al.* 1995). O efeito sobre as células ganglionares da retina de ratos neonatos é elevado quando feito um tratamento combinado com a ceramida C2 (Ito, 2003). Além disso, o FGFb pode ser internalizado por neurônios e astrócitos, bem como transportado

anterogradamente pelas células ganglionares da retina após internalização (Beck, 1994).

O FGFb confere proteção a neurônios da retina de ratos albinos contra a degeneração induzida por isquemia. Retinas tratadas com esta citocina apresentam um número significativamente maior de neurônios se comparados ao controle, indicando assim um papel crucial do FGFb na resposta neuronal após injúria isquêmica (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 (Grothe & Wewetzer, 1996).

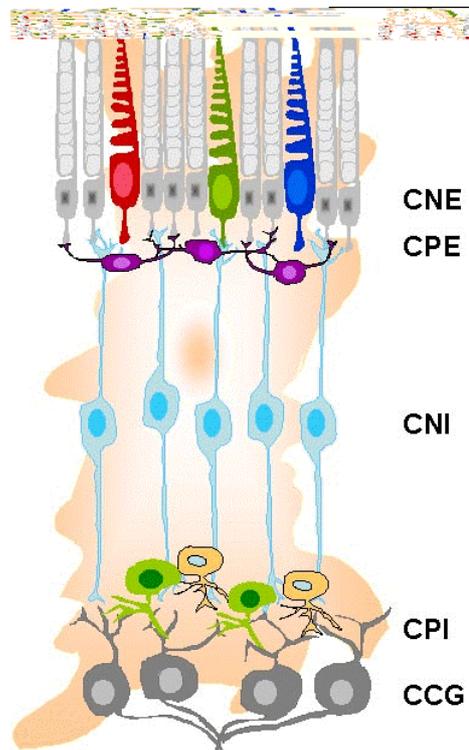
Durante o desenvolvimento embrionário o FGF regula a atividade da colinaacetiltransferase (ChAT) e resgata uma subpopulação de motoneurônios após lesão do nervo ciático em ratos no período pós-natal (Grothe & Wewetzer, 1996). Este resultado indica que o FGFb é um dos participantes do processo de regeneração, induzindo a proliferação das células de Schwann e o crescimento da fibra nervosa (Grothe & Wewetzer, 1996).

## 6.6 RETINA

A retina pertence ao Sistema Nervoso Central, pois se desenvolve a partir do ectoderma neural, que no embrião também originará as demais áreas cerebrais. Dentre todas as estruturas complexas do SNC, a retina é a que apresenta um maior número de vantagens para os estudos acerca do desenvolvimento. Como particularidade, podemos citar sua localização periférica privilegiada permitindo fácil obtenção do tecido, livre de tecido conjuntivo adjacente e de outras populações neuronais e gliais. Esta característica, aliada a uma organização em camadas sinápticas e nucleares bastante semelhante ao observado em outras estruturas do SNC, torna esse tecido um excelente modelo experimental para o estudo do desenvolvimento, diferenciação e manutenção de células de tecido nervoso central *in vitro* e *in vivo* (Adler, 1993; Cepko, 1993; Dowling, 1991 para revisão). Embora tenha os mesmos tipos de elementos funcionais e neurotransmissores encontrados em outras áreas do SNC, a retina compõe-se de apenas 5 classes neuronais e, em geral, apenas um tipo de célula glial: a célula de Müller. Oligodendrócitos estão completamente ausentes na retina da maioria das espécies e os astrócitos migram apenas nas camadas de fibras do nervo óptico de mamíferos (Newman & Reichenbach, 1996).

A retina de vertebrados está organizada em cinco camadas principais, organizadas histologicamente da seguinte maneira (Figura 6): camada nuclear externa (ONL), onde encontramos os corpos celulares dos fotorreceptores, que se dividem em dois subtipos: cones e bastonetes; camada plexiforme externa (OPL), onde os prolongamentos de fotorreceptores, células bipolares e horizontais fazem conexões sinápticas entre si; camada nuclear interna (INL), onde se encontram os corpos

celulares de células bipolares, horizontais, amácrinas e de células ganglionares deslocadas; camada plexiforme interna (IPL), onde prolongamentos de células bipolares, amácrinas e ganglionares fazem sinapse; camada de células ganglionares (RGC), onde além das células ganglionares, encontram-se os corpos de células amácrinas deslocadas (Dowling, 1991 para revisão). O soma da célula de Müller localiza-se na INL e seus prolongamentos estendem-se por todas as camadas da retina, formando a membrana limitante interna, adjacente ao humor vítreo, e a membrana limitante externa, adjacente à camada nuclear externa (Newman & Reichenbach, 1996).



**Figura 6:** Esquema da retina de vertebrados. Representação dos diferentes tipos celulares, bem como as camadas celulares e sinápticas da retina neural (ONL, camada nuclear externa; OPL, camada plexiforme externa; INL, camada nuclear interna; IPL, camada plexiforme interna; RGC, camada de células ganglionares) e a camada de células do epitélio pigmentar da retina (PE).

(cedido por Carla Valéria Vieira Guillarducci-Ferraz e Gustavo Corrêa)

Posterior à retina, localizada no fundo do olho, está uma camada de células epiteliais pigmentadas que é denominada epitélio pigmentar da retina (RPE), rica em

melanina e que é responsável, dentre outras funções, em absorver a luz não capturada por fotorreceptores. Tal propriedade evita a degradação e a distorção da imagem pela retina neural, uma vez que não permite a reflexão da luz não absorvida por cones e bastonetes (Dowling, 1991 para revisão). Também tem um papel crítico na manutenção de fotorreceptores, renovando fotopigmentos e fagocitando discos dos fotorreceptores.

Outro ponto característico da retina de vertebrados é o fato dos diferentes tipos celulares que as compõe serem gerados numa seqüência cronológica rígida (tabela 1). O tempo de geração e de diferenciação das células retinianas pode variar de acordo com a espécie animal mas, invariavelmente, as ganglionares são as primeiras a se diferenciar. Este processo de diferenciação retiniana depende não apenas de um programa genético pré-determinado, mas também de pistas, sinais ambientais intra-retinianos, tais como a expressão de moléculas de adesão e da matriz extracelular, bem como a liberação de diversas citocinas (Cepko, 1993; Marquardt & Gruss, 2002 para revisão).

<b>CURSO TEMPORAL DO DESENVOLVIMENTO CELULAR RETINIANO</b>	
Células ganglionares da retina	E14 a E20
Células amácrinas	E14 a P0
Bipolares, bastonetes	E20 a P13
Glia de Müller	E20 a P13
Horizontais	E16 a E18
Cones	E15 a P0

**Tabela 1** Cronograma da gênese dos tipos celulares retinianos em ratos. E, embrionário e P, pós-natal.

(adaptado de Cepko, 1993 e Reese & Colello, 1992)

A retina de rato no dia pós-natal 0 (P0) é bastante imatura. Com exceção do epitélio pigmentar (PE) e das células ganglionares, a retina P0 apresenta basicamente retinoblastos. Neste estágio, também são detectados os RNAm para os receptores de alta e de baixa afinidade para as neurotrofinas TrKA, TrKB e p75 na GCL e na IPL (Ugolini *et al.*, 1995). A presença e função dos fatores tróficos no desenvolvimento e na maturação da retina coloca esses fatores como importantes reguladores do desenvolvimento e como agentes de potencial terapêutico em doenças degenerativas da retina e após lesão de nervo óptico (von Bartheld, 1998).

#### ↑.6.↑ FGFb na retina

O desenvolvimento retiniano, a exemplo das demais áreas do sistema nervoso, caracteriza-se por duas fases distintas: um estágio inicial de proliferação no qual as células estão em mitose e um outro estágio de diferenciação, onde neurônios pós-mitóticos imaturos começam a expressar características neuronais individuais. A partir da década de 90, diversos estudos foram realizados com o intuito de avaliar a influência de fatores tróficos sobre a proliferação e a diferenciação de distintos tipos celulares, sendo um grande número destas análises feitas *in vitro*. Com base em tais estudos, postulou-se que os fatores tróficos estariam envolvidos nos mecanismos de controle *in vivo*, tanto através da regulação parácrina quanto da autócrina, da proliferação e diferenciação celular (Goustin *et al.*, 1986; Sporn *et al.*, 1987). Como haviam dados acerca da capacidade dos fatores de crescimento de modular diversas atividades celulares, seria possível que estes mesmos fatores participassem do complexo evento morfogênético que ocorre durante o desenvolvimento.

Pelo fato de estar presente na retina, o FGFb pode ser considerado um candidato a modulador do desenvolvimento deste tecido e de fato, dentre outras funções, o FGFb apresenta atividade mitogênica na retina neural de pinto em estágios embrionários (Mascarelli *et al.*, 1987). Em 1993, González-Fernandes e colaboradores mostraram a expressão de RNAm para FGFb na retina de ratos durante o desenvolvimento e observaram que a partir de P18 não se detectava mais a presença do fator. Em 1995, Gao & Hollyfield confirmaram a presença de FGFb na retina de camundongo. Isolando este fator, demonstraram sua atividade mitótica ao aplicá-lo sobre fibroblastos 3T3 em cultura.

Em retinas de ratos albinos de idade P70 expostas à luz, foi detectada a presença de FGFb nas células de Müller e em núcleos das camadas nuclear interna e externa. Na microglia e em células do epitélio pigmentar, a marcação para o FGFb foi proeminente no núcleo das células, mas em alguns neurônios, como os fotorreceptores e células ganglionares, houve detecção do FGFb na região citoplasmática (Walsh *et al.*, 2001).

Coulombre & Coulombre, em 1965, observaram que após lesão cirúrgica da retina, havia regeneração se um fragmento da retina neural fosse inserido no olho. Porém, se este fragmento não fosse inserido a regeneração não era observada. Em 1970, este mesmo grupo de pesquisadores observou que a inserção de retina neural de embriões de camundongos também promovia regeneração do tecido lesionado. Porém, os estímulos responsáveis por estes efeitos ainda não eram conhecidos. Somente em 1981, Barriault e colaboradores descobriram que fatores de crescimento poderiam

estar diretamente envolvidos tanto com o processo de desenvolvimento quanto com o processo de regeneração retiniana.

Estudos posteriores demonstraram que o FGFb tem uma grande atividade mitogênica na retina neural de bovinos adultos (Baird *et al.*, 1985). Os pesquisadores Park & Hollemberg em 1989 foram os primeiros a demonstrar que o FGFb induzia a regeneração da retina de pinto *in vivo*. Neste experimento, após a lesão na retina de embrião de pinto no estágio 22-24, era utilizado um implante de polímero de acetato para permitir a administração de FGFb em diferentes concentrações (1, 10 ou 100ng/mL ou 1µg/mL). Sete dias após o implante, nenhuma diferença morfológica foi encontrada entre os olhos controle e aqueles que receberam 1ng/mL de FGFb. No entanto, os olhos que receberam 10ng de FGFb evidenciavam um aumento significativo na regeneração quando comparado ao controle. A administração de FGFb 100ng/mL ou 1µg/mL por implante resultou na regeneração em todos os embriões analisados (Park & Hollemberg, 1989).

Kinkl e colaboradores, em 2002, demonstraram a expressão de FGFR1-4 em culturas de células da retina após 3 dias *in vitro*. Todas as células retinianas expressam esses receptores sendo que o tipo I apresenta uma distribuição mais homogênea e o tipo II tem maior expressão em células gliais. Os fotorreceptores também expressam todos esses 4 tipos de receptores, sendo que o FGFR-1 e FGFR-4 encontram-se em maior densidade, se comparados aos FGFR-2 e FGFR-3, que têm menor expressão. O FGFR-1 foi identificado em neurônios e glia com igual intensidade, ao passo que

FGFR2-4 foram identificados em níveis mais elevados em neurônios que em células gliais.

A maioria das degenerações retinianas caracteriza-se pela perda de receptores para moléculas tróficas e podem ser prevenidas pela

Posteriormente foi descrito que o meio condicionado de microglia era capaz de reduzir a expressão do RNAm para o FGFb em células Müller. Tal efeito foi revertido pela adição de anticorpo anti-p75, mas não pelo bloqueador específico para Trk (K252a), sugerindo que o p75 esteja relacionado na regulação da expressão FGFb nas células de Müller (Harada *et al.*, 2002). Como a microglia é uma fonte potencial de NGF, provavelmente este efeito deve-se ao fato desta molécula agir nos receptores p75, o que já foi descrito ser causador da apoptose (Frade *et al.*, 1996).

A presença de receptores para FGFb nos fotorreceptores (Fontaine *et al.*, 1998) sugere que uma possível liberação endógena de FGFb, pela microglia, possa ter função preventiva na degeneração da retina de ratos (Harada *et al.*, 2000). Observou-se que a inativação do FGFR nos fotorreceptores leva à degeneração da retina de camundongos, indicando que a sinalização através dos receptores é essencial para a sobrevivência deste tipo celular (Campochiaro *et al.*, 1996).

Com o objetivo de determinar a existência de células tronco na retina de camundongos, Tropepe e colaboradores, em 2000, investigaram a capacidade de células da retina neural e células pigmentadas da camada de epitélio pigmentar (incluindo células pigmentadas da margem ciliar) proliferarem *in vitro* utilizando ensaio que fosse capaz de identificar estas células. Os resultados indicam que há grande formação de colônias quando células de adultos foram tratadas com FGFb e que estas colônias apresentam marcação para nestina no centro da colônia, indicando que muitas destas colônias apresentam células que permanecem indiferenciadas.

Em estudos de diferenciação utilizando marcadores seletivos, observou-se que as células apresentavam um padrão de fotorreceptores diferenciados após manutenção em cultura de 21 dias (Tropepe *et al.*, 2000). Estes resultados demonstraram que existem células tronco na retina e que estas tem potencial de gerar novas células retinianas.

## **2 OBJETIVOS**

1. Analisar o efeito proliferativo do FGFb sobre as células da retina mantidas em cultura por diferentes intervalos de tempo. O racional desta experiência está em observar a capacidade responsiva das células ao FGFb ao longo dos dias em cultura. Tal experimento nos permite fazer uma analogia quanto à participação desta citocina no desenvolvimento do tecido retiniano.
2. Observar a interação da interleucina-4 com o efeito proliferativo promovido pelo FGFb.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

O fator de crescimento de fibroblasto básico recombinante humano (FGFb) e interleucina 4 foram comprados da PeproTech (NJ, USA). A penicilina G, sulfato de estreptomicina, L-glutamina, a poli-L-ornitina e os filtros de fibra de vidro foram comprados da Sigma (MO, USA). A brefeldina A foi adquirida da BIOMOL. Meio 199 e o soro fetal bovino foram comprados da Gibco (MD, USA) e a tripsina da Worthington (NJ, USA). As placas de Petri foram compradas da TPP (Switzerland). A [<sup>3</sup>H-metil]-timidina foi obtida da Amersham (Buckinghamshire, UK).

### **3.2 Cultura de células da retina**

Ratos da linhagem Lister Hooded recém-nascidos (dia pós-natal 1 e 2) foram sacrificados por decapitação, seus olhos removidos por enucleação e colocados em placa de Petri com CMF acrescido de antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL). A seguir, as retinas foram dissecadas e colocadas em um tubo de ensaio contendo CMF onde foi adicionada a tripsina 0,1% por aproximadamente 20 min a 37°C, para dissociação química do tecido. A tripsina foi inativada após a retirada do CMF e lavagem por duas vezes com meio de cultura acrescido de 5% de soro fetal bovino (FCS), glutamina 2,0mM, estreptomicina 100µM e penicilina 100U/mL.

Para completar o processo de separação das células, triturava-se o meio que as continha, passando-o por uma pipeta Pasteur por cerca de 20 vezes. A suspensão de células obtida foi contada em um hemocitômetro, ao microscópio óptico em campo claro, para estabelecermos o quanto de meio de cultura precisava ser adicionado para a obtenção da densidade desejada. As células foram semeadas em placas de Petri de 35mm, na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células/placa. Todo o procedimento de dissecção, dissociação e semeadura das células foi feito em capela de fluxo laminar, portanto em ambiente estéril. As células foram plaqueadas num volume inicial de 1mL de meio completo. Logo a seguir, as placas recebiam mais 1mL de meio completo (culturas controle) ou mais 1mL de meio contendo as citocinas e ou drogas a serem testadas. Em algumas experiências a adição das citocinas e ou drogas foi feito em diferentes intervalos de tempo. Todas as culturas foram mantidas a 37°C, em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> por diferentes períodos de tempo. A análise da proliferação celular foi realizada através do método bioquímico de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina conforme o protocolo descrito abaixo:

### **3.3. Incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina**

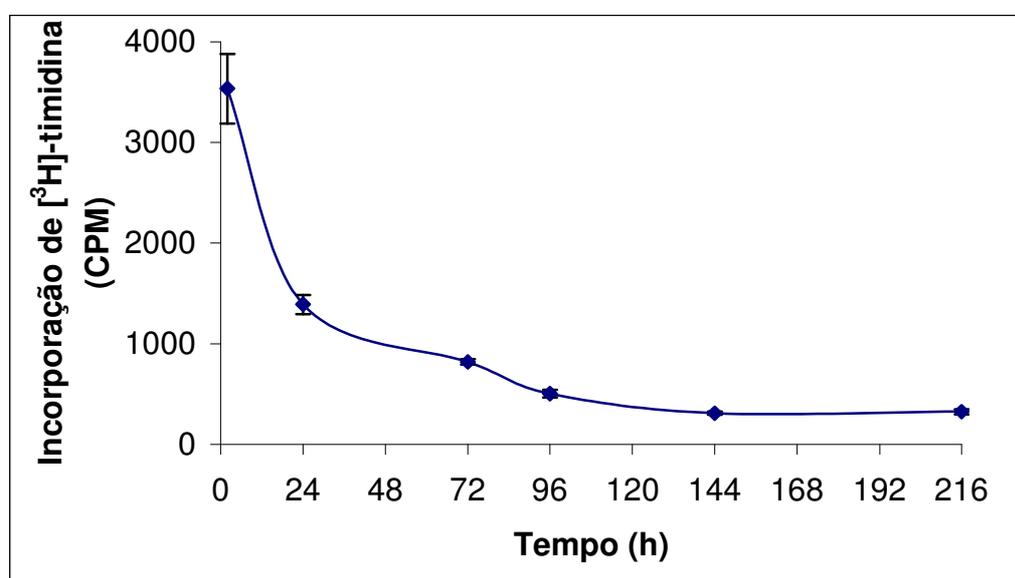
As culturas foram lavadas por duas vezes com 2mL de meio de cultura 199 sem soro fetal bovino a temperatura ambiente e incubadas com 0,5μCi/mL de [<sup>3</sup>H]-timidina em 1mL de meio 199 por um período de 60 minutos a 37°C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.

Após este período de tempo, as culturas foram lavadas por quatro vezes com meio 199, a fim de remover a [<sup>3</sup>H]-timidina que não foi incorporada. O meio 199 foi então removido e 200μL de NaOH 0,4N foram adicionados às culturas por quinze minutos. O conteúdo

## RESULTADOS

### ➤ Perfil de proliferação das células da retina *in vitro*

Inicialmente, analisamos o perfil de proliferação das células da retina mantidas em cultura por diferentes intervalos de tempo. Nosso objetivo foi observar o comportamento das células em cultura para que pudéssemos compará-lo posteriormente com aquele obtido com o tratamento com FGFb. Realizamos nossos estudos utilizando a técnica de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina em culturas mantidas *in vitro* por 2, 24, 72, 96, 144 e 216 horas.



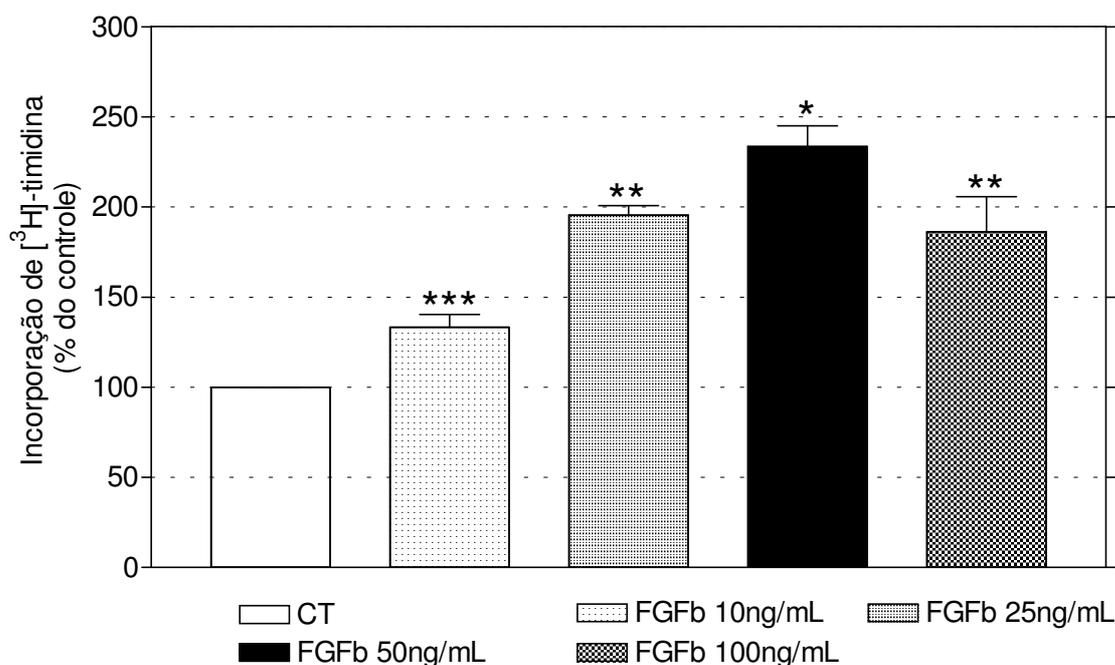
**Figura 1** - Perfil de proliferação das células retinianas no período de 2 a 216 horas *in vitro*. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa de 35mm previamente tratadas com poli-L-ornitina (50 $\mu$ g/mL). Os resultados das incorporações de [<sup>3</sup>H]-timidina foram expressos em cpm  $\pm$  erro padrão da média (n = 5-6).

Nossos resultados demonstraram (em cpm) uma redução acentuada da proliferação ao longo do período estudado. Durante a 2<sup>a</sup> hora de cultivo a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina encontrava-se em torno de 3500cpms. Durante a 24<sup>a</sup> hora de cultivo ocorreu uma redução superior a 60% (1300cpms). Em 72 horas e 96 horas a proliferação continuou caindo e (72h = 821,56; 96h = 505,23cpms) após 144 e 216

horas a proliferação era de 10% do valor do controle de 2 horas (300cpms) (figura 7). Esses resultados indicam que com o decorrer do tempo as células diminuíam significativamente seu padrão proliferativo, o que poderia estar relacionado à redução de sinais mitogênicos.

## 2 Efeito proliferativo do FGFb é dose e tempo dependente

Conhecendo o comportamento proliferativo da cultura de células, iniciamos o estudo do efeito do FGFb, utilizando diferentes concentrações desta citocina e analisando a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina, após o período de 48 horas de cultivo.

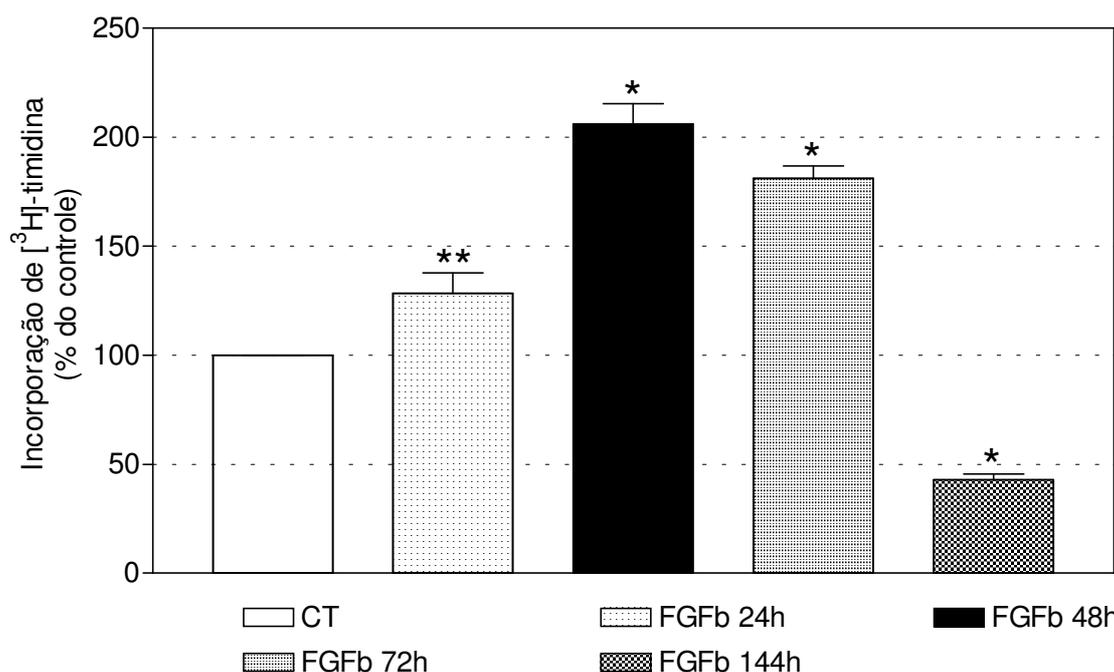


**Figura 8· Curva dose-resposta do FGFb em células da retina mantidas em cultura por 8 horas.** As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa de 35mm previamente tratadas com poli-L-ornitina (50 $\mu$ g/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 6). (\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,05).

O tratamento com FGFb na concentração de 10ng/mL induziu um aumento de aproximadamente 40% na proliferação celular. Já a concentração de 25ng/mL induziu aproximadamente 100%. Porém, o maior efeito (aproximadamente 130%) ocorreu em

culturas tratadas com 50ng/mL. Na concentração de 100ng/mL observamos uma queda na proliferação (figura 8). Tal decréscimo deveu-se provavelmente ao fato de que nesta concentração, a cultura havia alcançado a confluência, o que naturalmente reduziu a taxa proliferativa. Como trabalhamos com uma cultura primária de tecido nervoso normal era esperado que houvesse a regulação da proliferação celular pelo fenômeno de inibição por contato. Nossos resultados indicaram que o tratamento com FGFb induziu um efeito dose-dependente sobre a proliferação das células da retina.

Baseados nos dados obtidos, decidimos avaliar o curso temporal do efeito estimulatório do FGFb na concentração de 50ng/mL.



**Figura 9** Curva temporal do efeito do FGFb 5 ng/mL em células da retina mantidas em cultura. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa de 35mm previamente tratadas com poli-L-ornitina (50µg/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 6). (\*p<0,001, \*\*p<0,01)

Nossos dados revelaram que nas 24 horas iniciais de tratamento, o efeito na proliferação já pode ser observado. Em 48 horas, este efeito foi mais intenso (100% de

aumento na incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina em relação ao controle). No período de 72 horas ocorreu uma pequena queda na incorporação [<sup>3</sup>H]-timidina, ao passo que nas culturas mantidas por 144 horas a queda tornou-se mais acentuada provavelmente devido ao fato da cultura já ter atingido a confluência e por isso a redução na taxa proliferativa (figura 9).

### ✦ **Morfologia das células tratadas com FGFb**

Além do efeito proliferativo, o FGFb foi capaz de alterar a morfologia celular, aumentar o número de células e processos (dado não mostrado) em todas as concentrações utilizadas. Entretanto o FGFb 50ng/mL foi o que induziu o maior efeito e também o fez de forma mais rápida. A figura10 ilustra as extensas alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com FGFb 50ng/mL após 48 e 144h *in vitro* respectivamente.

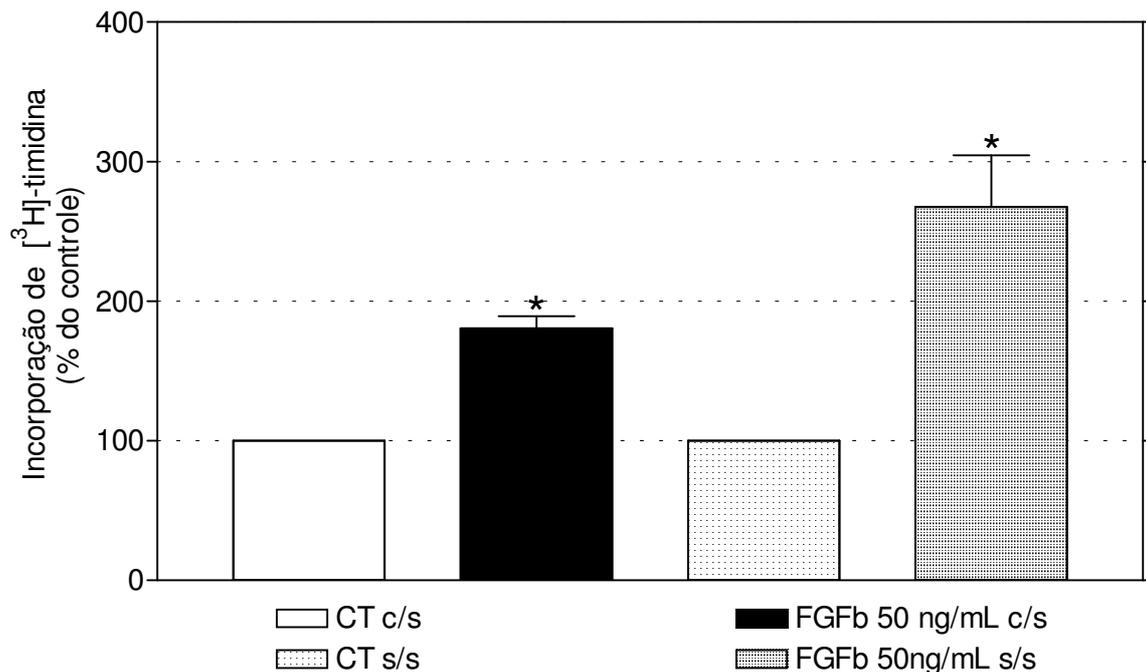
**Figura 1** · Fotomicrografia em contraste de fase mostrando a morfologia das culturas *in vitro*. A: Cultura controle 48h; B: Cultura tratada com FGFb 50ng/mL. C: Cultura controle 144h; D: Cultura tratada com FGFb 50ng/mL 144h. As células

As culturas controle incubadas por 144 horas (figura 10C) apresentavam uma morfologia alterada, indicando um importante sofrimento celular. Pequenos grumos bastante compactos eram observados, não sendo possível identificar cada uma das células neuronais. Também era nítida a presença de um número reduzido de células. Ao contrário, as culturas tratadas com FGFb 50ng/mL, durante 144 horas (figura 10D), apresentavam uma morfologia exuberante. Os grumos estavam totalmente espalhados, havia a formação de um tapete de células gliais sob as quais os neurônios se depositavam. Neste período, a placa de Petri apresentava esta morfologia por toda a sua extensão, significando que a cultura atingira a confluência e desta forma, não mais seria capaz de proliferar, o que estava de acordo com o observado na figura 9.

A partir deste resultado, pudemos sugerir que o FGFb 50ng/mL foi capaz de aumentar a neuritogênese e a sobrevivência das células da retina de ratos neonatos *in vitro*, além de induzir o aumento na proliferação celular.

#### **• Efeito do FGFb independente da presença de soro fetal bovino no meio**

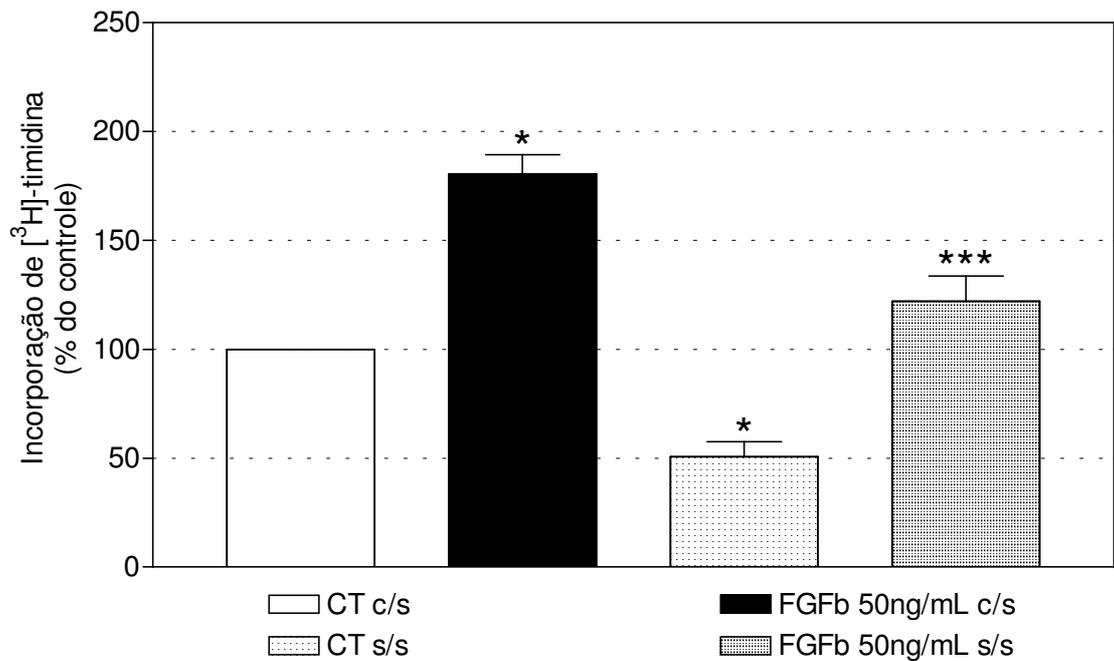
No soro fetal bovino estão presentes uma série de fatores de crescimento essenciais para manutenção das células *in vitro*. A partir da observação de que o fator de crescimento de fibroblasto básico exerceu efeito proliferativo de grande magnitude em meio 199 com soro, decidimos analisar se o efeito observado ocorreria na mesma proporção em culturas incubadas em meio 199 sem soro. Inicialmente, as culturas foram pré-incubadas por 24 horas em meio com soro. Em seguida, as culturas foram lavadas e tratadas com FGFb, na concentração de 50ng/mL, na ausência de soro por mais 48 horas.



**Figura 11** Efeito do FGFb 5 ng/mL em células da retina mantidas em cultura com (c/s) ou sem soro (s/s) fetal bovino por 8 horas – pré-incubação de 2 h com soro. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina (50  $\mu$ g/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle com e sem soro  $\pm$  erro padrão da média (n = 5-9). (\*p<0,001)

Como podemos observar na figura 11, o aumento na proliferação proporcionado pelo FGFb foi ainda maior na ausência de soro (200% em relação ao controle).

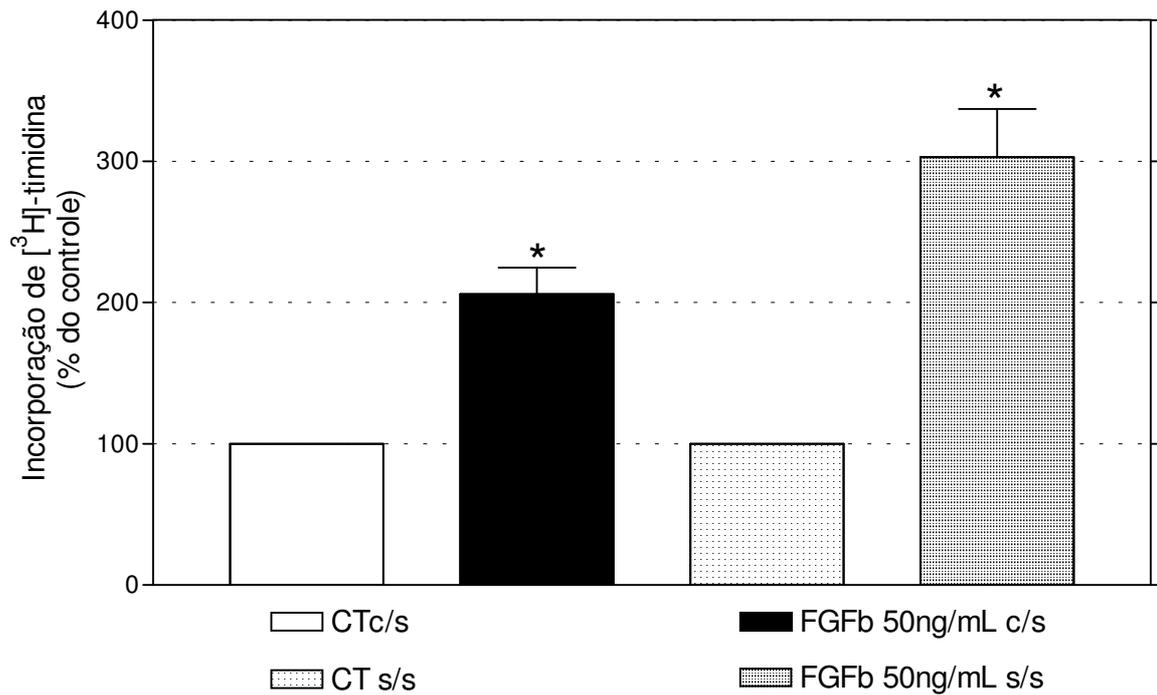
Ao analisarmos os dados tendo o controle com soro como parâmetro, podemos sugerir que em nossas culturas 50% da proliferação celular foi proporcionada pelo soro fetal bovino. Entretanto o efeito do FGFb era independente da presença de soro em culturas (figura 12).



**Figura 2**· Efeito do FGFb 5 ng/mL em células da retina mantidas em cultura com (c/s) ou sem soro (s/s) fetal bovino - pré-incubado de 2 h com soro. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-orнитina (50µg/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle com soro  $\pm$  erro padrão da média (n = 5-9). (\*p<0,001, \*\*\*p<0,05)

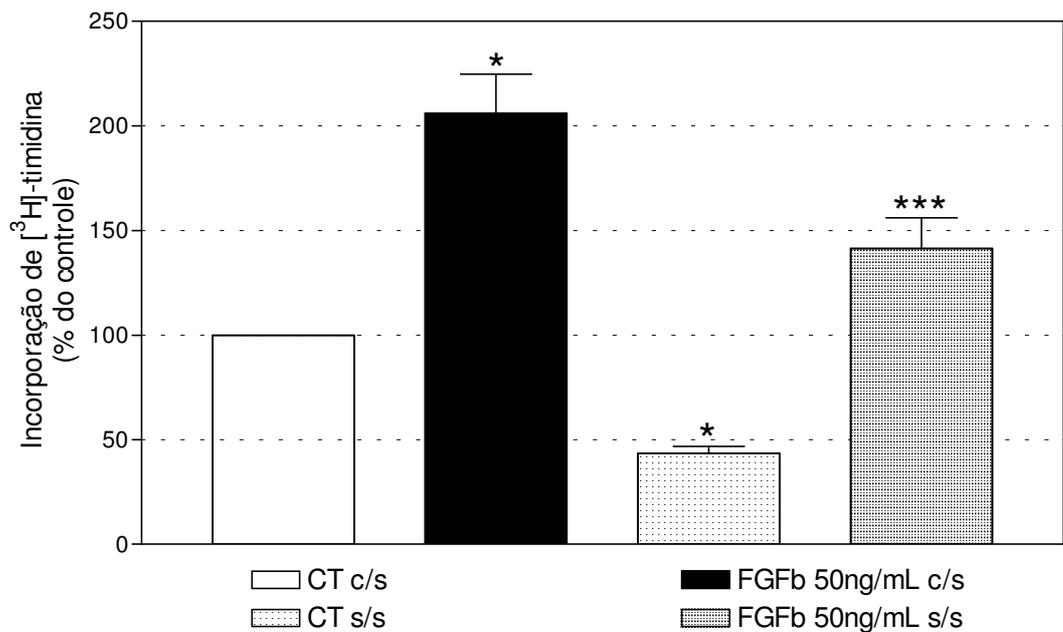
Prosseguindo com os experimentos, reduzimos o período de incubação com soro para somente 4 horas, tempo necessário para adesão das células. Nessas novas condições experimentais observamos que o FGFb continuou aumentando a

proliferação em cerca de 200% se comparado ao controle sem soro (figura 13).



**Figura 13** - Efeito do FGFb 5 ng/mL em células da retina mantidas em cultura com (c/s) ou sem soro (s/s) fetal bovino - pré-incubado de 1 h com soro. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina (50µg/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 4-7). (\*p<0,001)

Quando analisamos os dados tendo a situação com soro como parâmetro, pudemos constatar que o efeito do FGFb era de aproximadamente 50% (figura 14).

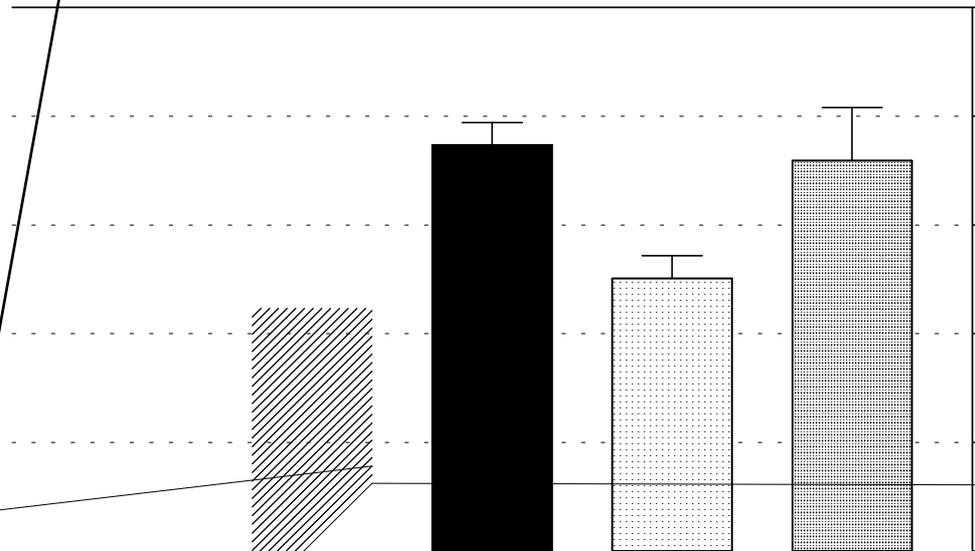


**Figura 10 - Efeito do FGFb 5 ng/mL em células da retina mantidas em cultura com (c/s) ou sem soro (s/s) fetal bovino - pré-incubação com soro.** As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina (50µg/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle com soro  $\pm$  erro padrão da média (n = 4-7). (\*p<0,001, \*\*\*p<0,05)

Esses dados evidenciam a participação direta do fator de crescimento de fibroblasto básico na indução da proliferação das células da retina mantidas em cultura. Importante ressaltar que a morfologia das culturas incubadas em meio 199 sem soro apresentava-se semelhante ao observado na figura 10.

### 5 FGFb induz proliferação em culturas de até 5 dias

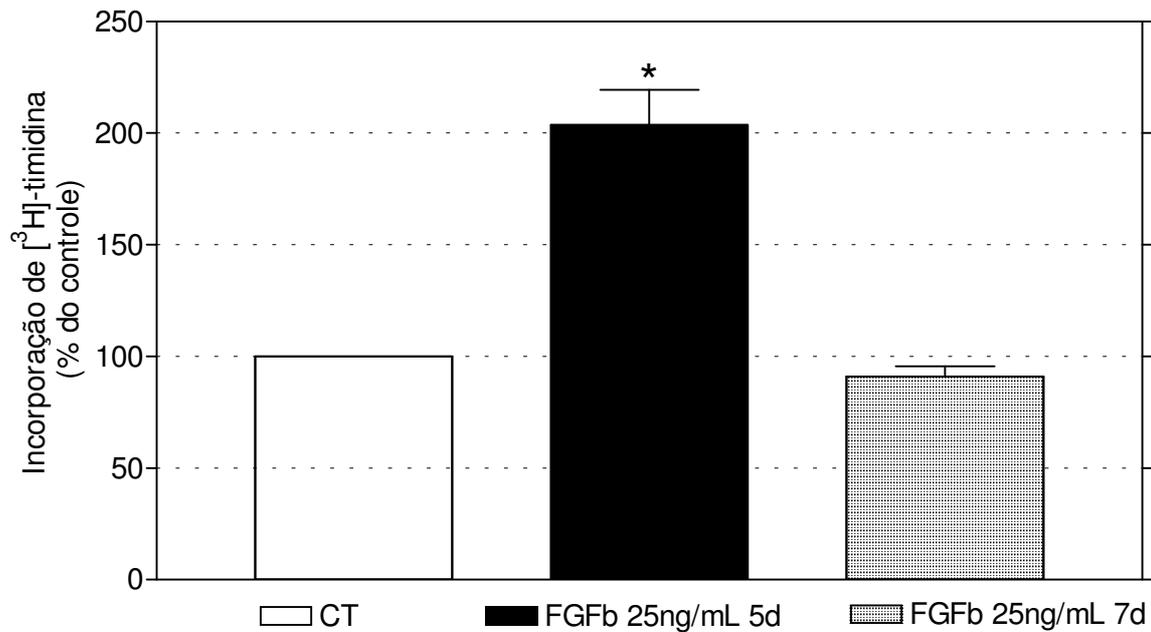
Para testarmos se o FGFb exercia seu efeito mesmo não sendo adicionado logo em seguida ao plaqueamento, tratamos um grupo de nossas culturas com FGFb 25ng/mL apenas nas primeiras 24 horas de incubação enquanto o outro grupo foi tratado com FGFb apenas 24 horas finais do período de incubação total de 48 horas. No final das primeiras 24 horas as culturas foram lavadas com meio 199.



**Figura 15. Tratamento de células da retina em cultura com FGFb 25ng/mL nas primeiras 2 h ((+)(-)) ou após 2 h ((-)(+))** As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina (50 $\mu$ g/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 8-12) (\*p<0,001)

O tratamento com FGFb nas primeiras 24h não foi capaz de induzir aumento na proliferação. No entanto, após 24 horas ele induziu o mesmo efeito que o tratamento crônico por 48h (aumento de aproximadamente 100%) (figura 15).

Para avaliarmos se o FGFb era capaz de induzir a proliferação de células da retina mesmo após vários dias de plaqueamento, realizamos uma cultura de 120 horas (5 dias) e nesse momento tratamos as células com 25ng/mL de FGFb por um período de 48 horas.

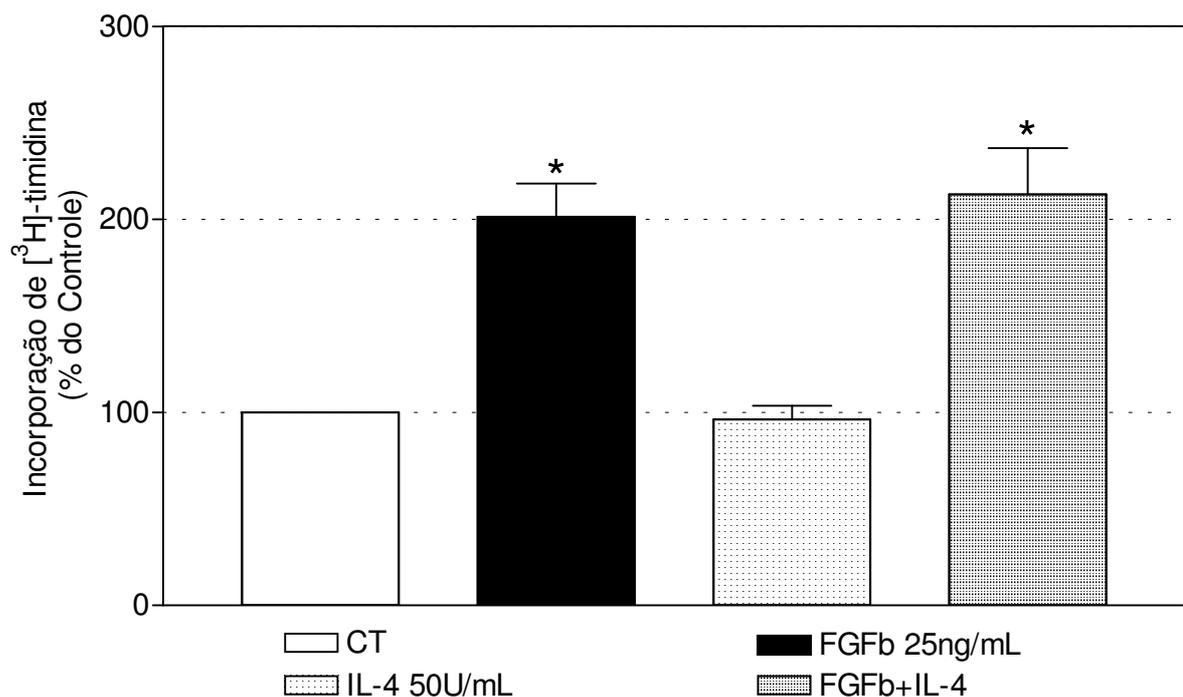


**Figura 16** Tratamento das células da retina mantidas **72 (5d)** e **168 (7d)** horas **in vitro** com **25ng/mL** por **8 horas**. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina ( $50 \mu\text{g/mL}$ ). Os resultados das incorporações de [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 15).

Após esse período, observamos um aumento de aproximadamente 100% na incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina quando comparado ao controle (figura 16). Entretanto, em culturas de 168 horas (7 dias) não observamos mais o efeito proliferativo

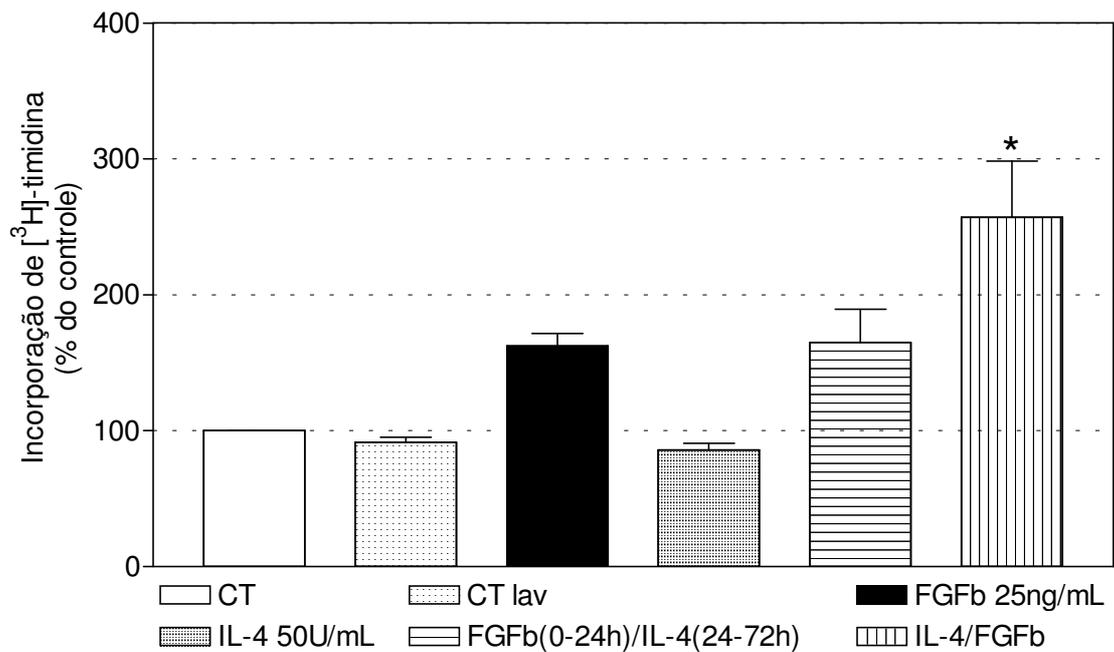
## **.6 Interleucina-4 potencializa o efeito proliferativo induzido pelo FGFb**

Em 2003, Kim e colaboradores mostraram que a interleucina-4 (IL-4) é capaz de bloquear o efeito proliferativo do FGFb sobre células endoteliais da veia umbilical humana, causando uma parada no ciclo celular nas fases G<sub>0</sub>+G<sub>1</sub>. A fim de testar essa condição experimental, realizamos o tratamento de nossas culturas com FGFb 25ng/mL e IL-4 na concentração de 50U/mL num período de 48h. Conforme observado na figura 17, a IL-4 não foi capaz de interferir no efeito do FGFb sobre as células retinianas.



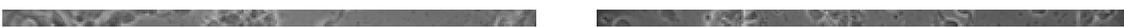
**Figura 17 - Efeito do FGFb na presença de interleucina-4 (IL-4 5 U/mL)** As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina ( $50 \mu\text{g/mL}$ ). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 6). (\*p<0,001)

Curiosamente, quando realizamos uma pré-incubação de 24 horas com a IL-4 50U/mL e posteriormente tratamos as culturas com FGFb 25ng/mL por mais 48 horas, havia uma potenciação do efeito mitogênico do FGFb (superior a 50%). No entanto, quando era feita uma pré-incubação com FGFb e consecutivamente tratávamos as culturas com IL-4 não observamos alterações na magnitude do efeito do FGFb (figura 18).



**Figura 18. Pré-incubação com interleucina-4 (IL-4) 50 U/mL potencia efeito do FGFb 25ng/mL.** As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina ( $50 \mu\text{g/mL}$ ). As culturas foram pré-incubadas com a IL-4 (IL-4/FGFb) ou com o FGFb (FGFb/IL-4). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 6) (\*p < 0,001)

A figura 19 mostra as alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com IL-4 50U/mL e FGFb 25ng/mL.

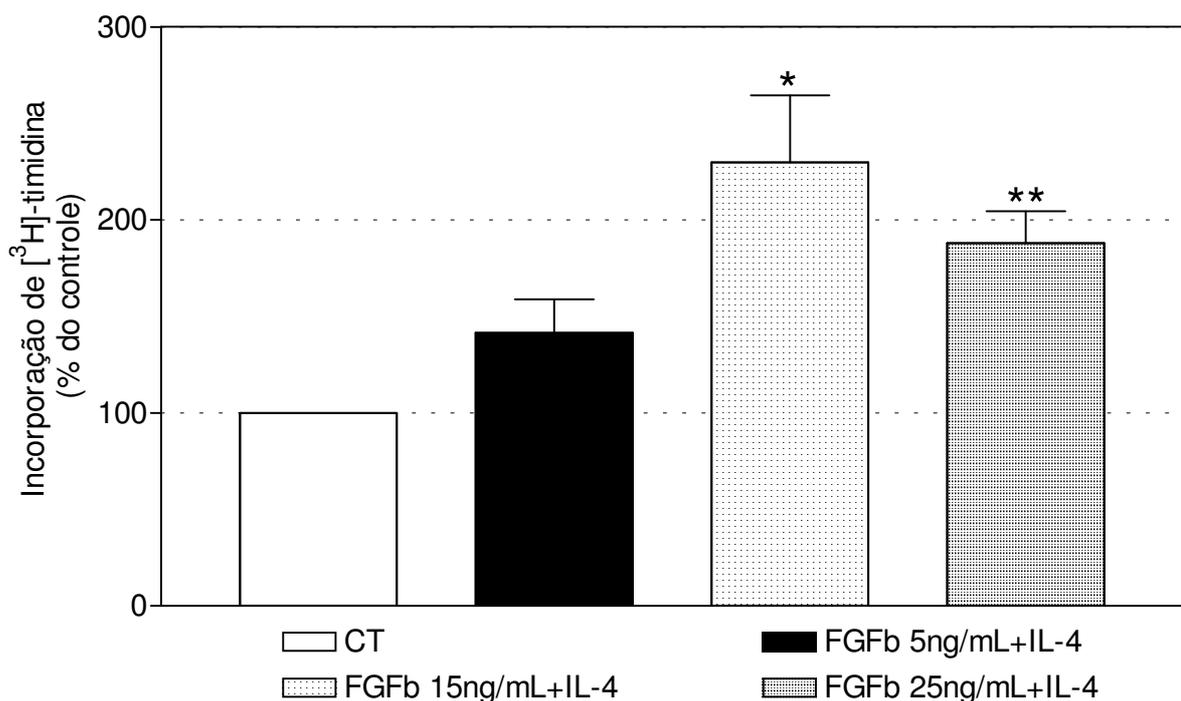


**Figura 19.** Fotomicrografia em contraste de fase mostrando a morfologia das culturas *in vitro*. A: Cultura controle 72h; B: Controle da lavagem, C: Cultura tratadas com FGFb 25ng/mL 72h; D: Cultura tratada com IL-4 50U/mL 72h, E: cultura pré-incubada com a IL-4 (IL-4 ( -2 h )FGFb 2 -/ 2h ), F: cultura pré-incubada com FGFb (FGFb( -2 h )/IL-4 2 -/ 2h ). As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células em placas previamente tratadas com poli-L-ornitina (50 $\mu$ g/mL). Barra de calibração: 50 $\mu$ m

Da análise desta figuras constatamos que a cultura controle 72h, bem como controle da lavagem, apresentam perfil semelhante ao encontrado em culturas de 48h (figura 10A). As culturas tratadas com FGFb por 72h também apresentam semelhanças com o tratamento de 48h. No entanto, as culturas tratadas com a IL-4 (figura 19D)

apresentam alterações distintas das induzidas pelo tratamento com FGFb (figura 19C). Podemos notar uma formação maior de grumos bem como processos neuronais bem mais alongados se comparados a cultura controle. Na cultura pré-incubada com IL-4 (figura 19E) encontramos um número ainda maior de células, grumos e processos neuronais mais alongados, se comparados com a cultura pré incubada com o FGFb (figura 19D).

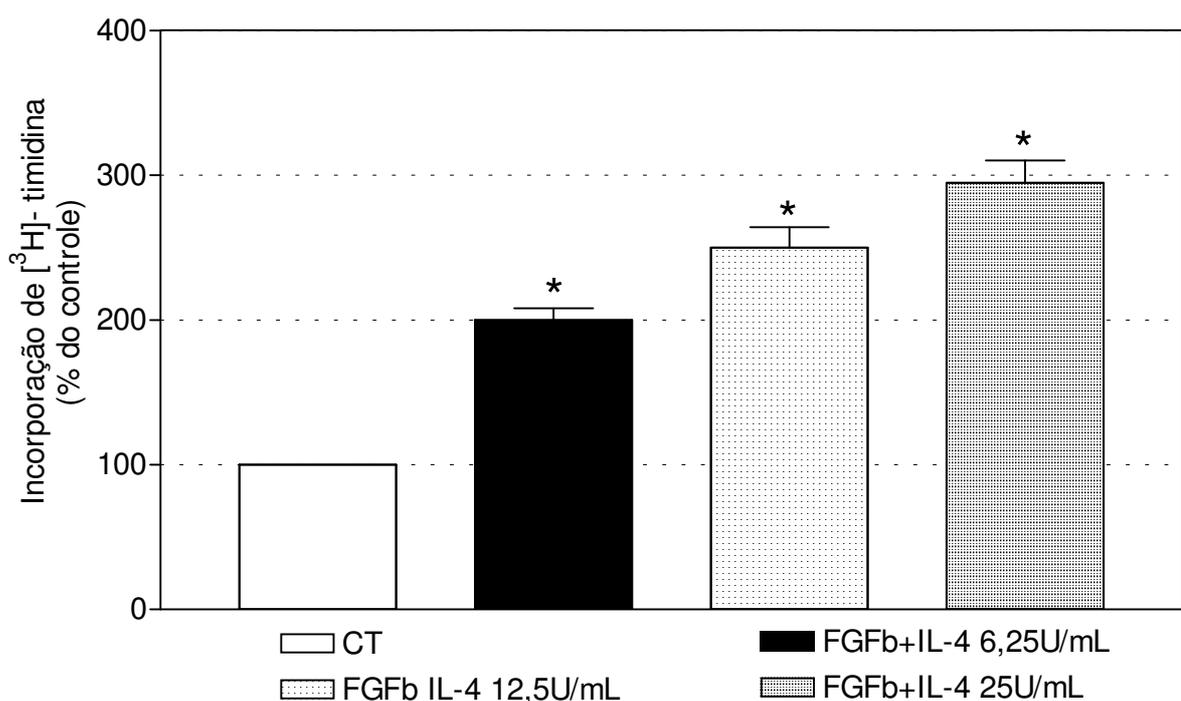
Com o intuito de sabermos se a IL-4 50U/mL poderia potencializar o efeito trófico do FGFb em concentrações inferiores, tratamos as células por 48 horas com FGFb nas concentrações de 5 e 15ng/mL.



**Figura 2** · Interleucina- (IL- ) 5 U mL potencia o efeito do FGFb 5, 15ng/mL em células da retina mantidas em cultura por 8 horas. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina (50 $\mu$ g/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 9-12). (\*p<0,001, \*\*p<0,01).

Os dados obtidos mostram que já na concentração de 15ng/mL ocorre um aumento de aproximadamente 50% na incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina em relação ao controle. Em 15ng/mL foi observado um aumento superior a 100%, fato que pôde ser visto apenas quando usamos o FGFb na concentração de 50ng/mL (figura 20).

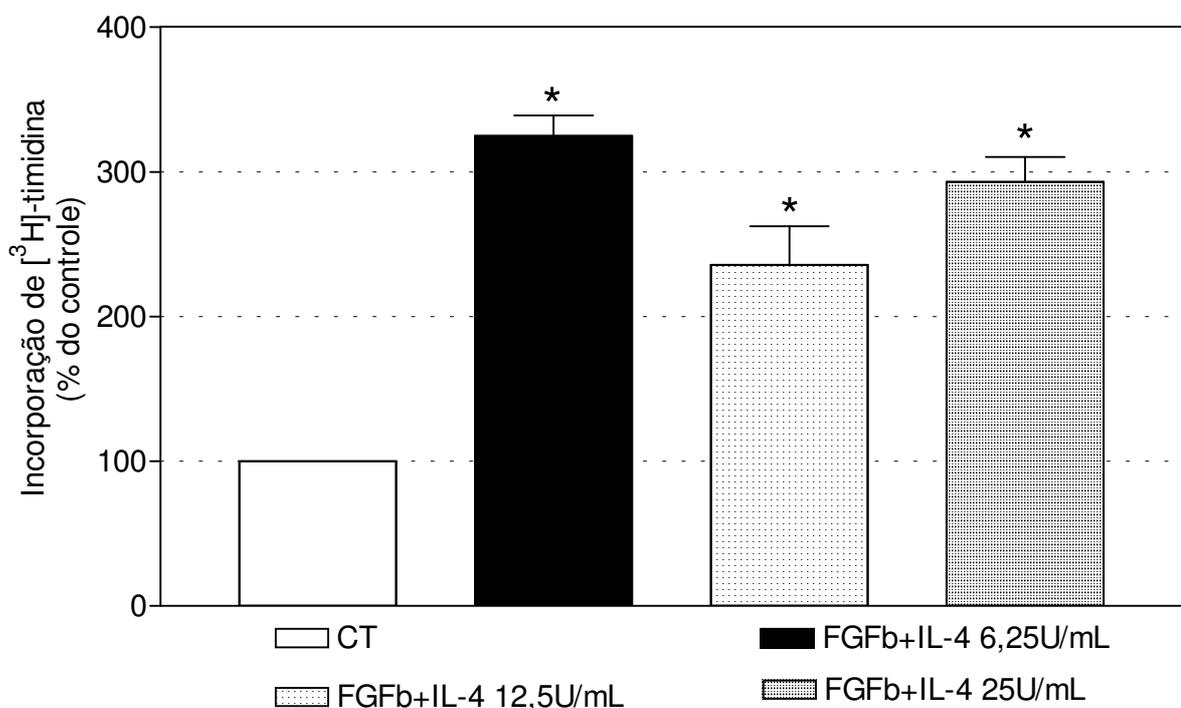
Em outra série de experimentos, utilizamos a IL-4 nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25U/mL juntamente com FGFb 25ng/mL num período de 48 horas. Como neste intervalo de tempo não houve nenhuma alteração na proliferação induzida pelo FGFb 25ng/mL (dado não mostrado) estendemos o período de incubação para 60 horas.



**Figura 21** Interleucina-4 (IL-4) 6,25, 12,5, 25U/mL potencia o efeito do FGFb 25ng/mL em células da retina mantidas em cultura por 6 horas. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina (50µg/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 7). (\*p<0,001).

Nesse período de incubação houve um aumento de 100% em relação ao controle quando utilizamos a IL-4 6,25. Em 12,5 aumento de aproximadamente 150%. O melhor efeito foi obtido com a IL-4 25U/mL (figura 21).

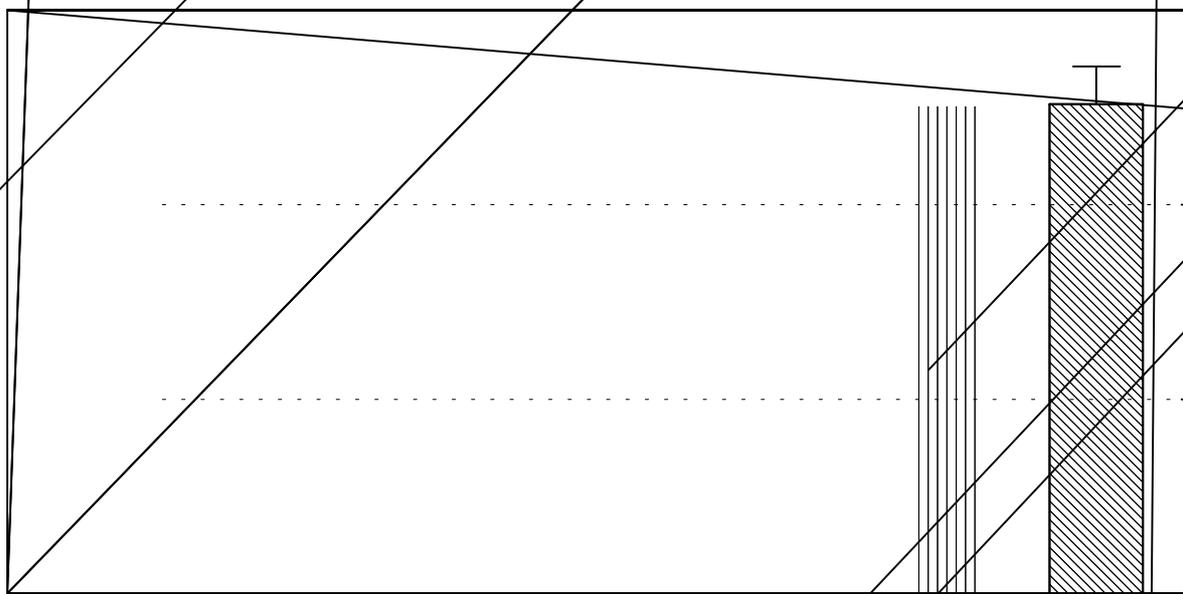
Quando estendemos o período incubação para 96 horas observamos um aumento de 200% em relação ao controle logo quando utilizamos a IL-4 6,25U/mL. Em 12,5U/mL ocorreu uma queda na proliferação e em 25U/mL observamos novamente um aumento 200% na proliferação (figura 22).



**Figura 22** Interleucina (IL-4) 6,25, 12,5, 25U mL potencia o efeito do FGFb 25ng/mL em células da retina mantidas em cultura por 96 horas. As células foram plaqueadas na densidade de  $1,25 \times 10^6$  células por placa previamente tratadas com poli-L-ornitina (50µg/mL). Os resultados das incorporações [<sup>3</sup>H]-timidina são expressos em % do controle  $\pm$  erro padrão da média (n = 5). (\*p<0,001).

A potenciação do efeito do FGFb promovida pela IL-4 poderia ser pelo aumento de receptores FGFRs inseridos na membrana plasmática. Para impedir a

provável translocação destes receptores utilizamos a Brefeldina A na concentração de 30ng/mL. No entanto, não observamos a inibição da potenciação promovida pela IL-4, o que exclui a hipótese de inserção de novos FGFRs (figura 23).



## 5 DISCUSSÃO

A grande parte dos trabalhos publicados sobre FGFb tem como foco principal a identificação das vias bioquímicas relacionadas aos seus efeitos biológicos. A nossa proposta neste trabalho foi estudar a responsividade proliferativa das células da retina a esta citocina, objetivando entender o desenvolvimento da retina. Também foi objeto de estudo analisar o papel da interleucina-4 na modulação do efeito do FGFb.

A fim de estabelecermos as condições experimentais e também para analisar o perfil proliferativo das células da retina em cultura, fizemos uma análise da incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina após vários períodos de incubação. Nossos resultados demonstram que na 2<sup>a</sup> hora de cultivo a taxa proliferativa encontrava-se em torno 3500cpms e decaindo para o valor de 300cpms após 144-216 horas. Nossos dados indicam que o baixo nível de proliferação observado após 9 dias de cultivo (216 horas), deve-se a uma provável perda de sinal mitogênico e não ao reflexo de uma diferenciação celular, pois quando adicionamos FGFb após a 24<sup>a</sup> hora de plaqueamento, a taxa proliferativa atinge níveis similares ao observado no tratamento crônico, enquanto o tratamento com FGFb 25ng/mL apenas nas 24 horas iniciais não alterou a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina na 48<sup>a</sup> (figura 16).

O FGFb aumentou significativamente a proliferação celular após 48 horas em cultura. O efeito foi dose-dependente e atingiu nível máximo na concentração de 50ng/mL. Como as culturas são mantidas em meio completo, na presença de 5% de soro fetal bovino, poderia haver uma interferência do soro no efeito do FGFb. No entanto, a série de experimentos onde pré-incubamos as culturas por 4 ou 24 horas em meio com soro e depois lavamos as culturas e incubamos em meio sem soro,

demonstrou efeito similar ao obtido na presença de soro. A pré-incubação de 4 horas em meio com soro, reduziu a possibilidade de fatores aí presentes permanecerem associados aos elementos de matriz-extracelular mesmo após a lavagem, o que reforça ainda mais a ação direta do FGFb sobre nossas culturas. Esses experimentos nos sugerem que o soro interfere na proliferação induzida pelo FGFb, mas reduzindo a magnitude de seu efeito em culturas com o meio completo. Nota-se que o aumento na proliferação ocorreu em maior proporção nas culturas sem soro do que no inverso. A presença do soro pode induzir a liberação e ou produção de moléculas capazes de modular o efeito proliferativo do FGFb. Deste modo, pretendemos investigar a presença de moléculas tróficas no soro capazes de modular negativamente o efeito do FGFb sobre a proliferação das células retinianas em cultura.

Em um dos trabalhos pioneiros sobre a ação proliferativa do FGFb sobre fibroblastos, Gospodarowicz observou que esta citocina, em combinação com glicocorticóides, poderia substituir a adição de soro na estimulação do início da síntese de DNA em células quiescentes, sustentando um crescimento contínuo. Este autor observou ainda que os fibroblastos mantidos em meio com baixa concentração de soro (0,6%) e FGFb passavam somente por um ou dois ciclos mitóticos (Gospodarowicz, 1974).

Além do efeito sobre a proliferação celular, o FGFb promoveu alterações morfológicas marcantes em células em culturas. Nas culturas tratadas são encontrados grumos grandes e espalhados, bem como grande emissão de processos neuronais. Tais características não foram observadas no controle. O FGFb é descrito por muitos

autores como sendo mais um “fator de arborização” do que de “alongamento axonal”, pois promove a bifurcação e o crescimento de arborização axonal sem afetar a taxa de alongamento de axônios primários em culturas de neurônios hipocámpais de ratos (Abe & Saito, 2001 para revisão).

O efeito do FGFb sobre as células da retina também depende do período de incubação *in vitro*. A melhor resposta foi obtida no período de 48 a 72 horas de tratamento. Em 144 horas, observamos uma queda drástica na incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina. Neste período, a cultura atingiu a confluência, sugerindo um “arresto” no ciclo celular. Podemos observar pelas fotomicrografia a formação de um tapete glial sob o qual estão depositados os neurônios. Gospodarowicz e Moran em 1974 demonstraram que a inibição por contato era suprimida e as células cresciam em múltiplas camadas. quando o FGFb era adicionado às culturas de fibroblastos em meio acrescido de soro 10%. Este crescimento desordenado também era observado em culturas que já haviam alcançado a confluência em meio com soro e FGFb, seguida de uma nova adição de soro fetal bovino (Gospodarowicz & Moran, 1974).

Observamos também que até cinco dias após o plaqueamento, existem células responsivas ao FGFb 25ng/mL. É provável que o tipo celular responsivo seja a célula glial, uma vez que após este período as culturas controle apresentam poucas células neuronais. É bem descrita a ação do FGFb sobre células gliais e sua participação na ativação destas células. Na retina, células ganglionares, amácrinas, bipolares e a célula de Müller expressam todos os quatro subtipos de FGFRs (Kinkl *et al*, 2001). Estudos utilizando uma linhagem de célula de Müller, denominada MIO-M1, que possui baixa

taxa proliferativa e de sobrevivência, tem sua proliferação aumentada de forma dose-dependente pelo FGFb, via ativação da p44/p42 MAPK e da p38 MAPK (Hollborn *et al*, 2004). Uma outra evidência de que a glia pode responder ao FGFb é mostrada em astrócitos cerebelares que após sete dias em cultura tornam-se quiescentes, não se dividem mas permanecem em estado viável para proliferarem quando estimulados adequadamente. Um destes estímulos pode ser o FGFb que adicionado na concentração de 25ng/mL às culturas de astrócitos induz as células quiescentes a entrar novamente em ciclo mitótico (Kniss & Burry, 1988).

Nossos dados demonstram que o FGFb não induz a proliferação em culturas de sete dias,. Talvez devido à perda de células responsivas ou por estar promovendo outros efeitos como diferenciação celular. Pelo fato do FGFb estar também promovendo a neuritogênese não podemos descartar essa hipótese.

Em culturas de células da retina embrionária de pinto tanto os fatores de crescimento básico e ácido elevam a sobrevivência neuronal, a proliferação de células gliais e também estimulam diferenciação de fotorreceptores (Tcheng *et al*, 1994). É também provável que o FGFb induza a diferenciação em conjunto com outros fatores.

Segundo Zhao & Barnstable, (1996), o fato do FGFb apresentar diferentes propriedades em diferentes períodos no desenvolvimento indica que a responsividade das células seja alterada de acordo com o tempo ou com as combinações de diversos fatores que sejam necessários para induzir a diferenciação.

A interação do FGFb com outras citocinas ainda é um tema pouco explorado. Esta abordagem nos permite estudar a modulação da resposta celular ao FGFb, um mecanismo que pode ser empregado em processos de reparo neuronal, potencializando seu efeito e também na angiogênese impedindo a proliferação de células endoteliais e conseqüentemente retardando a progressão de tumores.

Estudos *in vitro* revelam que CNTF em combinação com o FGFb pode aumentar a sobrevivência de motoneurônios embrionários em 100% (Grothe & Wewetzer para revisão, 1996). Entretanto, a modulação do efeito proliferativo do FGFb por outras citocinas ainda é pouco conhecido. Para abordar tal tema utilizamos a interleucina-4, uma interleucina pleiotrópica produzida por células Th2 e mastócitos, apresentando uma função anti-inflamatória. Esta citocina também é capaz de induzir sobrevivência, diferenciação e proliferação de muitos tipos celulares (Nelms *et al*, 1999).

A proliferação de células endoteliais promovida pelo FGFb pode ser inibida pela IL-4, resultando numa parada no ciclo celular nas fase G0+Gi, aumento de expressão de p53 e p21 e diminuição de ciclinas D1 e E (Lee *et al*, 2002; Kim *et al*, 2003). Com o intuito de investigar a possibilidade de modulação do efeito do FGFb por IL-4, tratamos nossas culturas com IL-4 50U/mL e FGFb 25ng/mL no período de 48 horas. Nossos dados demonstram que a IL-4 não inibiu o efeito do FGFb, nem alterou isoladamente a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina em relação ao controle. No entanto, algumas alterações morfológicas são visíveis, como maior formação de grumos comparando controle e culturas tratadas com FGFb. Além disso, os processos neuronais não tiveram seu número alterado, mas encontravam-se bem mais

distendidos, se comparados aos processos emitidos de células tratadas com FGFb. Cultura de células gliais C6 tratadas com IL-4 200ng/mL por 24 ou 72 horas também apresentaram morfologia semelhante à encontrada em nossa culturas. Entretanto, o tratamento com concentrações inferiores (10-50ng/mL) não induziu alterações morfológicas significativas (Brodie & Goldreich, 1994).

A pré-incubação com IL-4 por 24 horas e o tratamento posterior com FGFb por mais 48 horas potencializou a ação trófica do FGFb. Neste período de pré-incubação poderiam ocorrer eventos preparatórios importantes para que fosse criado um microambiente ideal para o FGFb executar suas ações. Dentre estes eventos está a inserção de novos receptores FGFRs na membrana plasmática. Diversos trabalhos da literatura descrevem a capacidade que tem a IL-4 de induzir/regular a síntese de proteínas, aumentando a expressão de receptores para IL-8 em monócitos humanos (Bonocchi *et al*, 2000) e receptores para a IL-1 em astrócitos primários (Pousset *et al*, 2001). Para avaliarmos se o efeito da IL-4 era mediado pela translocação de FGFRs até a membrana, utilizamos a brefeldina A, um metabólito de um fungo que inibe a secreção de polipeptídeos pois impede a fusão vesicular que ocorre no complexo de Golgi. Como a brefeldina não foi capaz de bloquear o efeito da IL-4 podemos supor que o efeito desta citocina não envolva o aumento dos receptores para FGF nas membranas por translocação.

Também investigamos a possibilidade da IL-4 50U/mL potencializar o efeito trófico do FGFb em concentrações inferiores. Observamos um aumento na proliferação já nas concentrações de 5 e 15ng/mL de FGFb (50 e 100%

respectivamente). Quando mantivemos o FGFb na concentração de 25ng/mL e utilizamos a IL-4 em concentrações inferiores nos períodos de incubação de 60 e 96 horas não obtivemos um aumento significativo na incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina.

Os resultados obtidos com o FGFb e a IL-4 em diversas concentrações revelam um grande sinergismo na proliferação de células retinianas, o que nos surpreende por duas razões: primeiro por que o efeito do FGFb já se mostra muito potente se comparado ao de outros fatores; segundo porque a maioria das respostas à interleucina-4 é descrita como inibitória, como por exemplo na indução da apoptose em células endoteliais via ativação da caspase-3 (Lee *et al*, 2000).

Evidências apontam para as células gliais como os principais alvos da IL-4 no Sistema Nervoso, fato que também não podemos descartar de ter acontecido em nossas culturas (Brodie, 1996; Araujo e Cotman, 1995).

Outros aspectos ainda precisam ser observados em relação ao sinergismo apresentado por essas duas citocinas como: a identificação das vias de sinalização evocadas pela IL-4. A via da jak/stat é descrita como a principal mediadora de seus efeitos (Nelms *et al*, 1999), principalmente a STAT6 na proliferação de células T (Wurster *et al.*, 2002). Além disso, é importante investigarmos se a síntese protéica é um pré-requisito para essa potencialização.

## 6 CONCLUSÕES

- O FGFb induz um aumento significativo na proliferação das células da retina de forma dose e tempo dependente. A confluência das culturas é obtida em 144 horas *in vitro*. Esta situação é evidenciada pelo decaimento na incorporação de timidina, sinalizando uma parada na divisão celular. Entretanto, a morfologia da cultura mantém-se exuberante.
- A presença de neurônios nas culturas em todos os períodos indica que o tratamento com FGFb também aumenta a sobrevivência neuronal e provavelmente a diferenciação destas células.
- O FGFb é capaz de estimular a proliferação de células da retina mesmo na ausência de soro, evidenciando um efeito isolado do fator sobre as células mantidas em cultura.
- O aumento na proliferação induzido pelo FGFb pode ser observado mesmo em culturas de 5 dias incubadas por 48 horas. Entretanto, em culturas de 7 dias este efeito cessa.
- A pré-incubação das culturas com IL-4 potencializa o efeito proliferativo do FGFb. Tal potencialização ocorre de modo independente da mobilização de receptores FGFRs para a membrana plasmática.

## / **PERSPECTIVAS PARA O DOUTORADO**

- observar a expressão do FGFb, IL-(r)Tj 0 Tc 4.511992 0 Td ()490.005276 Tc 7.55977 0 Td e 92

## 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.Dev.Neurosci.*, **13**, 685-693.

**ABE,K. & SAITO,H.** (2001) Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions. *Pharmacol.Res.*, **43**, 307-312.

**ADLER,R.** (1993) Determination of cellular types in the retina. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, **34**, 1677-1682.

**ARAUJO,D.M. & COTMAN,C.** (1995) Differential effects of interleukin-1 beta and interleukin-2 on glia and hippocampal neurons in culture. *Int.J.Dev.Neurosci.*, **13**, 201-212.

**ARMELIN H.A.**, (1973) Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 70, **9**, p. 2702-2706.

**BAIRD,A., ESCH,F., GOSPODARO ICZ,D. & GUILLEMIN,R.** (1985) Retina- and eye-derived endothelial cell growth factors: partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemistry*, **24**, 7855-7860.

**BARON, ., DE JONGE,J.C., DE,V.H. & HOEKSTRA,D.** (1998) Regulation of oligodendrocyte differentiation: protein kinase C activation prevents differentiation of O2A progenitor cells toward oligodendrocytes. *Glia*, **22**, 121-129.

**BARON, ., METZ,B., BANSAL,R., HOEKSTRA,D. & DE,V.H.** (2000) PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Mol.Cell Neurosci.*, **15**, 314-329.

**BARRITAU, D., ARRUTI, C. & COURTOIS, Y.** (1981). Is there a ubiquitous growth factor in the eye? Proliferation induced in different cell types by eye-derived growth factors. *Differentiation*, v. **18**, 29-42.

**BASILICO, C. & MOSCATELLI, D.** (1992) The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.*, **59**, 115-165.

**BAYATTI, N. & ENGELE, J.** (2002) Cyclic AMP differentially regulates the expression of fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors in cultured cortical astroglia. *Neuroscience*, **117**, 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. *Prog. Neurobiol.*, **63**, 497-516.

**BIKFALVI, A., KLEIN, S., PINTUCCI, G. & RIFKIN, D. B.** (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr. Rev.*, **18**, 26-45.

**BOILLY, B., VERCOUTTER-EDOUART, A. S., HONDERMARCK, H., NURCOMBE, V. & LE, B. X.** (2000) FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **11**, 295-302.

**BONECCHI, R., FACCHETTI, F., DUSI, S., LUINI, F., LISSANDRINI, D., SIMMELINK, M., LOCATI, M., BERNASCONI, S., ALLAVENA, P., BRANDT, E., ROSSI, F., MANTOVANI, A. & SOZZANI, S.** (2000) Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J. Immunol.*, **165**, 3862-3869.

**BRODIE, C. & GOLDREICH, N.** (1994) Interleukin-4 modulates the proliferation and differentiation of glial cells. *J. Neuroimmunol.*, **55**, 91-97.

**BRODIE, C.** (1996) Differential effects of Th1 and Th2 derived cytokines on NGF synthesis by mouse astrocytes. *FEBS Lett.*, **391**, 117-120.

**BRODIE,C., GOLDREICH,N., HAIMAN,T. & KAZIMIRSKY,G.** (1998)  
Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion. *J.Neuroimmunol.*, **8**, 20-30.

**BURCHILL,S.A. & EST OOD,G.** (2002) Mechanism of basic fibroblast growth factor-induced cell death. *Apoptosis.*, **1**, 5-12.

**CAMPOCHIARO,P.A., CHANG,M., OHSATO,M., VINOES,S.A., NIE,Z., HJELMELAND,L., MANSUKHANI,A., BASILICO,C. & ZACK,D.J.** (1996)  
Retinal degeneration in transgenic mice with photorecepto

**DO D,C.J., COONEY,C.L. & NUGENT,M.A.** (1999) Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding. *J.Biol.Chem.*, **274**, 5236-5244.

**DO LING,J.E.** (1991) Retina. *Enc.Human Biol.*

**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.*, **11**, 3070-3078.

**ES ARAKUMAR,V.P., LAX,I. & SCHLESSINGER,J.** (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **16**, 139-149.

**FAKTOROVICH,E.G., STEINBERG,R.H., YASUMURA,D., MATTHES,M.T. & LAVAIL,M.M.** (1992) Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J.Neurosci.*, **12**, 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. *Dev.Biol.*, **133**, 140-147.

**FLANDERS,K.C., LÜDECKE,G., RENZING,J., HAMM,C., CISSEL,D. & UNSICKER,K.** (1993) Effects of TGF $\beta$  and bFGF on astroglial cell growth and gene expression *in vitro*. *Mol.Cell.Neurosci.*, **7**, 406-417.

**FLORKIE ICZ,R.Z., ANCHIN,J. & BAIRD,A.** (1998) The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J.Biol.Chem.*, **273**, 544-551.

**FOLKMAN,J. & KLAGSBRUN,M.** (1987) Angiogenic factors. *Science*, **235**, 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.*, **18**, 9662-9672.

**FRADE,J.M., RODRIGUEZ-TEBAR,A. & BARDE,Y.A.** (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*, **383**, 166-168.

**GAO,H. & HOLLYFIELD,J.G.** (1995) Basic fibroblast growth factor in retinal development: differential levels of bFGF expression and content in normal and retinal degeneration (rd) mutant mice. *Dev.Biol.*, **169**, 168-184.

**GONZALEZ-FERNANDEZ,F., VAN,N.E., EDMONDS,C., BEAVER,H., NICKERSON,J.M., GARCIA-FERNANDEZ,J.M., CAMPOHIARO,P.A. & FOSTER,R.G.** (1993) Differential expression of interphotoreceptor retinoid-binding protein, opsin, cellular retinaldehyde-binding protein, and basic fibroblastic growth factor. *Exp.Eye Res*, **56**, 411-427.

**GOSPODARO ICZ,D.** (1974) Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*, **259**, 123-127.

**GOSPODARO ICZ,D. & MORAN,J.** (1974) Effect of a fibroblast growth factor, insulin, dexamethasone, and serum on the morphology of BALB/c 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **71**, 4648-4652.

**GOUSTIN,A.S., LEOF,E.B., SHIPLEY,G.D. & MOSES,H.L.** (1986) Growth factors and cancer. *Cancer Res*, **46**, 1015-1029.

**GROTHER,C. & E ETZER,K.** (1996) Fibroblast growth factor and its implications for developing and regenerating neurons. *Int.J.Dev.Biol.*, **30**, 403-410.

**HANNEKEN,A.** (2001) Structural characterization of the circulating soluble FGF receptors reveals multiple isoforms generated by secretion and ectodomain shedding. *FEBS Lett.*, **499**, 176-181.

**HARADA,T., HARADA,C., NAKAYAMA,N., OKUYAMA,S., YOSHIDA,K., KOHSAKA,S., MATSUDA,H. & ADA,K.** (2000) Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron*, **26**, 533-541.

**HARADA,T., HARADA,C., KOHSAKA,S., ADA,E., YOSHIDA,K., OHNO,S., MAMADA,H., TANAKA,K., PARADA,L.F. & ADA,K.** (2002) Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J.Neurosci.*, **22**, 9228-9236.

**HOLLBORN,M., JAHN,K., LIMB,G.A., KOHEN,L., IEDEMANN,P. & BRINGMANN,A.** (2004) Characterization of the basic fibroblast growth factor-evoked proliferation of the human Muller cell line, MIO-M1. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.*, **2**, 414-422.

**ITO,M.** (2003) Insulin or bFGF and C2 ceramide increase newborn rat retinal ganglion cell survival rate. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **317**, 564-571.

**ITOH,N. & ORNITZ,D.M.** (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet.*, **20**, 563-569.

**KIM,I., MOON,S., YU,K., KIM,U. & KOH,G.Y.** (2001) A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas(1). *Biochim.Biophys.Acta*, **1518**, 152-156.

**KIM,J., CHEON,I.S., SON,Y.J., NA,H.J., KIM,Y.M. & CHOE,J.** (2003) IL-4 inhibits cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cells by affecting p53, p21(Waf1), cyclin D1, and cyclin E expression. *Mol.Cells*, **16**, 92-96.

**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** pp. 43871-43878.

**KINKL,N., HAGEMAN,G.S., SAHEL,J.A. & HICKS,D.** (2002) Fibroblast growth factor receptor (FGFR) and candidate signaling molecule distribution within rat and human retina. *Mol.Vis.*, **8**, 149-160.

**KNISS,D.A. & BURRY,R.** (1988) Serum and fibroblast growth factor stimulate quiescent astrocytes to re-enter the cell cycle. *Brain Res*, **49**, 281-288.

**KNUSEL,B., MICHEL,P.P., SCHÄBERER,J.S. & HEFTLI,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, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J.Neurosci.*, **10**, 558-570.

**KREJCI,P., BRYJA,V., PACHERNIK,J., HAMPL,A., POGUE,R., MEKIKIAN,P. & ILCOX, R.** (2004) FGF2 inhibits proliferation and alters the cartilage-like phenotype of RCS cells. *Exp.Cell Res.*, **29**, 152-164.

**LEE,I.Y., KIM,J., KO,E.M., JEOUNG,E.J., KIM, Y.G. & CHOE,J.** (2002) Interleukin-4 inhibits the vascular endothelial growth factor- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Mol.Cells*, **14**, 115-121.

**LEE,Y. S., KUHN,H., HENNIG,B. & TOBOREK,M.** (2000) IL-4 induces apoptosis of endothelial cells through the caspase-3-dependent pathway. *FEBS Lett.*, **478**, 122-126.

**LUNDIN,L., LARSSON,H., KREUGER,J., KANDA,S., LINDAHL,U., SALMIVIRTA,M. & CLAESSON-ELSH,L.** (2000) Selectively desulfated heparin inhibits fibroblast growth factor-induced mitogenicity and angiogenesis. *J.Biol.Chem.*, **275**, 24653-24660.

**LUNDIN,L., RONNSTRAND,L., CROSS,M., HELLBERG,C., LINDAHL,U. & CLAESSON-ELSH,L.** (2003) Differential tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 and receptor proximal signal transduction in response to FGF-2 and heparin. *Exp.Cell Res.*, **28**, 190-198.

**MA, ., LI,B.S., MARIC,D., ZHAO, .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-activated signaling pathways. *Neuroscience*, **118**, 37-47.

**MARQUARDT,T. & GRUSS,P.** (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci.*, **25**, 32-38.

**MASCARELLI,F., RAULAIS,D., COUNIS,M.F. & COURTOIS,Y.** (1987) Characterization of acidic and basic fibroblast growth factors in brain, retina and vitreous chick embryo. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, **16**, 478-486.

**MENA,M.A., CASAREJOS,M.J., GIMENEZ-GALLEGO,G. & GARCIA DE,Y.J.** (1995) Fibroblast growth factors: structure-activity on dopamine neurons in vitro. *J.Neural Transm.Park Dis.Dement.Sect.*, **9**, 1-14.

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

**MORRISON,R.S., SHARMA,A., DE,V.J. & BRADSHA ,R.A.** (1986) Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **83**, 7537-7541.

**NELMS,K., KEEGAN,A.D., ZAMORANO,J., RYAN,J.J. & PAUL, .E.** (1999) The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu.Rev.Immunol.*, **17** , 701-738.

**NE MAN,E. & REICHENBACH,A.** (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.*, **19**, 307-312.

**NUGENT,M.A. & IOZZO,R.V.** (2000) Fibroblast growth factor-2. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **32**, 115-120.

**ORNITZ,D.M. & ITOH,N.** (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol.*, **2**, 1-12.

**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.*, **178**, 302-314.

**PARK,C.M. & HOLLENBERG,M.J.** (1989) Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev.Biol.*, **133**, 201-205.

**PERRON,J.C. & BIXBY,J.L.** (1999) Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation. *Mol.Cell Neurosci.*, **13**, 362-378.

**POUSSET,F., CREMONA,S., DANTZER,R., KELLEY,K. . & PARNET,P.** (2001) IL-10 and IL-4 regulate type-I and type-II IL-1 receptors expression on IL-1 beta-activated mouse primary astrocytes. *J.Neurochem.*, **77**, 726-736.

**REESE,B.E. & COLELLO,R.J.** (1992) Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience*, **46**, 419-429.

**REUSS,B. & VON BOHLEN UND,H.O.** (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res.*, **313**, 139-157.

**RIVA,M.A., MOLTENI,R., BEDOGNI,F., RACAGNI,G. & FUMAGALLI,F.** (2005) Emerging role of the FGF system in psychiatric disorders. *Trends Pharmacol.Sci.*, **26**, 228-231.

**RUDLAND,P.S., SEIFERT, . & GOSPODARO ICZ,D.** (1974) Growth control in cultured mouse fibroblasts: induction of the pleiotypic and mitogenic responses by a purified growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **71**, 2600-2604.

**RUSSELL,C.** (2003) The roles of Hedgehogs and Fibroblast Growth Factors in eye development and retinal cell rescue. *Vision Res.*, **43**, 899-912.

**SLEEMAN,M., FRASER,J., MCDONALD,M., YUAN,S., HITE,D., GRANDISON,P., KUMBLE,K., ATSON,J.D. & MURISON,J.G.** (2001) Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene*, **271**, 171-182.

**SPORN,M.B., ROBERTS,A.B., AKEFIELD,L.M. & DE,C.B.** (1987) Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J.Cell Biol*, **115**, 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. *Exp.Cell Res*, **212**, 30-35.

**TROPEPE,V., COLES,B.L., CHIASSON,B.J., HORSFORD,D.J., ELIA,A.J., MCINNES,R.R. & VAN DER,K.D.** (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, **288**, 2032-2036.

**UGOLINI,G., CREMISI,F. & MAFFEI,L.** (1995) TrkA, TrkB and p75 mRNA expression is developmentally regulated in the rat retina. *Brain Res*, **687**, 121-124.

**VON BARTHELD,C.S.** (1998) Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol.Histopathol.*, **13**, 437-459.

**ALICKE,P., COGAN,M., UENO,N., BAIRD,A. & GUILLEMIN,R.** (1986) Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **83**, 3012-3016.

**ALSH,N., VALTER,K. & STONE,J.** (2001) Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. *Exp.Eye Res*, **72**, 495-501.

**IEDLOCHA,A. & SORENSEN,V.** (2004) Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, **286**, 45-79.

**URSTER,A.L., RODGERS,V.L., HITE,M.F., ROTHSTEIN,T.L. & GRUSBY,M.J.** (2002) Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J.Biol Chem.*, **277**, 27169-27175.

**XIE,M.H., HOLCOMB,I., DEUEL,B., DO D,P., HUANG,A., VAGTS,A., FOSTER,J., LIANG,J., BRUSH,J., GU,Q., HILLAN,K., GODDARD,A. & GURNEY,A.L.** (1999) FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine*, **11**, 729-735.

**ZHANG,C., TAKAHASHI,K., LAM,T.T. & TSO,M.O.** (1994) Effects of basic fibroblast growth factor in retinal ischemia. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, **35**, 3163-3168.

**ZHANG,Y., MADIAI,F. & HACKSHA ,K.V.** (2001) Cloning and characterization of a novel form of mouse fibroblast growth factor-1 (FGF-1) mRNA, FGF-1.G: differential expression of FGF-1 and FGF-1.G mRNAs during embryonic development and in postnatal tissues. *Biochim.Biophys.Acta*, **1521**, 45-58.

**ZHAO,S. & BARNSTABLE,C.J.** (1996) Differential effects of bFGF on development of the rat retina. *Brain Res.*, **723**, 169-176.

# 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](#)