

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**

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

**SIMONE VIDAL MEDINA**

# **IGF-I AUMENTA A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DA RETINA: VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS**

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

**Orientadora: Elizabeth Giestal de Araujo**



**NITERÓI**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**SIMONE VIDAL MEDINA**

**IGF-I AUMENTA A PROLIFERAÇÃO DE  
CÉLULAS DA RETINA EM CULTURA:  
VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Hertha  
Meyer Departamento de Neurobiologia, Programa de  
Neuroimunologia  
Instituto de Biologia – UFF  
com apoio financeiro: CNPq; PRONEX-CNPq; CAPES & FAPERJ

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

**Orientadora: Elizabeth Giestal de Araujo**

**NITERÓI  
2008**

**SIMONE VIDAL MEDINA**

**IGF-I aumenta a proliferação de células da retina em cultura: Vias de sinalização envolvidas**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra Leny Alves Cavalcante

---

Dra Silvana Allodi

---

Dra Patrícia Franca Gardino

---

Dr Roberto Paes de Carvalho

---

Dra Elizabeth Giestal de Araujo

**NITERÓI  
2008**

Medina, Simone Vidal  
**IGF-I aumenta a proliferação de células da retina em cultura: Vias de sinalização envolvidas** / Simone Vidal Medina – Niterói: [s. n.], 2007.

f.

Tese (Doutorado em Neuroimunologia). – Universidade Federal Fluminense, 2008.

1. 2. 3. 4. 5.            I. Título.

O impossível se torna provável e o provável se torna fato  
quando o suor da labuta preenche os dias de trabalho.

Leandro de Araújo Martins.

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram nessa jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado força, saúde e muita perseverança para prosseguir nessa jornada.

Ao meu marido, Mauro César pelo apoio incondicional e pelos inúmeros finais de semana de companheirismo no trabalho de laboratório. Muito obrigada!

A meus pais, Rosélia e Moacyr que me apoiaram.

Aos meus irmãos Tatiana e Luiz Gustavo que estiveram sempre ao meu lado.

Aos meus cunhados José Guilherme e Sylvia pela boa vontade em momentos difíceis.

As minhas queridas sobrinhas Maria Clara e Letícia pelas horas alegres que me propiciam. Amo muito vocês!

A minha querida orientadora Beth que acreditou em mim e me apoiou nas horas mais difíceis.

Ao Docinho e ao Leandro que me ajudaram na formatação da tese e nos experimentos.

Ao Guilherme que me ajudou na obtenção das fotomicrografias que ilustram esse trabalho, muito obrigada pela sua paciência e apoio.

Ao professor Chico pela atenção e ajuda que me foi dada durante todo o período da minha tese.

À professora Ana cujos os ouvidos agüentaram o barulho contínuo da bomba de vácuo.

A todos os amigos do laboratório: Aline, Babu, Karinne, Andréa, Raphael, Carla, Lia, Sheila, Yolanda, pela amizade e espírito de companheirismo sempre presente e pela ajuda pois ela foi fundamental para eu chegar até aqui.

A aqueles amigos que passaram pelo laboratório e que deixaram muitas saudades: Fernanda, Cecília, Paty Maura, Odélio, Andréa.

À Keila que me apresentou no laboratório e me incentivou na Iniciação Científica.

Ao Alexandre José Fernandes, Bernardino Matheus dos Santos e Alecsandro de Jesus Rezende pelo apoio técnico.

A Débora que foi muito especial para mim.

## SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
	RESUMO.....	XIII
	ABSTRACT.....	XIV
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	RETINA.....	2
1.2	PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	5
1.3	IGF.....	14
1.4	RECEPTORES DE IGF.....	20
1.5	PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO IGF(IGFBPs).....	24
1.6	SINALIZAÇÃO QUÍMICA.....	33
2.0	OBJETIVO.....	38
3.0	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.0	MÉTODOS.....	39
3.2	TRATAMENTO DAS PLACAS DE PETRI COM POLI-L-ORNITINA.....	39
3.3	CULTURA DE CÉLULAS DA RETINA DE RATOS.....	40
3.4	ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE [ <sup>3</sup> H]-TIMIDINA.....	42
3.5	FOTOMICROGRAFIAS.....	43
3.6	ANÁLISE ESTÁTISTICA DOS RESULTADOS.....	44
4.0	RESULTADOS.....	45
5.0	DISCUSSÃO.....	75
6.0	BIBLIOGRAFIA.....	91

# LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc - 3`5`-adenosina monofosfato cíclico  
ASPP1 - proteína  
ATP – adenosina trifosfato  
BAPTA - 1.2 bis(aminofenoxi)etano-N,N,N', N'-ácido tetra acético  
BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro  
BrdU – bromodeoxiuridina  
Brn3 – família de proteínas  
BSA - albumina de soro bovino  
Cdk - cinases dependentes de ciclinas  
CKI - ciclinas inibidoras de cinases  
CMF - solução salina sem cálcio e magnésio  
CNI - camada nuclear interna  
CNE - camada nuclear externa  
CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono  
CPE- camada plexiforme externa  
CPI – camada plexiforme interna  
Crk – ciclina relacionada a cinase  
DAG diacilglicerol  
DNA - ácido desoxirribonucléico  
E – Dia embrionário  
E2F – fator de transcrição (fator de alongamento 2)  
EGF – Fator de crescimento epidermal  
EPR - epitélio pigmentar da retina  
ERK – Cinase reguladas por sinais extracelulares  
Fase M – mitose  
Fase S – síntese de DNA  
FCS - soro fetal bovino  
FGF – fator de crescimento de fibroblastos  
FGFa ou FGF-1 - fator de crescimento de fibroblasto ácido  
FGFb ou FGF-2 - fator de crescimento de fibroblasto básico  
G1 - Fase da interfase; primeiro intervalo, após a mitose  
G2 – Fase da interfase; segundo intervalo, antes da próxima mitose  
GH – hormônio de crescimento ou hormônio somatotrófico  
Grb2 – Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento  
IGF-I – fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1  
IGF-2 - fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2  
IGFBps – proteínas de ligação ao IGF  
IGFR-1 – receptor para IGF do tipo 1  
IP3 – Inositol trifosfato  
IRS - substrato do receptor de insulina

JAK - família de proteínas tirosina cinases associadas a receptores de citocinas, chamadas de Janus quinases (um grupo que inclui as seguintes quinases: JAK1, JAK2, JAK3 e TyK2)

JNK – cinase do c jun

KD - domínio cinase

M199 – meio de cultura 199

MAPK - proteína cinase ativadora de mitose

MEK – Cinase ativadora da MAP cinase

NFKappa B – família de proteínas

NGF - fator de crescimento do nervo

NSILA – anticorpos anti insulina

NT - neurotrofinas

P0 – Dia pós-natal 0

p38 MAPK – uma outra cinase da família das MAPK

p53 – proteína inibidora de tumor; proteína supressora de tumor

PACAP - polipeptídeo ativador de adenilil ciclase produzido pela pituitária

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

PE - epitélio pigmentar

PI3 - inositol-3 fosfato

PI3K – cinase do fosfatidilinositol na posição 3

PIP<sub>2</sub> - fosfatidilinositol bi-fosfato

PKA - proteína cinase A

PKC - proteína cinase C

pRb - proteína inibidora de ciclo celular ausente em de tumor do tipo retinoblastoma

PSA – antígeno específico prostático

Raf – cinase que ativa a MEK

Ras – proteína de um sarcoma de rato

RE - retículo endoplasmático

RGC – células ganglionares da retina

RNA - ácido ribonucléico

RNA<sub>m</sub>: ácido ribonucléico mensageiro

Sh2 – domínio de homologia src

Shc - proteína semelhante ao colágeno com homologia src

Shp2 – proteína tirosina fosfatase que contem o domínio SH2

SIR - sítio interno do ribossomo

SN - sistema nervoso

SNC - sistema nervoso central

SOS – son of sevenless

Src – família de proteínas cinases nomeada a partir do produto do gene v-src do vírus do sarcoma Rous; proteína de sarcoma de retina de galinha

TCA - ácido tricloroacético

Tyr – resíduo tirosina

WAF1/CIP1/p21 – gene que codifica a atividade Cdk regulatória

## RESUMO

O IGF-I é um fator de crescimento que está envolvido com o processo de sobrevivência, de proliferação e de diferenciação celular. A proposta do nosso trabalho foi estudar, *in vitro*, o papel do IGF-I na proliferação de células da retina de ratos neonatos. Nossos resultados demonstram que o tratamento com IGF-I aumenta a proliferação em aproximadamente 50% sendo esse efeito tempo e dose dependentes. A melhor resposta obtida foi com a concentração de 10ng/mL por um período de 24 e 48 horas. Após 72 horas de tratamento o efeito do IGF-I já não era mais evidenciado. As vias da PI3K, fosfolipase C, PKC  $\delta$ , MAPK, JNK e Src estão envolvidas no efeito do IGF-I. A ação do IGF-I depende da ativação da metaloproteinase 9, da ativação dos receptores de EGF, da secreção vesicular de polipeptídeos e da internalização de receptores. Em conjunto, nossos resultados nos permitem concluir que o efeito proliferativo do IGF-I sobre células da retina depende da ativação dos receptores de EGF e envolve inúmeras vias de sinalização intracelular. A transitoriedade do efeito do IGF-I sobre a proliferação celular sugere que este fator possa controlar o processo de proliferação e até mesmo induzir a diferenciação de células da retina.

## ABSTRACT

IGF-I is a growth factor playing a role in cell survival, cell proliferation and cell differentiation. The purpose of this work was to study, in vitro, the effect of IGF-I on retinal cell proliferation. Our results show that treatment with IGF-I induces a 50% increase in cellular proliferation. This effect was dose and time dependent. The greater response was obtained with 10ng/mL IGF-I after 24-48h in culture. However after 72h, cultures treated with IGF-I did not exhibit an increase in cell proliferation. The effect of IGF-I involves the stimulation of several intracellular pathways including activation of PI-3 kinase, phospholipase C, PKC  $\delta$ , MAPK, JNK and Src. Our results suggest that following IGF-I treatment the metalloproteinase 9 and EGF receptors are stimulated. When we either blocked the vesicular release of polypeptides or the internalization of membrane receptors the effect of IGF-I was inhibited. Taken together our results show that the proliferative effect of IGF-I depends on the activation of EGF receptors and on the activation of distinct intracellular pathways. Since the IGF-I effect was observed only during the first 48h in culture we may suggest a regulatory role of this trophic factor in the control of cellular proliferation of retinal cells.

## Lista de drogas utilizadas

<b>Droga</b>	<b>Ação</b>
Genisteína	Inibidor de tirosinas cinases
Cloreto de queleritrina	Inibidor da PKC
Rotllerina	Inibidor da PKC $\delta$
Brefeldina A	Inibidor da secreção de polipeptídeos via RE/Golgi
PD98059	Inibidor da MEK
SB-202190	Inibidor da p38
LY294002	Inibidor da PI3 cinase
PP1	Inibidor das Src
MM9	Inibidor da metaloproteinase 9
Inibidor da JNK	Inibidor da JNK
Cadaverina	Inibidor da internalização do receptor
AG1478	Inibidor do receptor de EGF
IOMEAG538	Inibidor do receptor de IGF
U73122	Inibidor da fosfolipase C
K252a	Inibidor do receptor TRK

## 1- INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso é promovido e regulado por diferentes moléculas e macromoléculas que, através de mecanismos de sinalização química tanto humorais como celulares, regulam os distintos eventos deste processo. O conhecimento das vias de sinalização permite uma maior compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos e certamente contribuirá para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, capazes de corrigir desvios no processo de sinalização presentes em diversos quadros patológicos. Desta forma, os estudos acerca das vias de sinalização utilizadas tanto por neurotransmissores como por citocinas passou a ter uma importância crucial.

A sinalização química modula direta ou indiretamente a expressão gênica, sendo a primeira etapa deste fenômeno o acoplamento de moléculas sinalizadoras com seus receptores específicos (Rose-John and Heinrich, 1994; Heaney and Golde, 1993 para revisão). Assim sendo, o microambiente celular desempenha um papel determinante durante todo o desenvolvimento. Diferentes ou semelhantes moléculas agindo em diferentes receptores modulam de forma positiva ou negativa processos que compõem o complexo desenrolar do desenvolvimento. Didaticamente, podemos ordenar este processo em diferentes etapas tais como: geração de células progenitoras, proliferação, migração, diferenciação, seleção de

determinadas populações através do mecanismo de apoptose, estabelecimento de interações definitivas e manutenção destas interações durante toda a vida adulta (Ip and Yancopoulos, 1994; Rose-John and Heinrich, 1994; Korshing, 1993).

## **1.1 - Retina**

O tecido retiniano tem sido, ao longo de muitos anos, um importante objeto de estudo de muitos pesquisadores. Este tecido sensorial é de vital importância pois possibilita a transdução do sinal luminoso em atividade elétrica, que após uma série de etapas de processamento da informação, em diferentes regiões do sistema nervoso central, nos confere o sentido amplo da visão. Desta maneira, o entendimento dos mecanismos que medeiam o processo de desenvolvimento deste tecido nos permite conhecer com mais propriedade este processo e nos dá possibilidade de propor estratégias terapêuticas, que nos ajudem a interferir em patologias que acometem a retina.

A retina caracteriza-se por ser um tecido muito bem organizado que tem sua origem no ectoderma neural embrionário, o mesmo que origina o sistema nervoso central (Dowling, 1991). Esse tecido tem uma localização privilegiada o que permite sua fácil obtenção já que é relativamente fácil separá-la do tecido conjuntivo adjacente e não existem contactos, dentro

do globo ocular, com outras populações neuronais e gliais. Esse tecido também apresenta uma outra característica muito importante que é a presença de cinco grandes populações de células nervosas e uma população predominante de células gliais constituída pelas células de Müller. Além disso, como muitos grupos fazem uso deste modelo, existe uma grande quantidade de informações sobre este tecido o que permite comparar e correlacionar os resultados experimentais novos com os dados presentes na literatura (Adler, 1993; Cepko, 1993; Dowling, 1991 para revisão).

A semelhança do que ocorre em outras regiões do sistema nervoso central, as células que constituem o tecido retiniano diferenciado (figura 1) estão organizadas em camadas como descrevemos a seguir:

- camada nuclear externa (CNE) –nesta camada estão presentes os corpos celulares dos fotorreceptores que se dividem em dois subtipos: os cones e os bastonetes .
- camada plexiforme externa (CPE) – é formada pelos prolongamentos das células bipolares, horizontais e dos fotorreceptores que fazem contatos sinápticos entre si.
- camada nuclear interna (CNI) – é constituída por células bipolares, horizontais, amácrinas e as ganglionares deslocadas. Células de Muller apresentam seus corpos

celulares nesta região e seus processos perpassam as demais camadas da retina.

- camada plexiforme interna (CPI) - nesta camada os prolongamentos de células bipolares, amácrinas e ganglionares fazem contatos sinápticos.
- camada de células ganglionares – nela estão localizadas as células amácrinas deslocadas e as células ganglionares (Dowling, 1991 para revisão).

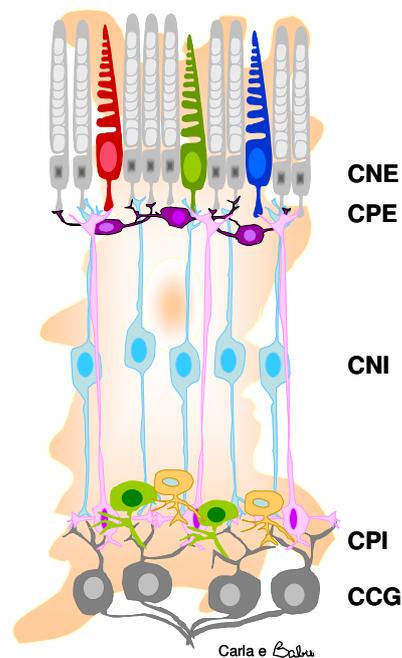


Figura 1: Esquema simplificado da retina de vertebrados. Representação dos diferentes tipos celulares, bem como as camadas celulares e sinápticas da retina neural (CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Esquema gentilmente cedido por Gustavo de Rezende Corrêa e Carla Valéria Vieira Guillarducci-Ferraz.

Estudos sobre a neurogênese em retinas de ratos demonstraram que as primeiras células a serem geradas são as ganglionares. Elas se diferenciam entre o dia embrionário E14 e E20 (Reese and Colello, 1992). As células amácrinas surgem entre o dia E14 e E22 (Reese and Colello, 1992), já as células horizontais entre E16 a E20 e os cones entre E14 e o dia pós-natal 0 (P0) (Cepko, 1993). As células bipolares, os bastonetes e as células de Müller têm sua geração compreendida entre E20 e P13 (Cepko, 1993).

À medida que o conhecimento acerca das interações entre as células neuronais e gliais foi avançando, tornou-se claro que estas duas populações apresentam vias de sinalização cooperativas o que possibilita a manutenção da homeostasia do sistema. No caso específico do tecido retiniano, a literatura demonstra claramente que as células de Müller expressam receptores para neurotransmissores e fatores tróficos, produzem diferentes citocinas e desempenham um papel importante na sobrevivência e na diferenciação neuronal (Ikeda and Puro, 1995).

## **1.2- Proliferação Celular**

Desde há muito tempo que o processo de divisão celular tem despertado a curiosidade de vários pesquisadores. É intrigante constatar a capacidade das células de se perpetuarem de forma tão bem orquestrada.

Ao longo de anos, vários pesquisadores se dedicaram a decifrar os mecanismos envolvidos na progressão e no controle do ciclo celular. Atualmente, apesar de não se saber descrever com precisão todos os eventos, já se sabe bastante sobre este processo e a compreensão dos mecanismos que regulam positiva e negativamente este fenômeno vêm sendo desvendados (Alberts et al., 2002).

Em 1951, Howard e Pele descreveram pela primeira vez o ciclo celular e o dividiram didaticamente em duas fases distintas respectivamente denominadas de mitose e de intérfase. Com o passar dos anos cada uma das fases foi melhor caracterizada e os diferentes mecanismos envolvidos foram paulatinamente desvendados (Golias et al., 2004 para revisão).

Resumidamente podemos caracterizar a mitose como uma fase distributiva e a intérfase como uma fase preparatória. Durante a intérfase ocorre a síntese do DNA e este período recebe a denominação de fase S. Aos dois intervalos de tempo entre a fase de mitose e a fase S atribuíram-se os nomes de fase G1 e G2 respectivamente. A fase S pode ser estudada através da incorporação de timidina tritiada tanto em ensaios bioquímicos como em ensaios autoradiográficos e também pode ser observada, no tecido ou em cultura, através da técnica de BrdU que permite quantificar o número de células em proliferação (Rehen, 2001;

Golias et al., 2004 para revisão). Na figura 2 estão ilustradas as diferentes fases do ciclo celular.

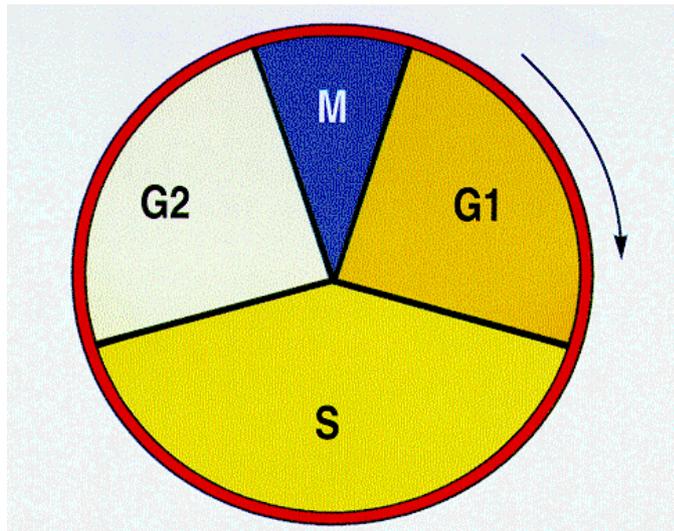


Figura 2: Estágio do ciclo celular. Fase M (mitose); fase S (síntese de DNA); G1: o primeiro intervalo após a mitose e antes da próxima fase S; G2: o segundo intervalo, ocorre após a síntese de DNA e antes da próxima mitose (Esquema retirado do capítulo escrito por Rehen, 2001).

Para que as células possam ser geradas de forma correta é imperativo que o ciclo celular transcorra de forma harmoniosa. Cada uma das etapas necessita ser controlada para que temporalmente tudo ocorra de forma precisa. Para tal, as células produzem proteínas que regulam, estimulam e inibem o ciclo celular. Dentre essas proteínas podemos

destacar as ciclinas, as cinases dependentes de ciclina (Cdks), os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CKI) e produto dos genes supressores de tumor, o p53 e a pRB (Golias et al., 2004). Sinais provenientes do meio extracelular podem e regulam a expressão destas proteínas fazendo com que as células entrem ou saiam do ciclo mitótico (Golias et al., 2004 ). A fase mitótica do ciclo celular inclui dois estágios: um de divisão celular denominado de mitose e um de divisão citoplasmática que é a citocinese. A ordem desses eventos é muito importante pois não seria possível ocorrer a citocinese antes da segregação dos cromossomos durante a mitose. Um mecanismo responsável para que essa ordem seja mantida é o controle do ciclo celular através da inativação de algumas proteínas requeridas para mitose (Alberts et al., 2002 para revisão). Os mecanismos que regulam o ciclo celular podem ser divididos em: extracelulares, do qual fazem parte os fatores de crescimento e os intracelulares, do qual fazem parte os produtos dos oncogenes e dos anti-oncogenes (Golias et al., 2004).

No final da década de 80 foram encontradas proteínas cinases dependentes de ciclina (Cdk do inglês cyclin dependent kinase). A promoção da mitose depende portanto de um complexo protéico formado por uma ciclina e por uma proteína cinase dependente de ciclina. O complexo ciclina – Cdk é ativado por uma alteração no seu padrão de fosforilação (Alberts et al., 2002; Golias et al., 2004 ).

Em 1980, Hunt e seus colaboradores observaram que havia uma grande variação na síntese protéica durante o ciclo celular. A cinética desta variação era bastante interessante pois, enquanto a maioria das proteínas se acumulava ao longo do ciclo celular, havia uma categoria que apresentava um padrão cíclico o que os levou a chamá-las de ciclinas. As ciclinas se acumulam na intérfase, têm seu pico na mitose (transição entre a metáfase e a anáfase) e logo a seguir são degradadas. Essas proteínas apresentam uma região conservada, a “Box” ciclina e apresentam peso molecular na faixa de 56kDa (Golias et al., 2004).

A ciclina A é capaz de ativar duas diferentes Cdks e tem efeito na fase S e na mitose. Na fase S a fosforilação de componentes da maquinaria de replicação do DNA, tal como o CDC6 pelo complexo ciclina A-Cdk desempenha um importante papel para o início da replicação do DNA. A ciclina A1 é expressa na meiose e na embriogênese precoce e a ciclina A2 é encontrada em células somáticas proliferantes. Na mitose a ciclina A também é capaz de regular a estabilidade da ciclina B (Golias et al., 2004; Giacinti and Giordano, 2006).

Acredita-se que a ciclina B2 desempenhe um papel na remodelagem do Golgi durante a mitose enquanto a ciclina B1 controla outras funções desse tipo de ciclina. As ciclinas do tipo D têm meia vida curta e a sua síntese e ligação com Cdk4 ou Cdk6 em G1 é dependente da

sinalização mitogênica. Os níveis de ciclina E encontram-se elevados na progressão das fases G1/S. Até o momento aproximadamente 16 ciclinas foram descobertas restando identificar as suas funções e o modelo de ligação (Golias et al. 2004, Giacinti and Giordano 2006).

Além do desenvolvimento normal do ciclo celular existem mecanismos denominados de pontos de checagem que verificam pontos estratégicos onde possam ocorrer falhas. Esses pontos possibilitam a identificação da falha e a sua correção, impedindo que ela se perpetue. Caso algum erro seja detectado, a passagem para a fase seguinte é atrasada, possibilitando assim o reparo do erro e evitando um dano maior caso o problema prosseguisse. Três pontos de checagem são fundamentais. Um ponto de checagem é o G2, que verifica se o DNA foi replicado de maneira correta e se o ambiente é favorável permitindo que a célula entre na fase M. O complexo que atua nesse ponto é ciclina B1/Cdk1. Um outro ponto é o de metáfase onde se verifica a ligação dos cromossomos ao fuso mitótico, e o último ponto é o de G1 que certifica se o ambiente está favorável para a célula entrar na fase S. A saída de G1 é controlada pelo complexo ciclina D/Cdk4/6 enquanto a transição G1/S e a progressão através da fase S é controlada pelo complexo ciclinas A e E e Cdk2 (Alberts et al., 2002; Sánchez and Dynlacht, 2005). Na tabela abaixo podemos observar claramente a importância e função dos complexos ciclina/CDK.

<b>CDK</b>	<b>Ciclina</b>	<b>Fase do ciclo celular</b>	<b>Espécie</b>	<b>Substrato</b>
CDC28	CLN1/CLN2	G1/S	S. cerevices	Sic1p
CDC28	CLB5/CLB6	Fase S	S. cerevices	Cdc6 e Swi5p
CDC28	CLB1/CLB2	M	S. cerevices	Pds1
CDK1	B1/B2	G2/M	Vertebrados	SI1, RNA PolIII, Emil Condensina TFIIB
CDK2	A2	S e Fase M	Vertebrados	CDC55
CDK2	E1/E2	Fase S	Vertebrados	PRC1, NPAT, CP110, RB
CDK4	D1/D2/D3	Transição G1/S	Vertebrados	RB, UBF
CDK6	D1/D2/D3	Transição G1/S	Vertebrados	RB, UBF

Tabela 1: Correlação entre ciclinas, Cdk's, fases do ciclo celular, espécies estudadas e substratos (Sánchez and Dynlacht, 2005).

A fase G1 desempenha um importante papel no direcionamento que a célula vai tomar. Ou ela dá sequência ao processo e evolui no ciclo ou ela para e entra em um estado quiescente. Este estado é denominado de G0. Entretanto, também pode haver parada do ciclo celular nas fases S, G2 ou M. Esse conjunto de mecanismos leva ao controle da progressão do ciclo celular. A proteína p53 desempenha um papel chave neste controle

regulando dois pontos de checagem, G1/S e G2/M (Golias et al., 2004). É interessante observar que pelo menos 50% dos tumores humanos apresentam algum tipo de mutação para o gene que codifica esta proteína, o que está diretamente relacionado à mitose descontrolada que as células tumorais apresentam. A p53 é capaz de ativar a transcrição de vários genes capazes de controlar o ciclo celular, entre eles WAF1/CIP1/p21 que codifica a atividade Cdk regulatória (Rehen, 2001; Golias et al., 2004). Estudos recentes mostraram que esse efeito antiproliferativo da p53 é mediado pela estimulação de uma proteína de 21kDa, a p21cip/waf1, uma CKI que inibe a atividade de Cdks como a D/Cdk4 ou 6 assim como E/Cdk2, e conseqüentemente a divisão celular (Golias et al., 2004).

Após um dano citotóxico ocorre a parada do ciclo celular em G1, efeito este mediado pela p53. Esse mecanismo é importante para que possa haver o reparo do DNA antes que ocorra a divisão. Se a extensão do dano ao DNA for grande, ocorrerá a indução do processo de apoptose (Golias et al., 2004). Ocorrendo um dano no DNA, duas proteínas são ativadas, a ASPP1 e 2 que interagem com o domínio de ligação ao DNA da p53 aumentando assim a atividade supressora de tumor desta proteína (Aylon and Oren, 2007).

A família da Brn3 também é capaz de modular os efeitos da p53. Normalmente a Brn3a diminui a ativação de genes pró- apoptóticos como o

Bax. Entretanto, quando ela interage com a p53 ocorre uma diminuição da atividade da Brn3 (Aylon and Oren, 2007).

Em 1971 Knudson descreveu a existência de uma nova proteína reguladora do ciclo celular, a proteína Rb, denominada de “guardiã do ciclo celular”. Esta denominação deve-se ao fato de que, na sua ausência, pode ocorrer o desenvolvimento de vários tipos de tumores tais como retinoblastoma (por isso ela é chamada de Rb), osteosarcoma, câncer de pulmão e de bexiga. A proteína Rb é uma fosfoproteína nuclear de 110kDa e já foi descrita a existência de uma família de rb composta por 3 membros, rb/p105,p107 e rb2/p130 (Golias et al., 2004; Giacinti and Giordano, 2006).

A proteína Rb é capaz de inibir o fator de transcrição E2F e desta maneira regular a transição da fase G1 para a S. Quando a Rb se encontra hipofosforilada ela inibe a transcrição do E2F. Porém, se ela for hiperfosforilada esta inibição desaparece e o fator E2F é transcrito e pode então induzir a passagem da fase G1 para a fase S (Golias et al., 2004; Giacinti and Giordano, 2006).

A inibição do ciclo celular pode ser mediada por sinais extracelulares. Muitas vezes este processo se dá pela inativação das Cdks e conseqüente ativação das proteínas Rb. Duas famílias de proteínas

capazes de inibir a atividade das Cdk's já estão bem caracterizadas. São elas a família KIP (cinase inibidora de proteína-CDKs) e a família INK4 (cinase inibidora de Cdk 4 e 6) (Rehen, 2001 para revisão).

As proteínas da família NF kappa B também são capazes de regular o ciclo celular através do sistema Cdk/CKI. Entre os membros dessa família podemos destacar Rel A (p65, NF Kappa B, (p50, p105), NF Kappa B (p52, p100) , c-Rel e Rel-B. Essas proteínas estão presentes no complexo citoplasmático juntamente com proteínas inibitórias da família Ikappa B. Quando elas são ativadas, ocorre o processo de translocação para o núcleo levando à transcrição de genes específicos (Gollias et al., 2004).

### **1.3 - IGF**

Fatores de crescimento são polipeptídeos que têm por função regular a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celular. Esses fatores interagem com seus receptores de membrana e estimulam uma cascata de sinalização mediada por inúmeras proteínas intracelulares. Eles são capazes de mediar respostas citoplasmáticas, bem como regular tanto a transcrição gênica como os fatores promotores do ciclo celular. Dentre os vários fatores de crescimento podemos destacar: o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), o fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Chesik, 2004).

A descoberta do IGF, à semelhança do que aconteceu com a de outros fatores, deveu-se principalmente ao olhar atento de pesquisadores e a uma certa dose de sorte. Em 1957, Salmon e Daughaday descobriram no soro um fator que era tanto capaz de mediar o efeito do hormônio somatotrófico no processo de sulfatação da cartilagem como no processo de crescimento longitudinal do osso (citado em: Kermer et al., 2000; Russo et al., 2005). Por este motivo e mantendo a tradição de dar o nome relacionando-se à função observada, ele foi chamado de fator de sulfatação. Quando os pesquisadores foram analisar o local de síntese deste fator eles observaram que as células responsáveis por tal processo seriam os hepatócitos. Avançando no conhecimento dos mecanismos envolvidos no estímulo necessário para a produção deste fator, descobriu-se que o hormônio somatotrófico (GH) desempenhava um importante papel (Russo et al., 2005).

Algum tempo depois, Dulak e Termin, investigando os fatores de crescimento presentes no soro, identificaram um que apresentava atividade estimulatória múltipla. Inicialmente pensou-se na insulina, pois ela está presente no soro e poderia estar mediando estes efeitos. Entretanto, quando foi feito o tratamento com anticorpos anti-insulina o efeito não foi

abolido, indicando tratar-se de outra molécula. Este fator recebeu o nome de fator cuja atividade não era inibida pelos anticorpos anti-insulina (NSILA I e II). Os NSILA foram renomeados e chamados de somatomedinas. Posteriormente, demonstrou-se a semelhança estrutural entre a cadeia  $\beta$  desse fator e à da insulina e então passou a receber a denominação de fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) (Russo et al., 2005).

As seqüências completas de aminoácidos do IGF-I e do IGF-II foram identificadas em 1978. O IGF-I apresenta uma cadeia polipeptídica composta por 70 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 7,5 KDa. (figura 3) A estrutura do IGF-II se assemelha à do IGF-I em 45 aminoácidos dos 73 presentes (Rinderknecht and Humbel, 1978).

Em 1990, Sara e colaboradores identificaram uma variação do IGF-I específica do cérebro chamada de forma truncada. Nela são perdidos os 3 primeiros aminoácidos. Uma característica desta molécula é ser mais potente do que o IGF-I em vários modelos de cultura de células (Russo et al., 2005).

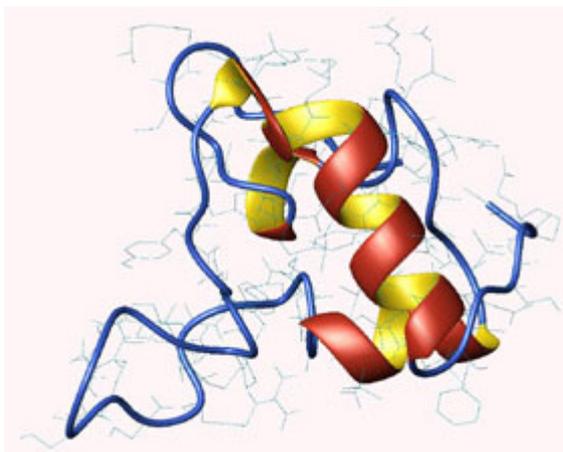


Figura 3 : Estrutura tridimensional da molécula de IGF-I. As regiões de alfa hélice estão representadas nas cores amarelo-vermelho e as regiões em azul correspondem às regiões beta pregueadas. Figura retirada do “site” [www.biochem.szoteu.u-szeged.hu/astrojan/pro2t.htm](http://www.biochem.szoteu.u-szeged.hu/astrojan/pro2t.htm)

Para que possamos compreender os mecanismos de sinalização estimulados pelo IGF, devemos levar em consideração um conjunto de moléculas que participam desse processo. Desta maneira precisamos levar em consideração os dois fatores (IGF-I e II), seis proteínas às quais o IGF se liga e que portanto desempenham papel regulatório (IGFBPs) e dois tipos de receptores (Chesik, 2004). Na figura 4 podemos ver a representação esquemática destas diferentes macromoléculas e as respostas celulares induzidas pela ativação dos receptores.

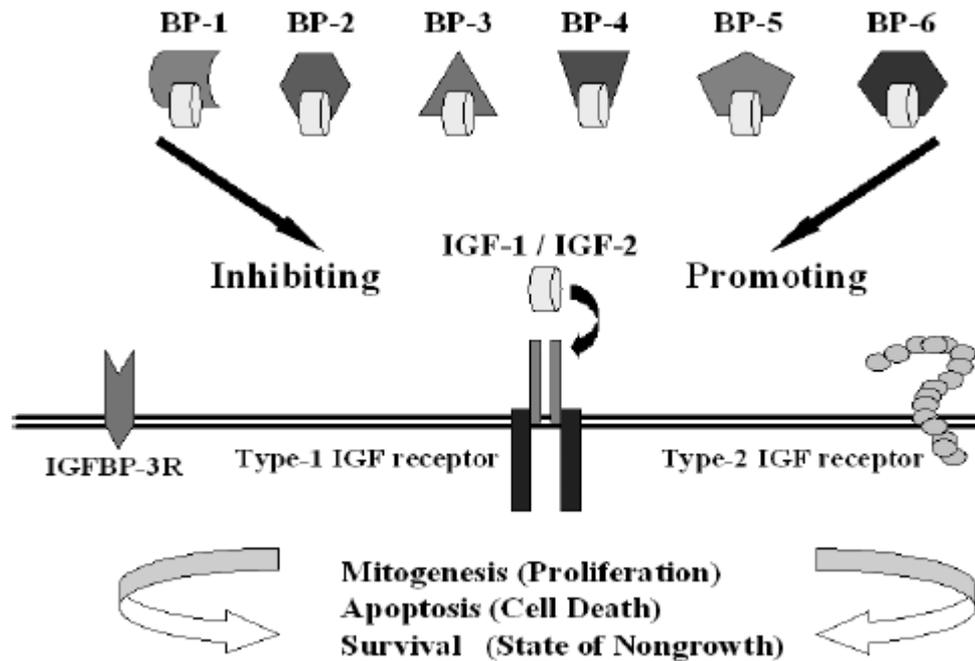


Figura 4: O sistema do IGF com suas proteínas de ligação. BP: Proteínas às quais o IGF se liga e eventos modulados por este fator trófico. Chesik, 2004; dissertations.ub.rug.nl/faculties/medicine.

O RNAm para o IGF-I, o IGF-II e para as IGFBPs 2, 4 e 5 são expressos em regiões específicas do Sistema Nervoso Central. No cerebelo, no bulbo olfatório, no tálamo, no hipocampo e na retina o RNAm para o IGF-II é detectado no início do desenvolvimento e o RNAm para IGF-I, aparece em períodos mais tardios. Em embriões de pinto, uma fraca distribuição do RNAm para IGF-I foi observada entre os dias embrionário E6- E9. Já o RNAm para IGF-I também foi detectado em ratos no primeiro dia de nascimento nas células de Purkinje e em outros elementos celulares

no córtex cerebral. Analisando as células que expressam essas diferentes proteínas, podemos observar que o IGF-I está associado a elementos neuronais, o IGF-II a elementos não neuronais e os IGFBPs a elementos mesenquimais, neuronais e a células gliais (De Pablo e De La Rosa, 1995).

Em 1996 foi publicado um estudo, realizado em ratos Sprague-Dawley entre 12 e 14, semanas analisando a localização do RNAm para o IGF-I, para o receptor de IGF tipo I e para proteínas de ligação ao IGF em retinas de ratos (Burren et al., 1996). O quadro abaixo resume os resultados obtidos pelos pesquisadores.

<b>RETINA</b>	<b>IGFI</b>	<b>IGFIR</b>	<b>IGFBP1</b>	<b>IGFBP2</b>	<b>IGFBP3</b>	<b>IGFB4</b>	<b>IGFBP5</b>	<b>IGFBP6</b>
Núcleo de células ganglionares	+	++	-	-	-	-	+	+
Camada nuclear interna	-	++	-	-	-	-	++	+
Camada nuclear externa	-	-	-	-	-	-	-	-
Membrana limitante externa	-	+	-	-	-	-	-	-
Epitélio pigmentar retiniano	-	-	-	--	-	-	-	-
Células Endoteliais	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabela 2: Localização do RNAm para membros da família de IGF na retina (Burren et al., 1996).

## 1.4 - Receptor do IGF

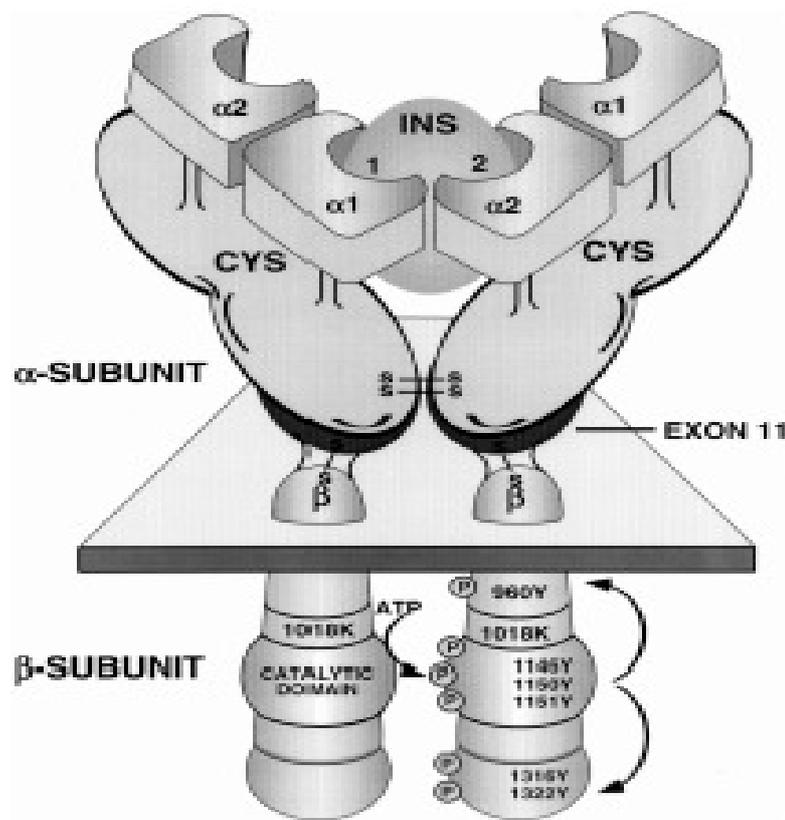
Para desempenhar a sua função, o IGF-I e II necessitam de receptores específicos que se dividem em dois tipos, o I e o II. A expressão do gene para o receptor do tipo I é detectada em vários tecidos. Este gen é expresso de forma constitutiva na maioria das células mas também pode ser regulado tanto *in vivo* quanto *in vitro* por fatores de transcrição tais como sp1 e p53 (Russo et al., 2005).

O receptor do tipo I apresenta uma grande homologia com o receptor de insulina, sendo o único da família de IGF do tipo catalítico. Tanto o receptor do tipo I quanto o de insulina são compostos por duas cadeias  $\alpha$  extracelulares com domínios ricos em cisteína, região onde ocorrem as ligações específicas. Apresentam também duas cadeias  $\beta$  citoplasmáticas com resíduos com atividade tirosina cinase (Chesick, 2007). Por sua vez o receptor do tipo II para IGF é muito semelhante ao receptor de manose 6 fosfato independente de cátion (Jones and Clemmons, 1995 ; Russo et al., 2005). Ele é composto por uma cadeia polipeptídica com um pequeno domínio citoplasmático sem atividade tirosina cinase. Esses receptores desempenham importantes funções como o tráfego de enzimas lisossomais, endocitose e degradação lisossomal de ligantes extracelulares, regulação dos efeitos apoptóticos/ mitogênicos e possível transdução de sinalização intracelular (Russo et al., 2005).

A maioria dos efeitos dos IGF-I e II se dá através da ativação do receptor do tipo I. Este receptor catalítico é uma glicoproteína de membrana. Após ocorrer a ligação do IGF ocorre a ativação de tirosinas cinases, na porção intracelular do receptor. A partir deste momento várias cascatas de sinalização são ativadas tais como: as IRS1-IRSA4 que culminam na ativação da via da PI-3 e das MAP cinases (Russo et al., 2005).

O receptor do tipo I apresenta uma grande homologia com o receptor de insulina. Obberghen e colaboradores comparam as poucas diferenças existentes entre os dois tipos de receptores como podemos ver na figura 5. Após a interação com seus ligantes específicos, os sítios de tirosina que se transfosforilam são encontrados em posições homólogas. Neste aspecto são encontradas diferenças entre os dois receptores. Nos receptores de insulina os 3 resíduos de tirosina estão nas posições Y1146; Y1150 e Y1151. Já nos receptores tipo I as tirosinas são Y1131; Y1135 e Y1136. Uma outra tirosina, a Y960 no receptor de insulina e a Y950 no receptor de IGF-I localizam-se na região justa-membranar. Uma vez fosforilada essa tirosina compõe uma região de reconhecimento para vários substratos desses receptores (Obberghen et al., 2001).

O terminal carboxila do receptor de insulina contém dois sítios de autofosforilação, Y1322 e Y1316 enquanto o receptor de IGF-I apresenta apenas o Y1316. A função específica para essa tirosina no terminal carboxi não é clara mas parece estar envolvida com a geração de algumas diferenças na sinalização mediada pela insulina ou pelo IGF-1 (Obberghen et al., 2001).



Y1131; Y1135; Y1136

(resíduos tirosina do receptor de IGF)

Figura 5: Representação esquemática do receptor de insulina. São feitas comparações entre os resíduos de tirosina fosforilados no receptor de insulina e no receptor IGF-I (Obberghen et al., 2001).

Em 1985, Gammeltoft e colegas identificaram no SNC de mamíferos, os receptores de insulina, de IGF-I e de IGF-II. Estes autores propuseram um mecanismo de ação para insulina no qual ela seria capaz de induzir o crescimento celular e o metabolismo ligando-se ao seu próprio receptor. Já o IGF-II desempenharia as funções de crescimento celular, metabolismo e neurotransmissão ligando-se aos receptores de IGF do tipo I e do tipo II. O IGF-II é o único capaz de se ligar aos receptores do tipo II. Logo a presença do IGFII juntamente com os dois tipos de receptores para IGF mostram fortes evidências do papel fisiológico do IGFII na regulação da função cerebral e possível envolvimento com o crescimento celular (Gammeltoft et al., 1985).

Os receptores de IGF e insulina são mais abundantes, de quatro a dez vezes, no cérebro de fetos de ratos do que nos animais adultos. Isso sugere a importância destes fatores para o desenvolvimento do SNC. A expressão deles é alta em regiões que apresentam os corpos celulares das células nervosas e baixa nas regiões da substância branca (de Pablo and de la Rosa, 1995).

Estudos realizados em retina de pinto, nos dias embrionários 6 e 12, mostraram que nessa fase ela apresenta uma afinidade diferenciada para insulina e o IGF-I. Este fato está relacionado à presença de um receptor híbrido desses dois fatores, sendo que durante o processo de diferenciação

a proporção desses receptores diminui (de Lacoba et al., 1999). Observou-se também que o IGF-I e a insulina apresentam uma maior capacidade de ligação ao receptor durante o estágio proliferativo, quando comparado com o período de diferenciação. Quando foi analisada a capacidade de autofosforilação do receptor foi evidenciado que ela é maior em E12 do que em E6 (de Lacoba et al., 1999).

### **1.5 - Proteínas de Ligação ao IGF (IGFBPs)**

Os IGFs estão presentes tanto na circulação como no espaço extracelular. Nestas regiões igualmente são encontradas proteínas as quais o IGF é capaz de se ligar com alta afinidade e que são denominadas de IGFBPs (Jones and Clemmons, 1995).

As IGFBPs são proteínas compostas por dois domínios altamente conservados, o C e o N e por um domínio variável central, o L. O domínio N é composto por 12 cisteínas e contém o principal sítio de ligação para o IGF, o domínio C apresenta 6 cisteínas e o domínio L contém sítios para a regulação pós-translacional como a glicosilação, fosforilação e proteólise (Duan and Xu, 2005).

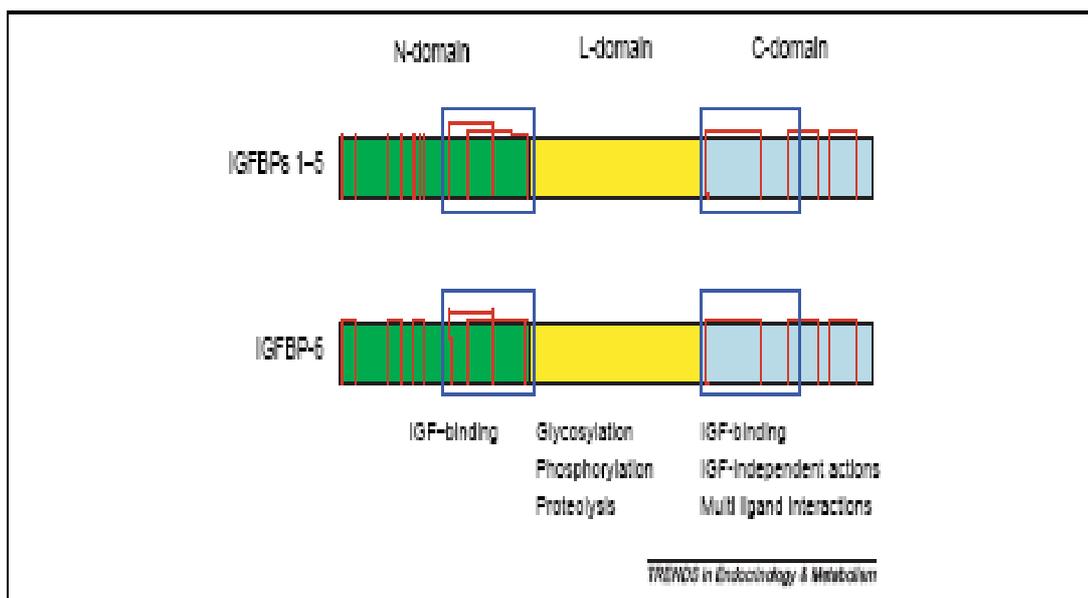


Figura 6: Estrutura das IGFbps, destacando-se os três domínios N, L e C (Bach et al., 2005).

As IGFbps são macromoléculas secretadas que apresentam uma homologia seqüencial de 80%, sendo que a seletividade de ligação com o IGF I ou IGF II varia de uma proteína para outra (Rajaram et al., 1997).

Desde 1980, suspeitava-se que existissem essas proteínas e em 1990 todas as seis IGFbps já haviam sido isoladas. A primeira delas a ser identificada foi a IGFbp-1, isolada do fluido amniótico. Seu peso molecular é de 30KDa apresentando uma afinidade 7 vezes maior pelo IGF do que as demais. A IGFbp-2 foi extraída de uma linhagem de células do fígado de ratos. Trata-se de uma proteína não glicosilada pesando entre 31-36 kDa que é encontrada em quantidades significativas tanto no soro quanto no

fluido cerebroespinal. A IGFBP-3 foi purificada do sangue humano e seu peso molecular varia entre 38-46 kDa, dependendo do número de sítios glicosilados. Na circulação essa proteína encontra-se associada a uma molécula de IGF e a uma outra proteína ácida de 80 kDa bastante lábil (ALS). Desta maneira é formado um complexo de 150-200 kDa. Na circulação, 75-80% das moléculas de IGFs encontram-se ligadas a esse complexo. A IGFBP-4 é uma proteína não glicosilada de 25-36 kDa tendo sido purificada do meio condicionado de células TE-89 (osteosarcoma humano) e do soro de ratos adultos. A IGFBP-5 foi extraída primeiramente do soro de ratos adultos, do extrato de osso humano e do meio condicionado de uma linhagem de células de osteosarcoma humano U-2OS. Seu peso varia entre 23 e 29 kDa. A IGFBP-6 foi obtida a partir do fluido cérebro-espinal humano e de culturas de células de fibroblasto humano transformados e apresenta 34kDa de peso molecular (Rajaram et al.,1997 para revisão).

As IGFbps desempenham um importante papel em modular as ações do IGF. No soro, os níveis dessas proteínas representam um importante papel em regular as funções endócrinas dos IGFs. As funções propostas para essa regulação são as seguintes: 1) Inibição da atividade semelhante à insulina; 2) Aumento da meia vida plasmática dos IGFs e 3) Regulação da taxa de transporte do IGF do compartimento vascular para aumentar assim o efeito trófico deste fator (Rajaram et al., 1997).

Como citado anteriormente os IGFBPs são capazes de inibir ou potencializar a ação do IGF e esses efeitos estão exemplificados na tabela abaixo: (Rajaram et al., 1997; Jones and Clemmons, 1995).

<b>IGFBPs</b>	<b>Afinidade com o IGF</b>	<b>Modulação da ação do IGF</b>	<b>Localização pericelular</b>
IGFBP-1	I = II	Inibição e/ou potenciação	Superfície celular ( $\alpha 5\beta 1$ integrina)
IGFBP-2	II > I	Inibição	indeterminada
IGFBP-3	I = II	Inibição e/ou potenciação	Superfície celular
IGFBP-4	I = II	Inibição	
IGFBP-5	II > I	Potenciação	Matriz extracelular e superfície celular
IGFBP-6	II > I	Inibição	

Tabela 3: Descrição das IGFBPs, seus efeitos e suas localizações celulares (Rajaram et al., 2007).

O efeito inibitório das IGFBPs também foi demonstrado em duas circunstâncias específicas. A primeira foi a inibição da estimulação da síntese de DNA pelo IGF quando ele se liga às IGFBPs 1,2,3 e 4 (Jones and Clemmons, 1995). A segunda circunstância seria o controle da glicemia pois uma vez ligado às IGFBPs, o IGF não teria ação

hipoglicemiante (citado em Jones and Clemmons, 1995). Quando fibroblastos humanos são co-incubados com IGF e IGFBP-3 têm-se um efeito inibitório do crescimento que é produzido pela incubação com IGF (revisado em Rajaram et al., 1997).

Fatores determinantes para essa diferença na ativação e inibição do IGF pelas IGFBPs são: a fosforilação da IGFBP, a proteólise da IGFBP além da interação das IGFBPs com a superfície celular e com a matriz extracelular (Rajaram et al., 1997; Jones and Clemmons, 1995). Um mecanismo proposto para a potenciação da ação do IGF pelas IGFBPs seria a associação delas com proteínas presentes na superfície celular ou na matriz extracelular resultando na diminuição da afinidade da IGFBP pelo IGF. Isto acarretaria uma maior disponibilidade desse fator de crescimento para se ligar ao seu receptor específico, estimulando respostas metabólicas e mitogênicas (Jones and Clemmons, 1995). A IGFBP-1 na sua forma não fosforilada é capaz de potenciar o efeito do IGF na síntese de DNA das células do músculo liso de porcos (revisado em Rajaram et al., 1997).

Moriarty e colaboradores, em 1994 demonstraram pela primeira vez que as células retinianas *in vitro* secretam IGFBPs de maneira tempo dependente (Moriarty et al., 1994). Nas células de Muller de porcos foi caracterizado o papel das IGFBPs no efeito do IGF. As IGFBPs 4 e 5 reduziram a resposta do IGF-I, enquanto a IGFBP3 inibiu por completo sua

ação. As IGFbps 5 e 6 não apresentaram efeito significativo (King and Guidry, 2004). Entretanto, na presença do IGF-II a resposta dessas proteínas foi bem diferente. A IGFbp1 teve um efeito bem menor do que o demonstrado na presença da IGF-I, já as IGFbps 5 e 6 demonstraram uma inibição pronunciada. Por sua vez a IGFbp3 também foi o mais potente inibidor para o IGFII, mostrando assim a importância da interação do IGF com as proteínas de ligação (King and Guidry, 2004).

Os níveis de IGFbps são regulados durante várias condições fisiológicas e patológicas. Estudos recentes demonstraram que as IGFbps são reguladas durante exercícios, cirurgia, gravidez e envelhecimento e que os hormônios são capazes de modular os níveis de uma ou mais IGFbps tanto no soro como nos fluídos biológicos. Entre as condições patológicas que envolvem a regulação de algumas IGFbps podemos destacar as seguintes: diabetes, tumores, deficiência de receptores GH, acromegalia, osteoporose, falência renal entre outras (Rajaram et al., 1997). Na tabela abaixo podemos observar a distribuição das principais IGFbps nos fluídos biológicos (Rajaram et al., 1997).

Fluido	Principal(is) IGFBPs
Soro	IGBPB-3
Fluído Amniótico	IGBPB-1
Fluído Folicular	IGBPB-3
CSF	IGBPB-2, IGBP-6

Tabela 4: Distribuição da IGFBPs (Rajaram et al.,1997)

Alguns estudos sugerem que as IGFBPs são capazes de mediar efeitos nas células através de um mecanismo independente do IGF. A IGFBP-1 estimula a migração de células do músculo liso assim como a IGFBP-3 inibe a proliferação de células do câncer de próstata de forma independente do IGF (revisado em Rajaram et al., 1997)

Dados da literatura demonstram a existência das proteases capazes de clivar as IGFBP. Essas proteases estão presentes nos fluídos biológicos assim como em uma variedade de tipos celulares. Algumas dessas proteases são específicas para as IGFBPs enquanto outras não o são. Células de osso mantidas em cultura são capazes de produzir metaloproteases e plasmina que degradam várias IGFBPs assim como outras proteínas. Já as células ósseas humanas assim como os fibroblastos em cultura produzem proteases que são seletivas para a IGFBP-5 (Rajaram et al., 1997).

Algumas características genéticas e estruturais dessas proteínas estão exemplificadas no quadro abaixo: (Jones and Clemmons, 1995)

Características genéticas e estruturais	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6
Fosforilação	+	-	+	-	+	I
Proteólise	-	+	+	+	+	I
Glicosilação	-	-	N	N	O	O
Ligação a heparina	I	I	+	+	+	I
Preferência IGF-I/IGF-II	=	IGF-II	=	=	IGF-II	IGF-II

I- dado inconclusivo; N, glicosilação ligada a N; O, glicosilação ligada O

Tabela 5: Características genéticas e estruturais das IGFBPs (Jones and Clemmons, 1995).

O papel dessas proteases no controle da função das IGFBPs depende de uma série de fatores, entre eles, se essa protease está presente de forma abundante ou não, a potência com que essa protease é capaz de clivar a IGFBP, a presença ou ausência de outros substratos potenciais e a presença ou ausência de ativadores ou inibidores de proteases (Mohan and Baylink, 2002).

A caracterização preliminar das proteases para IGFBPs 2, 3, 4 e 5 revelou que elas são serina proteases e que dependem de cálcio. É interessante ressaltar que os fragmentos proteolíticos das IGFBPs 3 e 5

apresentam uma significativa afinidade pelo IGF I e II, já os fragmentos das IGFBPs 2 e 4 têm uma drástica redução na sua afinidade por esses fatores de crescimento (citado em Jones and Clemmons, 1995). Outro fato curioso é que essas proteínas são encontradas em diferentes contextos. Por exemplo, a IGFBP-5 não sofre a ação de proteases quando ligada à matriz extracelular. A IGFBP-3 quando adicionada a culturas de carcinoma de tórax Hs578T não sofre proteólise quando liga-se ao IGF (Maile and Holly, 1999).

Assim como as IGFBPs, as proteases também sofrem variação de acordo com as condições fisiológicas. Uma das primeiras proteases identificadas foi a da IGFBP-3 associada à gravidez, ativada no segundo trimestre de gestação em humanos. Essa fragmentação da IGFBP-3 é importante durante a gravidez para aumentar os níveis de IGF circulante uma vez que esses fragmentos apresentam uma afinidade muito menor por esse fator de crescimento. Pacientes com diabetes, vários tipos de câncer e com condições de resistência ao GH também apresentam a protease da IGFBP-3 ativada. Essa protease também está presente nos fluídos sinovial e intersticial (Rajaram et al., 1997; Maile and Holly, 1999).

A IGFBP-3 em cultura de células é capaz de reduzir o crescimento estimulado pelo IGF. Quando o antígeno específico prostático (PSA) é adicionado às células epiteliais prostáticas, o efeito estimulatório do IGF é

restaurado, mostrando assim a funcionalidade do PSA em alterar a viabilidade do IGF. A proteólise da IGFBP-3 pelo PSA previne os efeitos apoptótico e de inibição do crescimento independentes do IGF (Maile and Holly, 1999).

A protease para IGFBP-4 está presente também no fluído sinovial, no fluído folicular ovariano, no líquido seminal e no fluído amniótico. No ovário encontra-se a protease para a IGFBP-2, e no plasma seminal e fluído amniótico encontra-se na sua forma ativa a protease para a IGFBP-5. Mais recentemente foi encontrada a protease para a IGFBP-1 no fluído amniótico (Maile and Holly, 1999).

## **1.6 - Sinalização Química**

Existem duas vias principais envolvidas na sinalização através dos receptores de Insulina e IGF como descrito na figura 7. A ativação do receptor leva à sua autofosforilação com subsequente fosforilação do substrato IRS e/ou Shc. Através de uma proteína adaptadora, Grb2 ocorre o recrutamento da SOS formando um complexo IRS-1-Grb2-SOS que ativa a Ras. A partir desse momento ocorre a estimulação da Raf que resulta na fosforilação e ativação das ERKs (Bateman and Neill, 2006; Jones and Clemmons, 1995).

Ambos os receptores estão envolvidos também na ativação da via da PI3K, que pode ser estimulada pela IRS-1 fosforilada. Esta via, em muitos casos, está relacionada ao crescimento celular. Um outro evento observado com a autofosforilação do receptor de IGF do tipo 1 é a associação direta com a subunidade p85 da PI3K (Jones and Clemmons, 1995).

Estudos realizados em células hematopoiéticas de murinos D32 mostram que a retirada da IL-3 leva essas células rapidamente à apoptose. Entretanto, caso as células sejam tratadas com IGF-I a apoptose é inibida através da fosforilação induzida, via PI3 cinase, da proteína proapoptótica Bad (Kurmasheva and Houghton, 2006).

Experimentos realizados em camundongos knockout sugerem que a IRS-1 seja importante para a proteção conferida pelo IGF-I da apoptose (Kurmasheva and Houghton, 2006). As proteínas IRS desempenham um papel importante nos efeitos anti-apoptóticos do IGF-I. A super expressão da IRS-1 em células tumorais de fígado leva à ativação das vias da PI3K e da ERK1/2 o que confere uma grande resistência à morte induzida pelo IGF-I (Kurmasheva and Houghton, 2006).

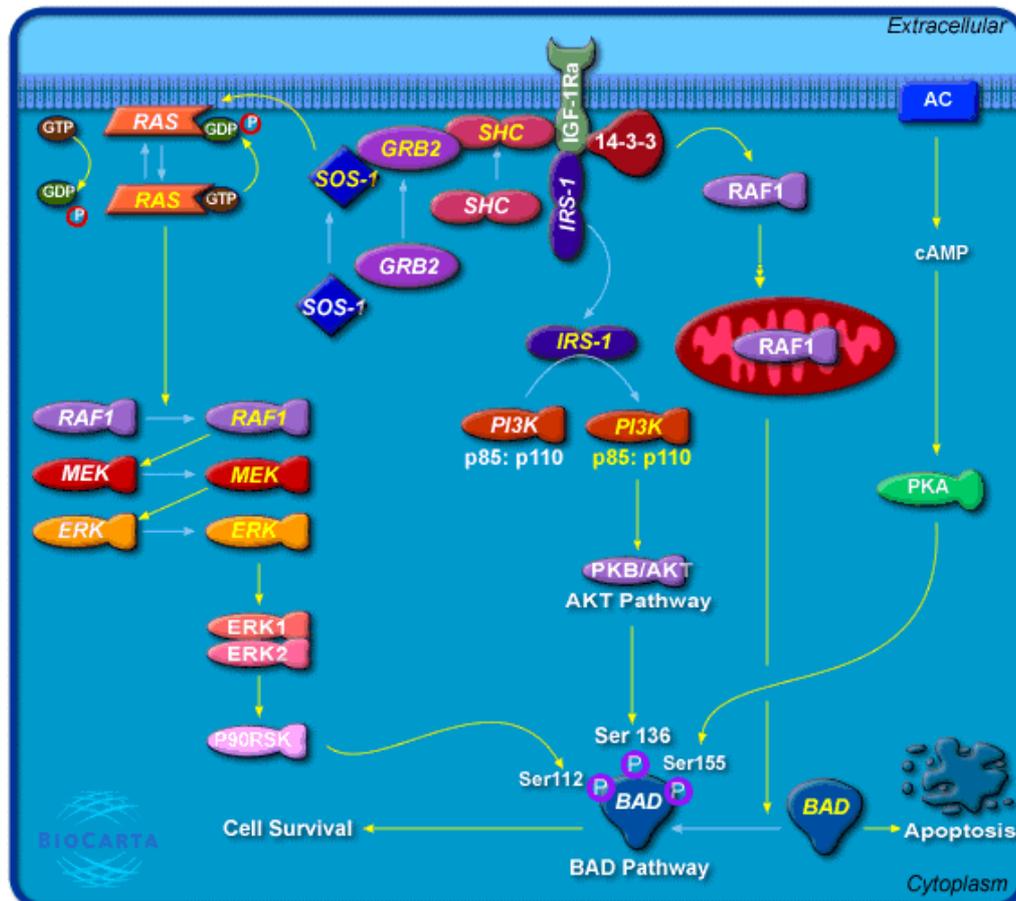


Figura 7: Algumas vias de sinalização envolvidas no efeito do IGF. Kugi.Kribb.re.kr/... Bio Carta/h\_igf1r Pathway/

Um resultado interessante demonstra que quando células NIH 3T3 são tratadas com IGF-I ou insulina ocorre um aumento na expressão de seus respectivos receptores e um concomitante aumento na fosforilação da IRS-1 (Giorgetti et al., 1992). Nessas mesmas células, mutações no sítio de ligação de ATP do receptor de IGF-I previne a autofosforilação dos receptores, o aumento na incorporação de timidina, a ativação da PI3 cinase, a incorporação de 2 deoxiglicose e a expressão da ornitina descarboxilase. Por sua vez, a mutação nos três principais sítios de

autofosforilação do receptor bloqueia toda a cascata de sinalização induzida pelo IGF-I (Jones and Clemmons, 1995).

Em 2000 foi demonstrado um importante efeito do IGF-I no resgate de células ganglionares da retina submetidas à axotomia. Os autores demonstraram que o processo de axotomia induz ativação da caspase 3 e que a injeção de IGF-I no vítreo inibe esta ativação sendo este efeito mediado pela PI 3 cinase (Kermer et al., 2000).

Dalle e colaboradores em 2000 mostraram que o tratamento com IGF-I é capaz de estimular a síntese de DNA sendo este mecanismo mediado por proteína G. Eles mostraram que o receptor de IGF-I se associa com G $\alpha$ i liberando assim a subunidade G $\beta\gamma$ , sendo que esse acoplamento do receptor de IGF como proteína G é essencial para a sinalização mitogênica desse fator. Estes autores igualmente demonstraram que os receptores de insulina e de IGF apresentam diferenças no acoplamento à proteína G. Essas diferenças poderiam explicar parcialmente as diferenças potenciais entre esses dois receptores com relação à sinalização mitogênica versus a resposta metabólica (Dalle et al., 2000).

Recentemente foi demonstrado, em cultura primária de neurônios de camundongo, que o aumento intracelular de cálcio induzido pela

ativação da via glutamatérgica é inibido tanto pelo tratamento com IGF-I como pelo tratamento com BDNF. Ao analisar as vias de sinalização envolvidas neste efeito, os autores constataram que a exposição aguda ao BDNF é capaz de ativar a via da MAPK/ERK. Esse efeito é aumentado de forma significativa quando os neurônios são pré- tratados com IGF-I sendo que o tratamento apenas com o IGF-I não é capaz de ativar a via da ERK. Esses resultados demonstram que o IGF-I leva a uma potencialização da resposta ao BDNF. Neste mesmo trabalho os autores demonstraram que o tratamento com IGF-I induz um aumento na expressão de receptores TrkB nas primeiras 24h de tratamento, o que justificaria os resultados observados (McCusker et al., 2006).

## **2. OBJETIVO**

Ao longo dos últimos anos, nosso laboratório vem estudando os mecanismos envolvidos no controle da proliferação das células da retina de ratos mantidas em cultura. Resultados prévios mostram que tanto o tratamento com FGFb (Guilarducci-Ferraz et al., no prelo) como o tratamento com o EGF (Miranda et al., dados não publicados) induz um aumento expressivo na proliferação de células retinianas. Como o IGF-I é um potente fator mitogênico e está presente no tecido retiniano, decidimos analisar o efeito do IGF-I na proliferação de células da retina mantidas em cultura, bem como estudar as vias de sinalização envolvidas no processo. A partir da caracterização do papel dos diferentes fatores tróficos na proliferação das células da retina poderemos compreender melhor a circuitaria que leva à formação desse tecido nervoso.

### **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Materiais**

O IGF-I foi comprado da PeproTech (Rocky Hill, USA). O meio 199 e o soro fetal bovino foram adquiridos da Gibco (Gaithersburg, USA). Genisteína, AG1478, I-OMEAG 538, poli-L-ornitina, rolitina, L-glutamina, penicilina e sulfato de estreptomicina foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA). Tripsina foi adquirida da Worthington Co. (Freehold, USA). K-252a, brefeldina A, 2-(4-morpholynil)-8-phenyl-4H-1-benzopiran-4 one (Ly 294002), PD-98059, o cloreto de queleritina, PP1 e o U73122 foram obtidos da Biomol, (Plymouth Meeting, USA). O SB202190, MMP9 e o inibidor da JNK foi comprado da Calbiochem Corp. (San Diego, CA). As placas de cultura de células (35mm) foram compradas da TPP (Switzerland). A [ $H^3$ ] timidina foi adquirida da Amersham (Piscataway, USA). A cadaverina foi gentilmente cedida pela professora Ana Lúcia Marques Ventura, UFF.

#### **3.2 - Tratamento das placas de Petri com poli-L-ornitina**

Placas de Petri utilizadas em nossas culturas foram previamente tratadas com uma solução de poli-L-ornitina (PM 30000–70000 KDa, Sigma, USA) preparada em tampão borato (pH 8,0) e esterilizada por filtração em membrana de nitrocelulose Millipore (poros de 0,22  $\mu$ m). O tempo de polimerização com a poli-L-ornitina ( $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) foi de no mínimo

4 e no máximo de 12 horas, à temperatura ambiente. Após este período a poli-L-ornitina era retirada, desprezada e as placas lavadas, uma vez, com meio de cultura completo. Imediatamente após a lavagem, as células eram plaqueadas.

### **3.3 - Cultura de células da retina de ratos**

Utilizamos células da retina de ratos pigmentados da linhagem Lister Hooded. Nos diferentes experimentos foram utilizados animais nas primeiras 24 ou 48 horas de vida (P0 - P1, respectivamente). Todos os nossos procedimentos experimentais foram feitos segundo as normas estabelecidas pela Sociedade de Neurociências (EUA).

As culturas foram feitas seguindo-se o seguinte protocolo experimental:

- os animais foram sacrificados por decaptação e tiveram suas cabeças limpas com solução de álcool etílico 70 % para diminuir a contaminação existente;

- incisões bilaterais de aproximadamente 1,0 cm foram feitas nas regiões orbitais, de onde se retirava o globo ocular, com o auxílio de uma pinça curva de dissecação;

- em uma solução salina sem cálcio e sem magnésio (CMF, composta por: NaCl - 131,0 mM; KCl - 4,09 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,92 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,45 mM; NaHCO<sub>3</sub> - 9,4 mM; Glicose - 12,2 mM) foram incubados todos os globos oculares, até o momento de dissecação das retinas;

- as retinas foram dissecadas em CMF e, livres do epitélio pigmentado, transferidas para um tubo de ensaio que continha 1mL de CMF;

- o processo de dissociação das células foi feita inicialmente com tripsina (Worthington, USA) na concentração de 0,1 % por aproximadamente 20 min, a 37°C. Após o período de tratamento enzimático, adicionou-se meio de cultura completo (199 Gibco, acrescido de 5 % de soro fetal bovino , glutamina 2,0 mM e antibiótico: estreptomicina 100,0 µg.mL<sup>-1</sup> + penicilina 100 U.mL<sup>-1</sup>, Sigma) para que o processo de tripsinização pudesse ser interrompido;

- em seguida, lavou-se a preparação duas vezes com meio de cultura completo;

- para finalizar o processo as células foram incubadas em 2,0mL de meio completo e através de uma pipeta Pasteur de ponta afilada foi feita uma dissociação mecânica das células;

- após contagem, em um hemocítômetro, o número de células contidas na suspensão foi estimado. Em seguida, procedia-se à diluição desejada;

- a densidade de plaqueamento utilizada nos diferentes experimentos foi de  $1,25 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$  ;

- o plaqueamento das células foi feito em um volume de 1,0 mL. O volume final de 2,0 mL foi obtido pela adição de meio de cultura controle ou experimental, conforme o caso. As culturas foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  e 95 % de ar, por períodos de tempo que variavam conforme o experimento.

### **3.4 - Ensaio para incorporação de [ $^3\text{H}$ ]-timidina**

A incorporação de timidina tritiada ao DNA nas culturas controle e tratadas foi determinada utilizando-se o seguinte protocolo:

- lavagem rápida das culturas com 2,0 mL de meio de cultura sem soro, por duas vezes, à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ ;

- incubação das culturas com 1,0 mL de meio de cultura acrescido de  $0,5\mu\text{Ci.mL}^{-1}$  de timidina tritiada ([metil- $^3\text{H}$ ]-thymidine, Amersham Lifescience, USA) por 60 min, a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera umidificada contendo 95% ar/5%  $\text{CO}_2$ ;

- lavagem rápida das culturas com 2,0 mL de meio de cultura sem soro, por quatro vezes, à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , para a retirada da radioatividade não incorporada;

- retirada do meio de cultura e incubação das culturas com  $200\mu\text{L/placa}$  de  $\text{NaOH } 0.4\text{N}$ , por 15 min;

- transferência do conteúdo das placas, junto com 3 mL de H<sub>2</sub>O MiliQ, para tubos de vidro, acondicionados sobre gelo;
- adição de 300µL de TCA 100% por amostra e incubação por 30 min;
- filtração de cada amostra radioativa, através de filtros de fibra de vidro, sob pressão negativa gerada por uma bomba de sucção, para a retirada da radioatividade não incorporada ao DNA. Cada tubo de vidro contendo as amostras foi lavado com 2mL de TCA 5% por três vezes;
- secagem dos filtros, à temperatura ambiente, por 30 min e transferência dos mesmos para frascos de cintilação com solução de tolueno acrescida de 2,5-diphenil-oxazol 0,4% (Sigma);
- contagem da radioatividade das amostras em cintilador de fase líquida.

### **3.5 - Fotomicrografias**

As culturas de células da retina foram fixadas em aldeídos por 30 minutos, a seguir lavadas por 3 vezes em tampão fosfato 0,2M e mantidas na geladeira até o momento de serem fotografadas. As microfotografias foram feitas em microscópio invertido Nikon, no contraste de fase, com o auxílio de uma câmera fotográfica Nikon, em um aumento de 100 vezes.

### **3.6- Análise Estatística dos Resultados**

Os resultados obtidos foram expressos na forma de histogramas. Cada experimento foi repetido no mínimo 3 vezes e em cada um deles os pontos eram feitos no mínimo em triplicata. Em todos os gráficos está representada a média e o erro padrão da média. As análises estatísticas foram feitas através da análise de variância (ANOVA) seguida de um pós teste de comparação entre as diferentes condições experimentais versus controle (Newman-Keuls).

#### **4- Resultados:**

A fim de investigarmos os efeitos do IGF-I na proliferação de células da retina de ratos neonatos, inicialmente tratamos as culturas com diferentes concentrações de IGF-I e após 48 horas, analisamos o perfil de incorporação de timidina tritiada nas culturas experimentais comparando com o valor obtido nas culturas controle. Nossa escolha pelo período de 48h deveu-se ao fato de que os demais trabalhos sobre proliferação celular desenvolvidos em nosso laboratório usavam este período de tempo como parâmetro. A figura 8 demonstra o resultado obtido quando as células foram tratadas com as concentrações de 0,1ng/mL; 1,0 ng/mL; 10,0 ng/mL e 100 ng/mL de IGF-I. Ao analisarmos os resultados podemos observar que, em todas as concentrações utilizadas, houve um aumento na proliferação. Quando culturas foram tratadas com 0,1ng/mL de IGF-I o aumento obtido foi de 23%. A concentração de 1,0 ng/mL induziu um aumento de 32% e as concentrações de 10 e 100 ng/mL induziram aumento de 56 e 60% respectivamente. Analisando o gráfico podemos observar que com 10ng/mL já obtínhamos um efeito máximo e por este motivo decidimos utilizar esta concentração em todos os futuros experimentos. Este nosso primeiro conjunto de resultados nos mostrou que o tratamento com IGF-I era capaz de aumentar a proliferação das células da retina, sendo o efeito máximo de aproximadamente 50% em relação ao controle.

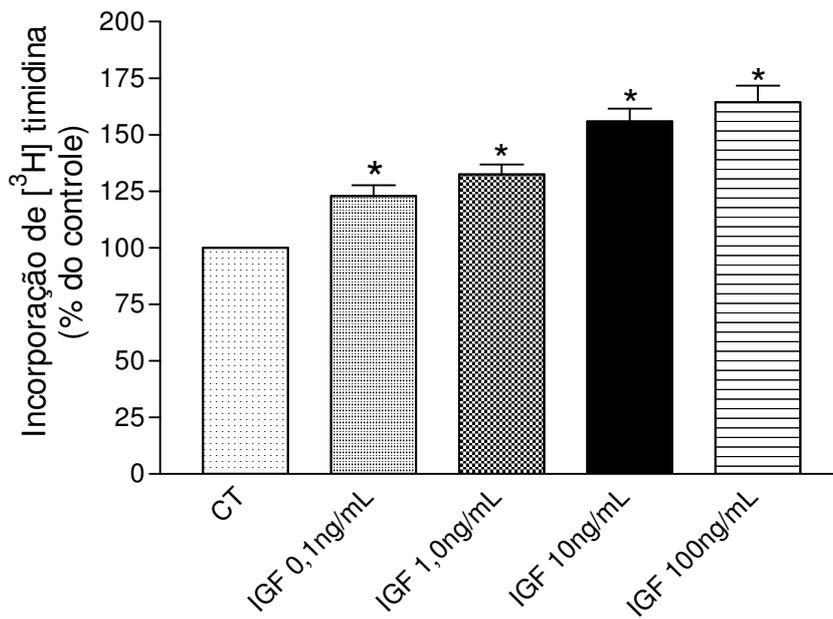
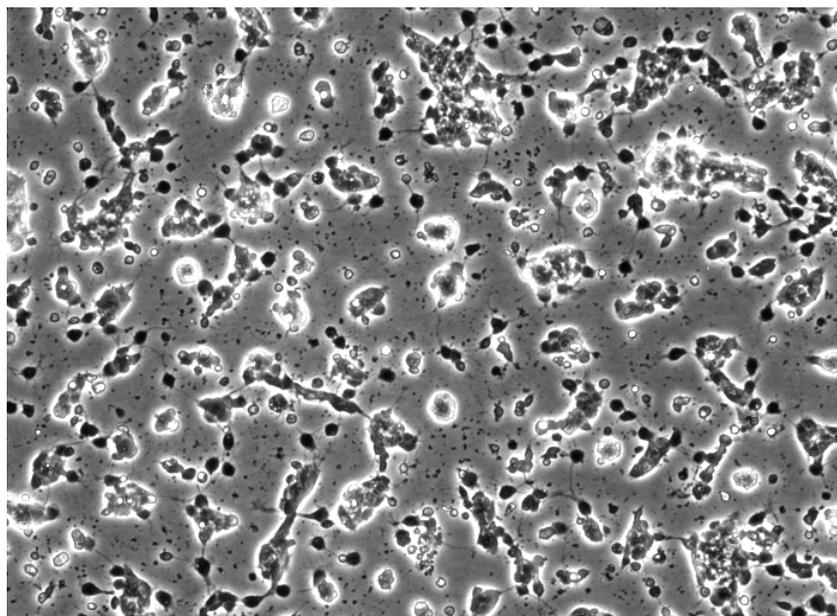


Figura 8 - Efeito dose-dependente do IGF-I sobre a proliferação de células da retina. Células foram mantidas em cultura por 48 horas. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 7-16) (\*  $p < 0,001$ ).

Quando analisávamos o padrão morfológico das culturas controle e o comparávamos com o das culturas tratadas com 10ng/mL de IGF-I não observamos alterações expressivas (Figura 9A e 9B respectivamente). Nas culturas tratadas era possível observar em algumas regiões um relativo espriamento dos grumos (Figura 9B seta), mas este não era em absoluto uma padrão característico.

**A**



**B**

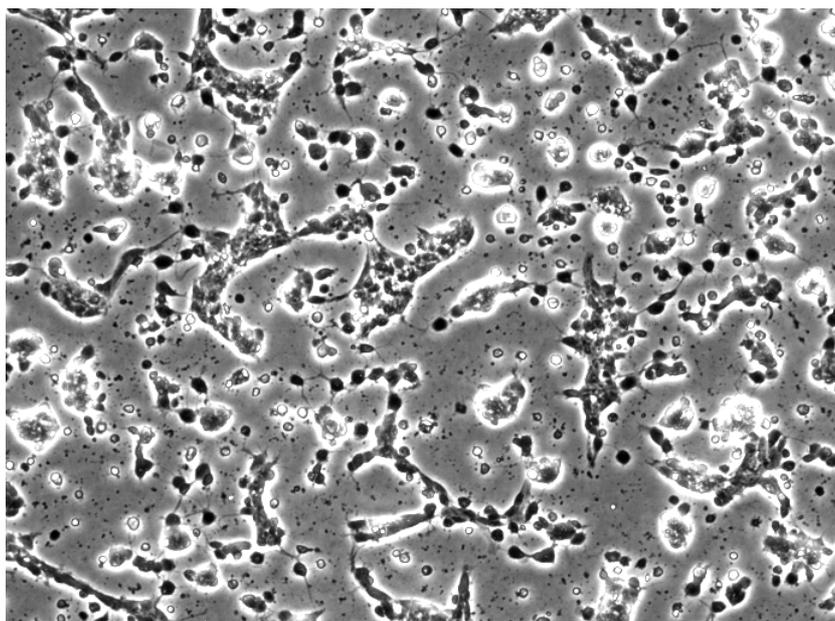


Figura 9 – Fotomicrografia de cultura de células de retina de ratos neonatos na ausência (A) e presença de IGF-I (B) por um período de 48 horas.

Dando continuidade aos nossos estudos, fizemos uma análise do efeito proliferativo de diferentes concentrações de IGF-I em culturas mantidas por 24 horas in vitro. Nessa série de experimentos utilizamos as concentrações de 0,1; 1,0 e 10ng/mL. Analisando os resultados apresentados na figura 10 A podemos concluir que nas primeiras 24 horas apenas a concentração de 10ng/mL é capaz de induzir aumento na incorporação de timidina. A taxa de aumento na incorporação foi de 50%, igual àquela obtida após 48h. Comparando os resultados obtidos nas figuras 8 e 10, podemos observar que à medida que o tempo em cultura vai passando as concentrações de 0,1 e 1,0 ng/mL de IGF-I começam a induzir um efeito proliferante, sugerindo um efeito cumulativo. Entretanto, já em 24 horas o tratamento com 10ng/mL induz seu efeito máximo de aproximadamente 50%.

Como nos foi possível caracterizar o efeito do IGF-I em 24 horas analisamos se este fator era capaz de aumentar a proliferação celular com tratamentos por 4 e 12 horas. Na figura 10B podemos observar que em 12 horas já é possível caracterizar um aumento de aproximadamente 40% na proliferação celular.

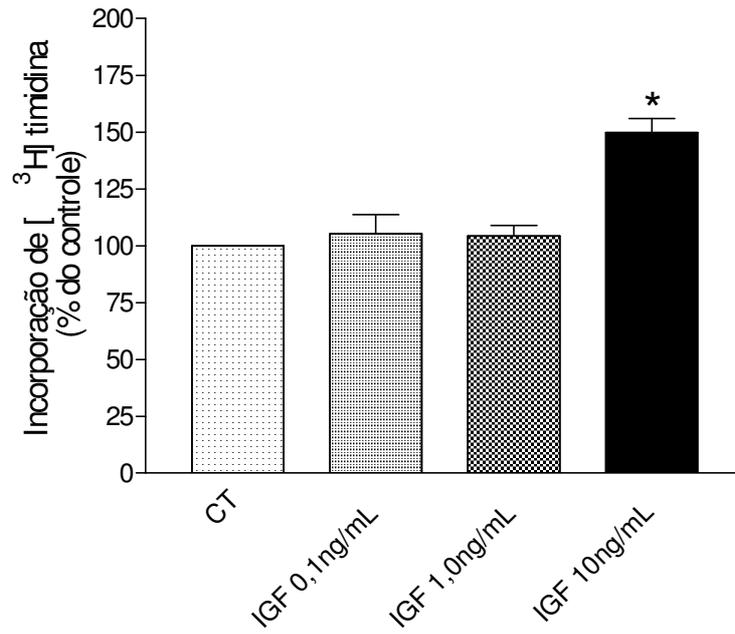
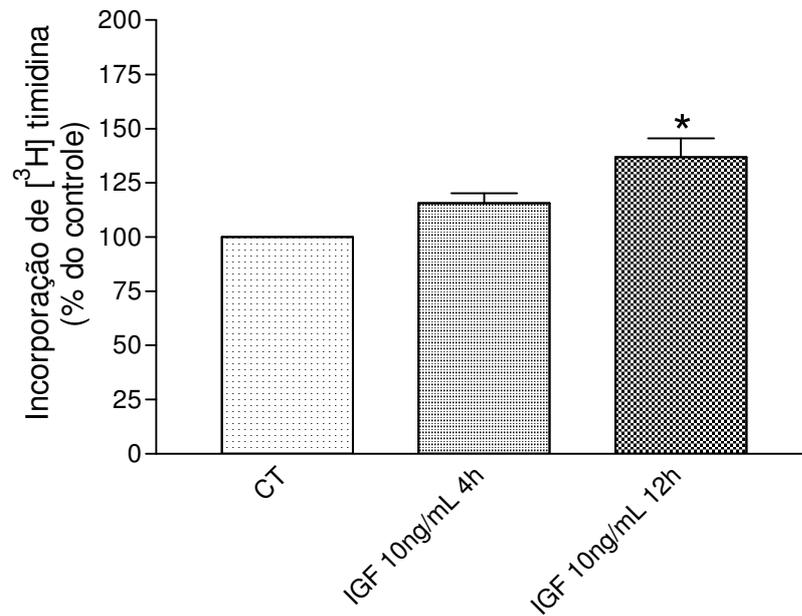
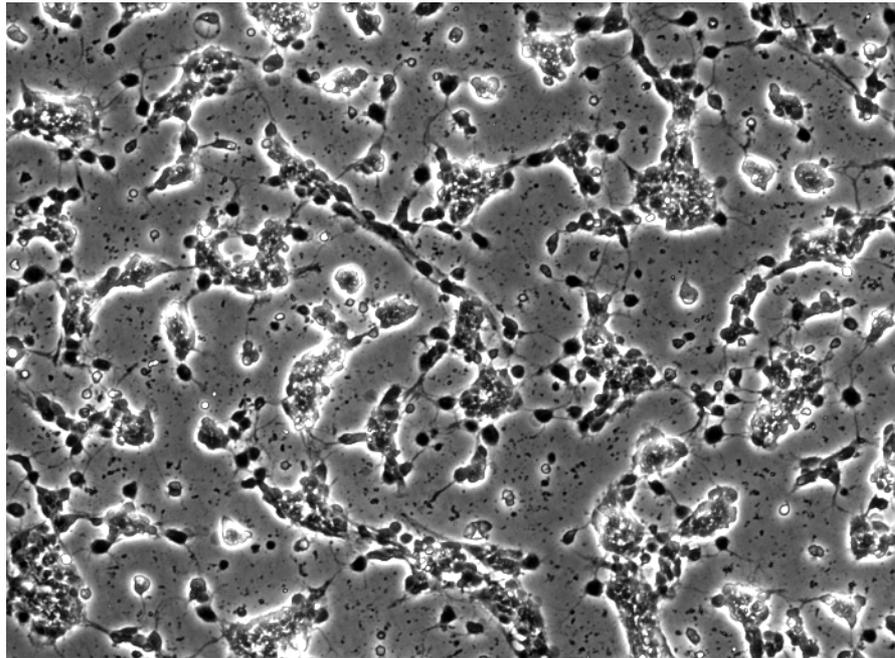
**A****B**

Figura 10 A e B - Efeito dose-dependente do IGF-I sobre a proliferação de células da retina. Células foram mantidas em cultura por 24 horas (A) e em tempos inferiores, 4 e 12 horas (B). O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 10-12) (\* p < 0,001).

**A**



**B**

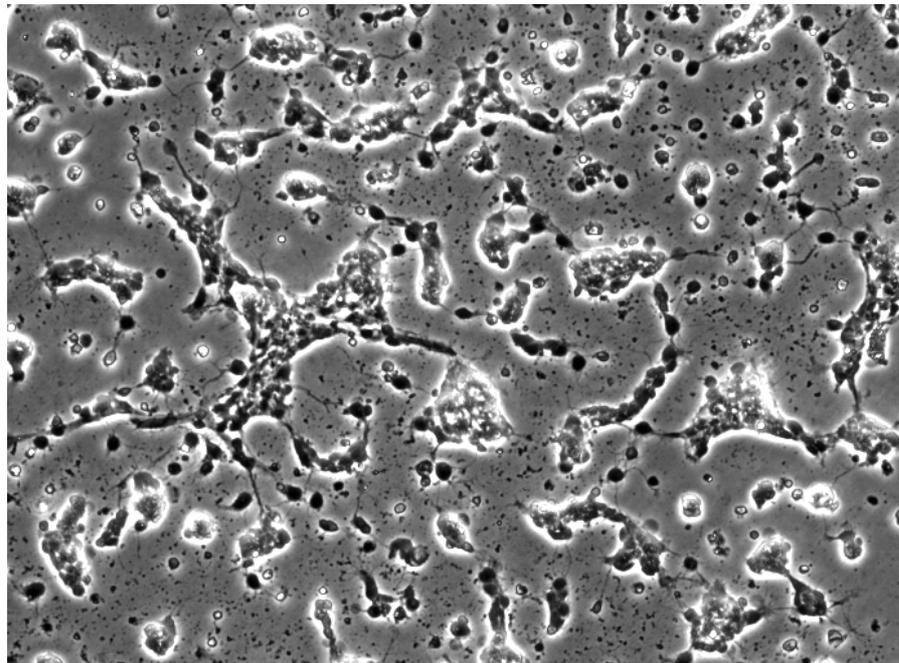


Figura 11 – Fotomicrografia de cultura de células de retina de ratos neonatos na ausência (A) e presença de IGF-I (B) por um período de 24 horas.

As fotomicrografias da figura 11 ilustram o padrão das culturas em 24 horas na ausência (11A) ou na presença de IGF-I 10ng/mL (11B). Novamente podemos ressaltar a ausência de alterações morfológicas significativas apesar de termos obtido um aumento de 50% na taxa de incorporação de timidna tritiada.

Após estes primeiros resultados nos perguntamos como seria a evolução do efeito do IGF-I ao longo de tempos maiores em cultura. Na figura 12 apresentamos os resultados obtidos após 72 horas de tratamento com IGF-I em diferentes concentrações. Os resultados nos mostraram que em 72 horas não havia mais o efeito do IGF-I sobre a proliferação das células da retina. Este resultado nos fez supor que o IGF-I estivesse estimulando a proliferação de uma população de células de forma tempo - dependente.

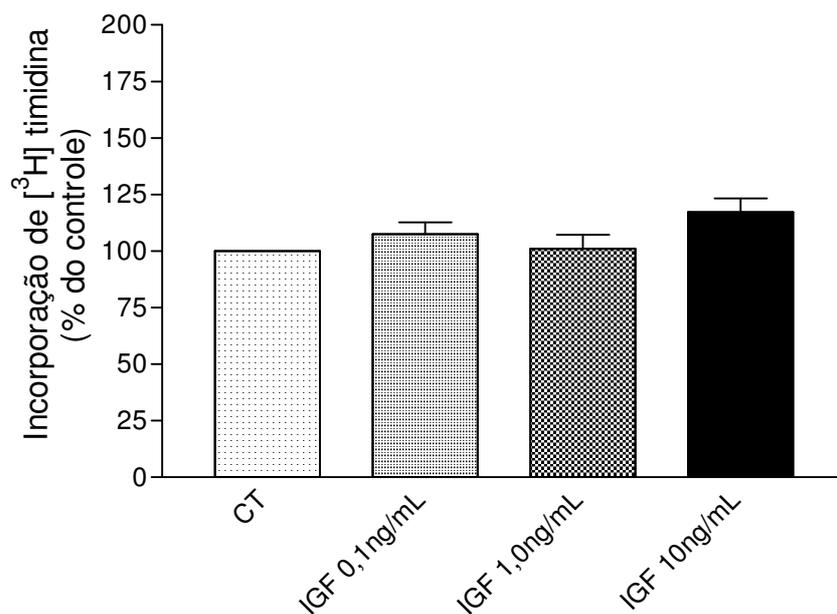


Figura 12 - Efeito dose-dependente do IGF-I sobre a proliferação de células da retina. Células foram mantidas em cultura por 72 horas. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n =9 placas) (\* p< 0,001).

Aumentando ainda mais o tempo de tratamento com IGF-I observamos que em 96, 144 e 360h em cultura não era evidenciado nenhuma alteração no padrão de proliferação celular em culturas tratadas com IGF-I (Figura 13).

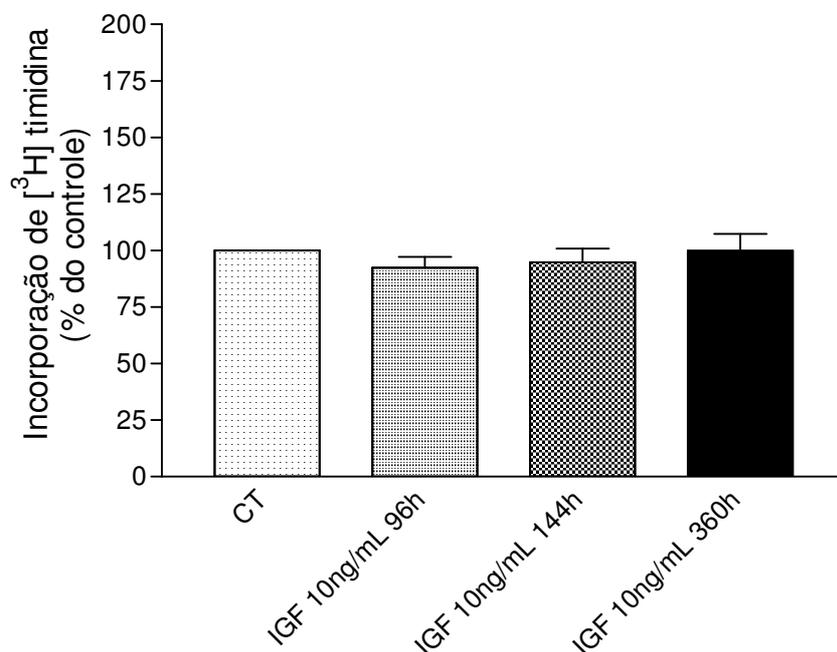


Figura 13 - Efeito dose-dependente do IGF-I sobre a proliferação de células da retina. Células foram mantidas em cultura por 96, 144, 360 horas. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 10 placas) (\* p < 0,001).

Na figura 14 podemos observar fotomicrografias de culturas mantidas por 144h na ausência (figura 14A) ou na presença de 10ng/mL de IGF-I (14 B). Nas culturas controle podemos observar o espriamento de células glias e uma redução drástica do número de neurônios. O tratamento com IGF-I parece induzir um pequeno aumento no número de células com aspecto neuronal (14 B).

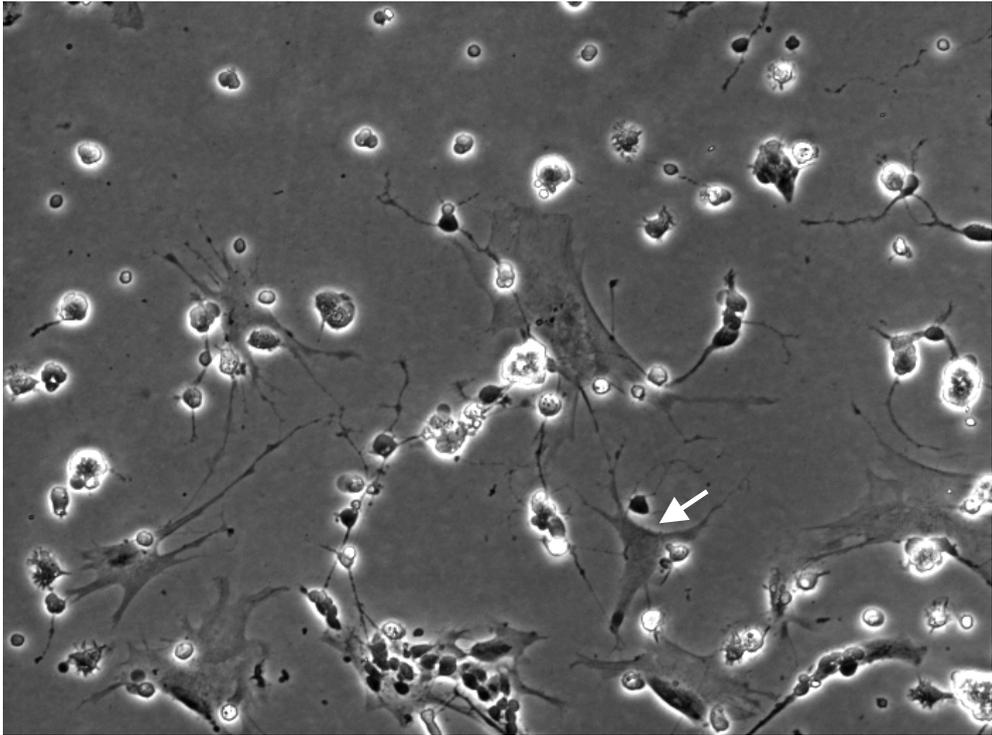
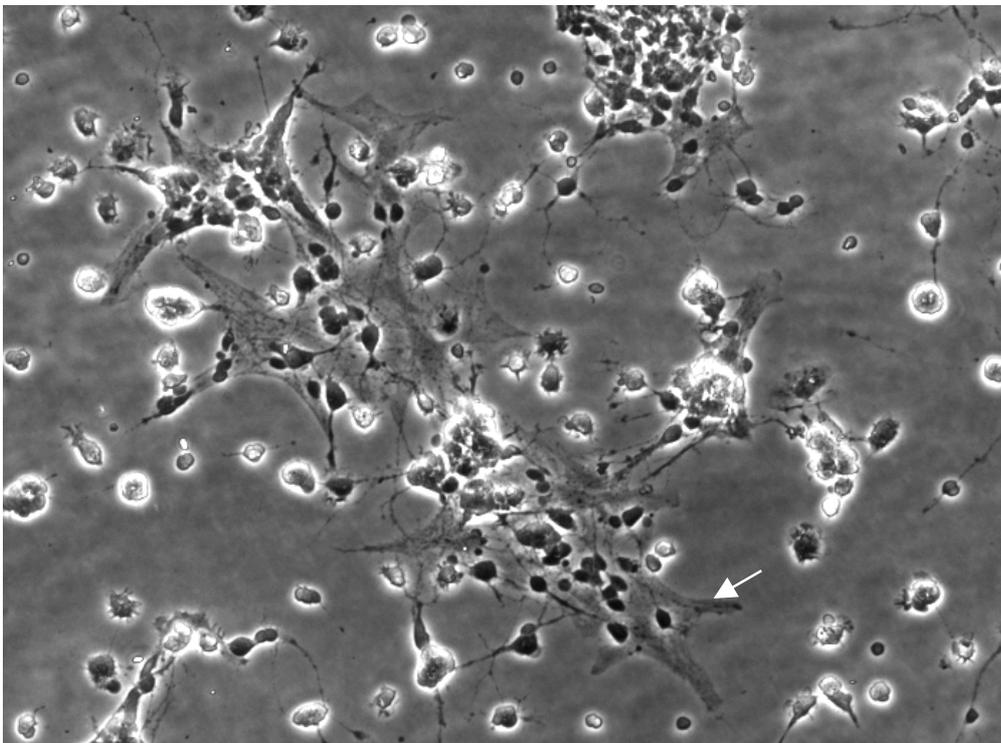
**A****B**

Figura 14 – Fotografia de cultura de células de retina de ratos neonatos na ausência (A) e presença de IGF-I (B) por um período de 144 horas. As setas brancas indicam as células gliais

A fim de que pudéssemos estudar as vias bioquímicas mediadoras do efeito proliferativo do IGF-I, decidimos estabelecer como parâmetros o tempo de incubação de 24 horas e a concentração de 10ng/mL. Dados da literatura mostraram que, em vários sistemas, o aumento da proliferação induzido pelo IGF depende da ativação da enzima PI3 cinase. Por este motivo iniciamos nossos estudos analisando o papel desta via. Na figura 15 podemos observar que o tratamento com um inibidor seletivo da PI3 cinase (LY 294002), na concentração de 25  $\mu$ M, aboliu por completo o efeito do IGF-I. Este resultado mostra que também no nosso sistema a via da PI3 cinase está envolvida no efeito do IGF-I.

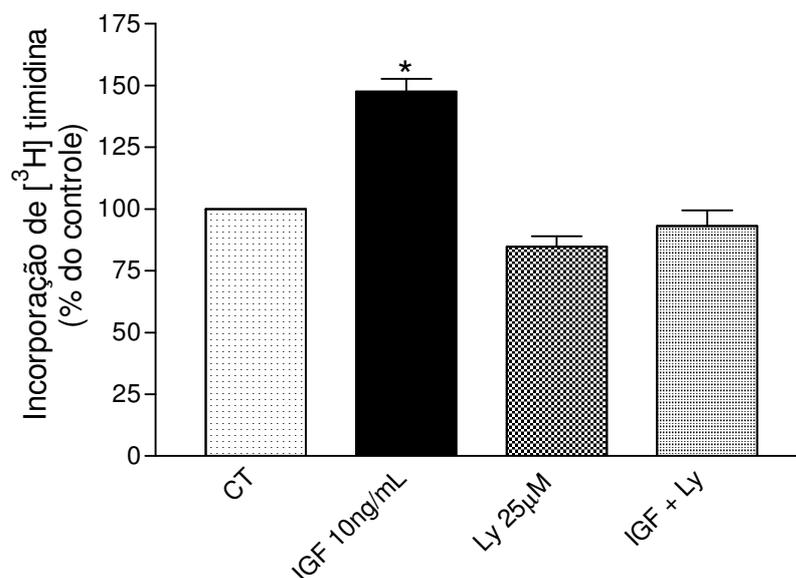


Figura 15 - Efeito do IGF-I 10 ng/ml na proliferação das células da retina é bloqueado pelo Ly294002 25  $\mu$ M. Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 6-8) (\* p < 0,001).

Uma outra importante via de sinalização do receptor de IGF é a da proteína cinase C (PKC). Assim sendo, tratamos as culturas com IGF-I na presença de um inibidor das diferentes isoformas de PKC, o cloreto de queleritrina na concentração de 1,25 $\mu$ M. Na figura 16 podemos observar que o tratamento com cloreto de queleritrina aboliu por completo o efeito do IGF-I indicando a importância da PKC na via de sinalização.

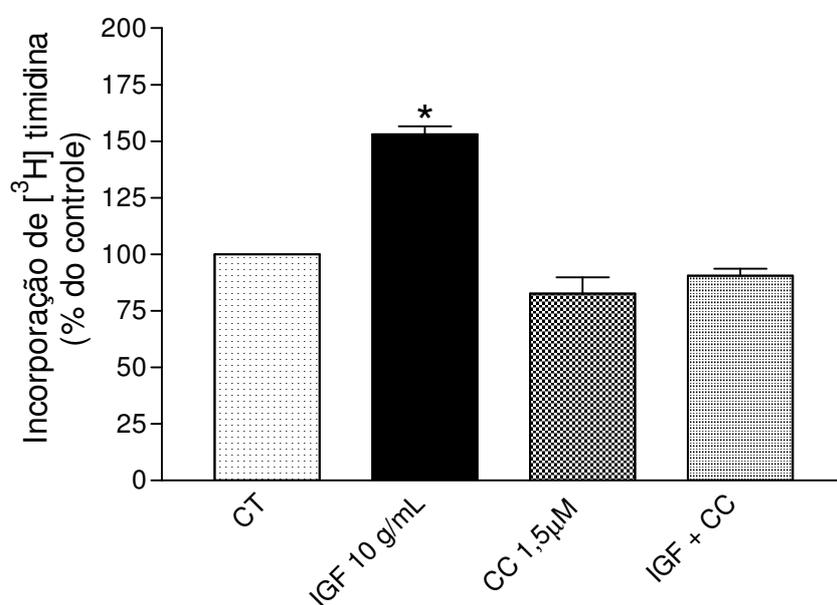


Figura 16 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL na proliferação das células da retina é bloqueado pelo cloreto de queleritrina 1,25  $\mu$ M . Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 6-8) (\* p < 0,001).

Com o objetivo de caracterizarmos qual a isoforma de PKC que estaria envolvida no efeito do IGF-I começamos nossos estudos utilizando a rotlerina que é um inibidor seletivo da isoforma delta (independente de cálcio). Na figura 17 estão ilustrados os resultados desta experiência que mostram uma inibição do efeito do IGF-I pelo tratamento concomitante com rotlerina na concentração de 2 $\mu$ M.

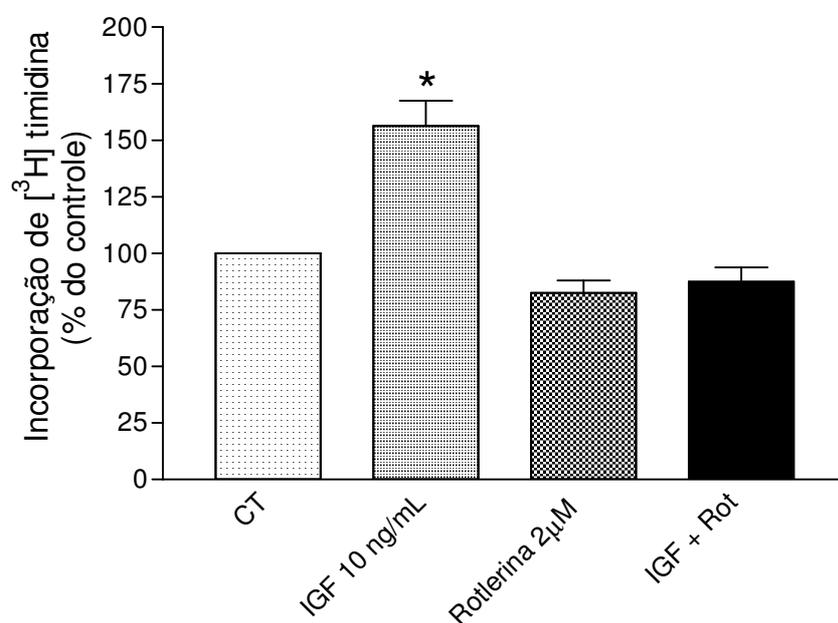
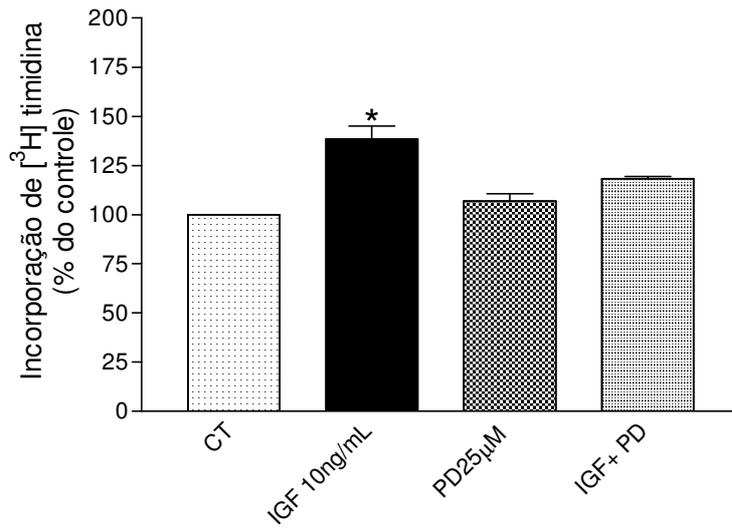


Figura 17 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL na proliferação das células da retina é bloqueado pela rotlerina 2,0  $\mu$ M . Os valores foram expressos em porcentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n =8-10) (\* p< 0,001).

Como observamos ser o efeito do IGF-I dependente da ativação da PKC, decidimos analisar o envolvimento das diferentes MAP cinases neste

fenômeno. Começamos nossos estudos avaliando a participação da MAP cinase através da inibição da MEK. Para tal utilizamos o PD 98059 que é um inibidor desta enzima. Ao analisarmos os resultados apresentados na figura 18A podemos observar que a presença de PD na concentração de 25 $\mu$ M inibiu parcialmente o efeito do IGF-I. Por este motivo fizemos novas experiências utilizando a concentração de 37,5 $\mu$ M do PD. Os resultados obtidos mostram que o efeito do IGF-I foi totalmente bloqueado nesta nova situação experimental (figura 18B). Esse conjunto de resultados mostram o envolvimento da MAP cinase no aumento da proliferação celular induzida pelo IGF-I.

**A**



**B**

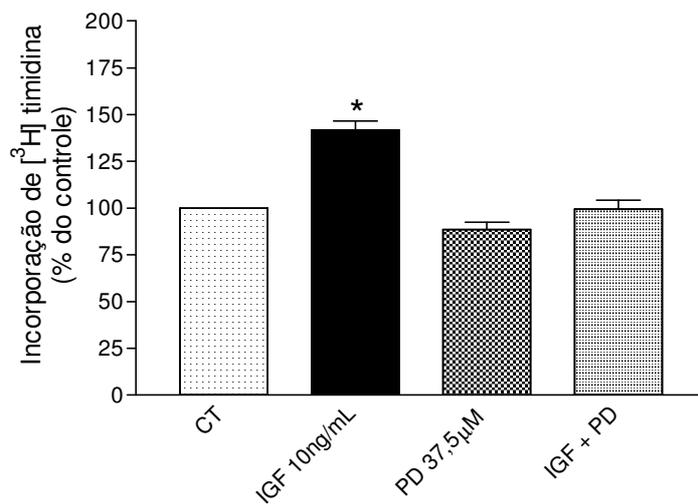


Figura 18 A e B: Efeito do IGF-I 10 ng/mL na proliferação das células da retina é bloqueado parcialmente pelo PD98059 25 µM e totalmente pelo PD98059 37,5µM . Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 6-8) (\* p< 0,001).

Continuando nossos estudos sobre o envolvimento das MAP cinases, analisamos a participação da p38. Para tal utilizamos o SB 202190 na concentração 20 $\mu$ M. Os resultados obtidos indicam que o bloqueio da p38 não interferiu no efeito do IGF-I (figura 19). É interessante observar que apenas o bloqueio da p38 foi capaz de aumentar a proliferação das células da retina.

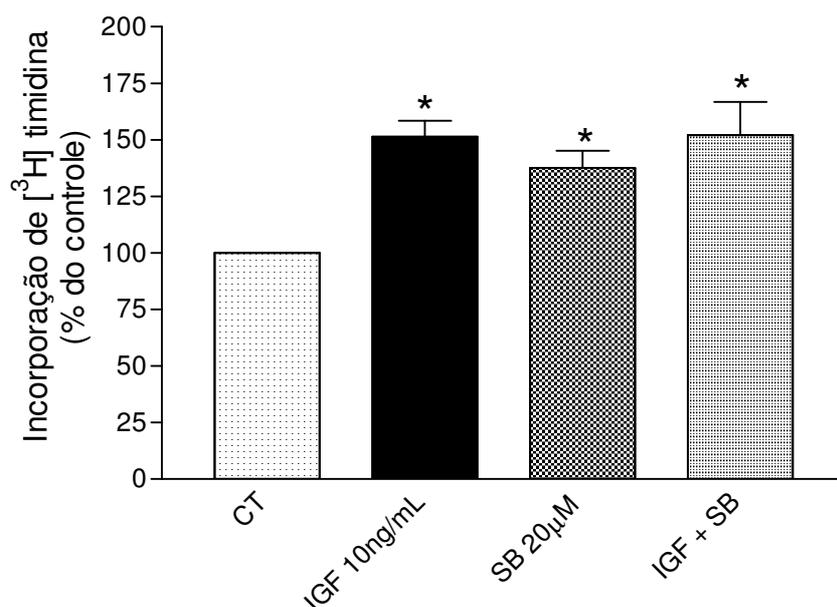


Figura 19 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL sobre a proliferação das células da retina não é inibido pelo SB202190 20 $\mu$ M. Os valores foram expressos em porcentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 8-10) (\* p < 0,001).

Continuando a nossa investigação analisamos a participação da via da JNK (outra MAP cinase) no efeito do IGF-I. Na figura 20 estão representados os resultados obtidos que claramente indicam a participação da JNK no efeito do IGF-I visto que o tratamento com o inibidor da JNK, na concentração de 0,5 $\mu$ M, bloqueou parcialmente o efeito do IGF-I.

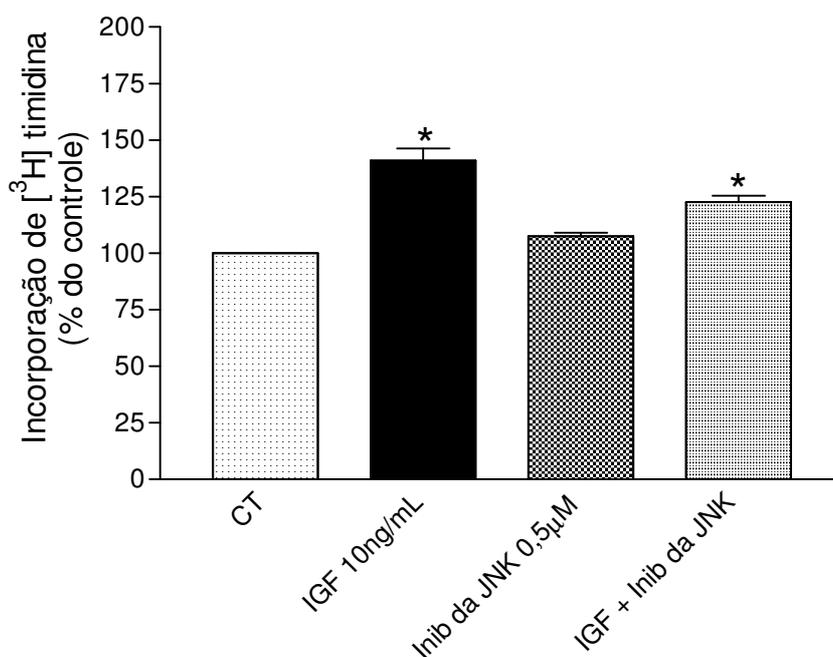


Figura 20 - Efeito do IGF-I 10 ng/ml na proliferação das células da retina é bloqueado pelo inibidor da JNK 0,5  $\mu$ M . Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 6-8) (\* p< 0,001).

Com a finalidade de continuarmos analisando as vias bioquímicas envolvidas, resolvemos investigar se a atividade tirosina cinase seria importante para o efeito do IGF-I. Inicialmente utilizamos a genisteína na concentração de 15  $\mu$ M. Como podemos observar no gráfico abaixo, quando a genisteína é adicionada nas culturas na presença do IGF, ela não é capaz de reverter o efeito observado (figura 21). Esse resultado nos surpreendeu pois o receptor de IGF-I é do tipo tirosina cinase e portanto deveria ter seu processo de transdução de sinal bloqueado pela genisteína. Entretanto, a genisteína não é um bloqueador seletivo dos receptores de IGF o que poderia parcialmente explicar os nossos resultados.

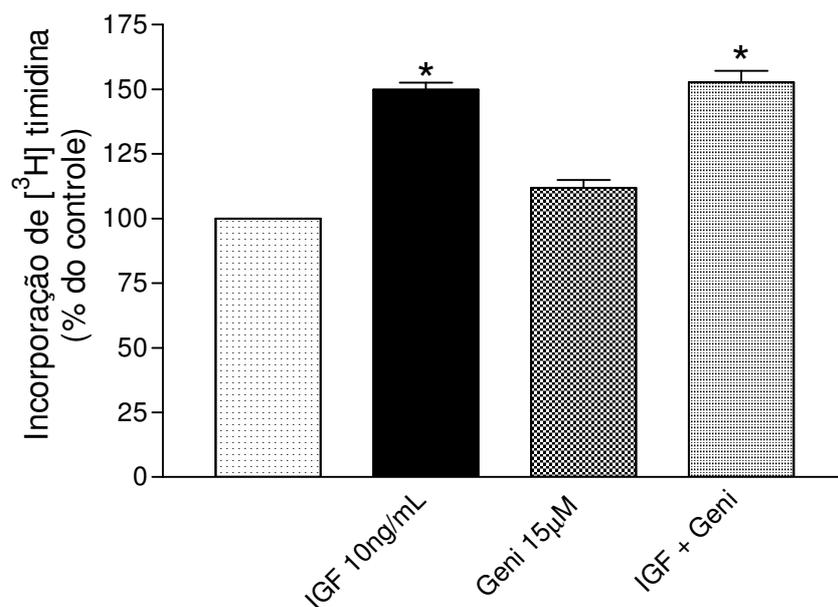


Figura 21 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL sobre a proliferação das células da retina não é inibido pela genisteína 15 $\mu$ M. Os valores foram expressos em porcentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 6-7) (\* p < 0,001).

Decidimos então, avaliar a participação de tirosinas cinases citoplasmáticas no efeito do IGF-I. Nossos estudos tiveram início com a análise da família das proteínas Src. Utilizamos o PP1 na concentração de 1,0  $\mu$ M. Esta droga apresenta uma grande seletividade pela família de proteínas Src. Ao analisarmos os resultados experimentais obtidos com esta droga observamos que houve um bloqueio significativo do efeito do IGF-I quando o PP1 foi adicionado às culturas (figura 22).

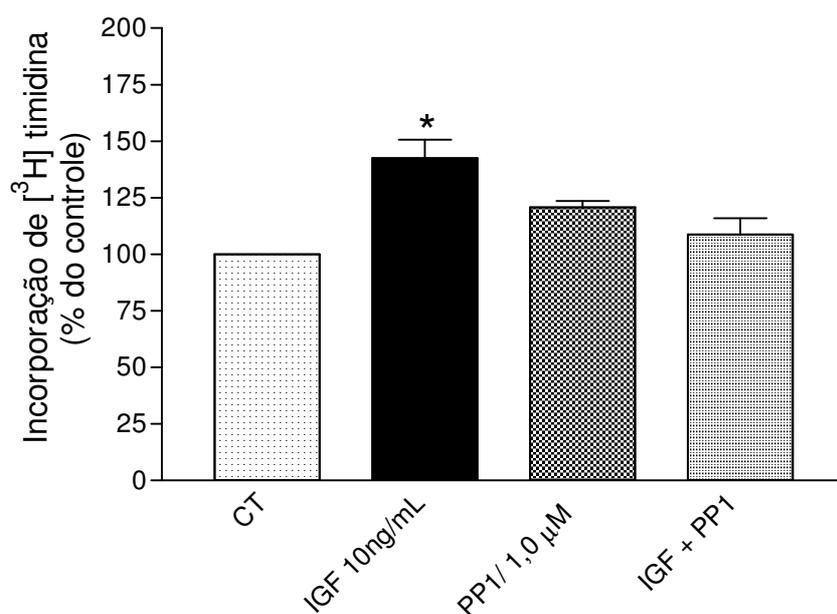


Figura 22 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL na proliferação das células da retina é bloqueado pelo PP1 1,0  $\mu$ M . Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 6-8) (\* p< 0,001).

Uma outra via de sinalização que decidimos estudar foi a da secreção vesicular de polipeptídeos. Muitos fatores de crescimento têm seus efeitos mediados seja pela secreção de outros fatores, seja pela inserção de receptores na membrana ou por ambos os efeitos. Para testar esta possibilidade utilizamos a brefeldina A que inibe a via de secreção vesicular. Na figura 23A podemos observar que quando as culturas foram tratadas com 3ng/mL de brefeldina não houve o bloqueio do efeito do IGF-I. Entretanto quando utilizamos a concentração de 30ng/mL o efeito foi totalmente abolido (figura 23B). Estes resultados sugerem um papel importante da via de secreção vesicular de polipeptídeos no efeito do IGF-I.

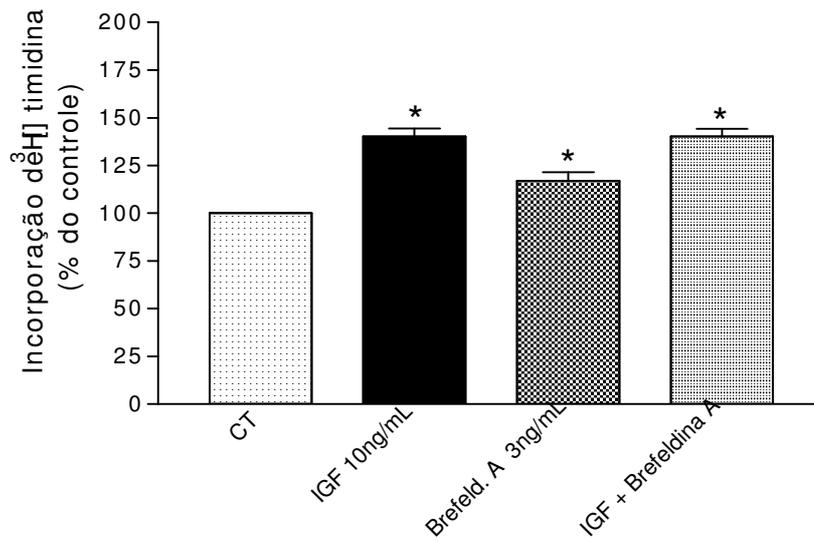
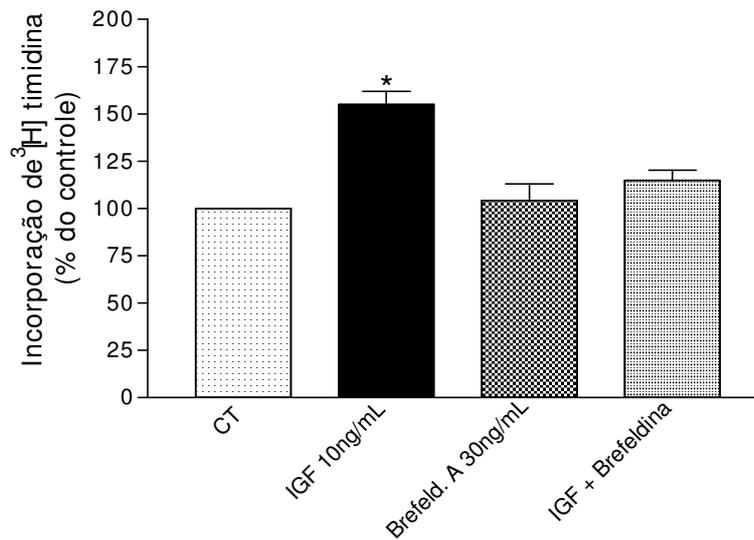
**A****B**

Figura 23 A e B - Efeito do IGF-I 10 ng/mL sobre a proliferação das células da retina não é inibido pela brefeldina A 3ng/mL mas é inibido pela Brefeldina A na concentração de 30ng/mL. Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n =6-10) (\*  $p < 0,001$ ).

Resolvemos investigar se a internalização do receptor de IGF poderia de alguma forma interferir no efeito proliferativo observado pelo IGF-I. A cadaverina, um inibidor da internalização de receptor, na concentração de 0,75nM, foi capaz de inibir o efeito por nós observado como demonstra a figura 24. Sendo que em concentrações mais elevadas como em 3nM e 6nm um efeito tóxico foi observado.

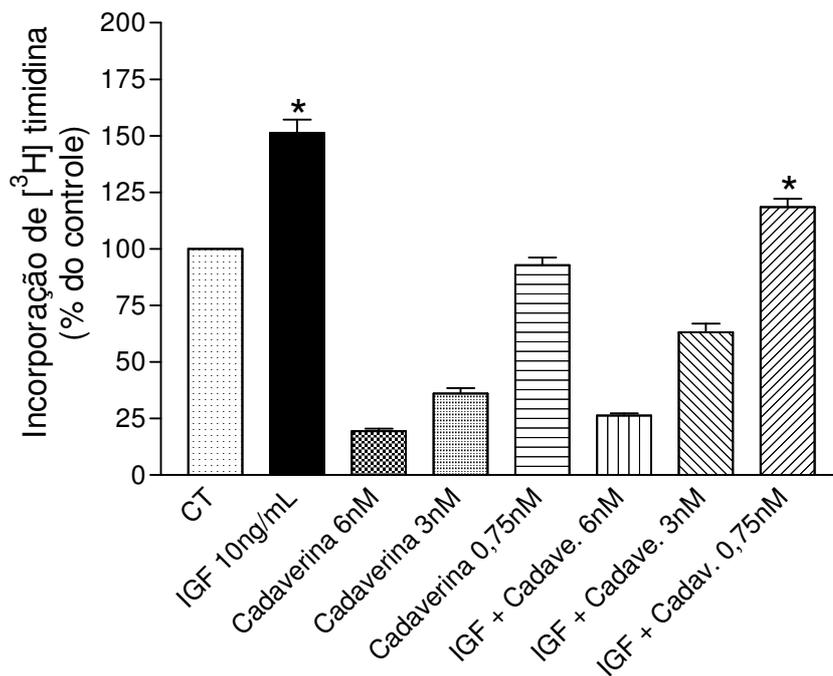


Figura 24 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL sobre a proliferação das células da retina é inibido pela cadaverina 0,75nM sendo que nas concentrações de 3nM e 6nM observamos uma toxicidade. Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n =6-13) (\*  $p < 0,001$ ).

Dados da literatura demonstram que é possível ocorrer transativação dos receptores de EGF quando do tratamento com IGF-I (Zou et al., 2006). A fim de que pudéssemos avaliar se em nossas culturas o efeito do IGF-I também dependia da ativação dos receptores do EGF utilizamos um bloqueador seletivo destes receptores, o AG1478 na concentração de 2,5 $\mu$ M. Na figura 25 observamos que quando as culturas foram tratadas com IGF-I, na presença do inibidor dos receptores de EGF, o efeito na proliferação celular foi totalmente abolido. Este resultado indica que, também em nossa preparação o IGF tenha seu efeito mediado pelos receptores de EGF.

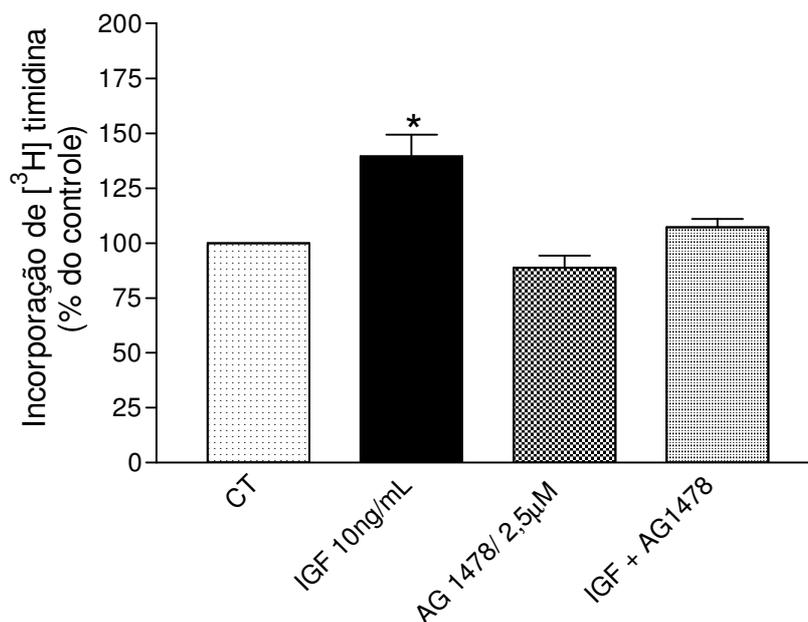


Figura 25 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL sobre a proliferação das células da retina é inibido pelo AG1478 2,5 $\mu$ M. Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 6-9) (\* p < 0,001).

Visto termos encontrado a participação dos receptores de EGF, nos perguntamos se as metaloproteínas estariam envolvidas neste fenômeno. Estas proteínas poderiam clivar o EGF ligado à matriz extracelular permitindo a ligação do fator trófico ao seu receptor. Fizemos então um estudo acerca do papel da metaloproteínase 9 no efeito proliferativo induzido pelo IGF-I. Na figura 26 observamos que o inibidor desta enzima foi capaz de abolir o efeito do IGF-I.

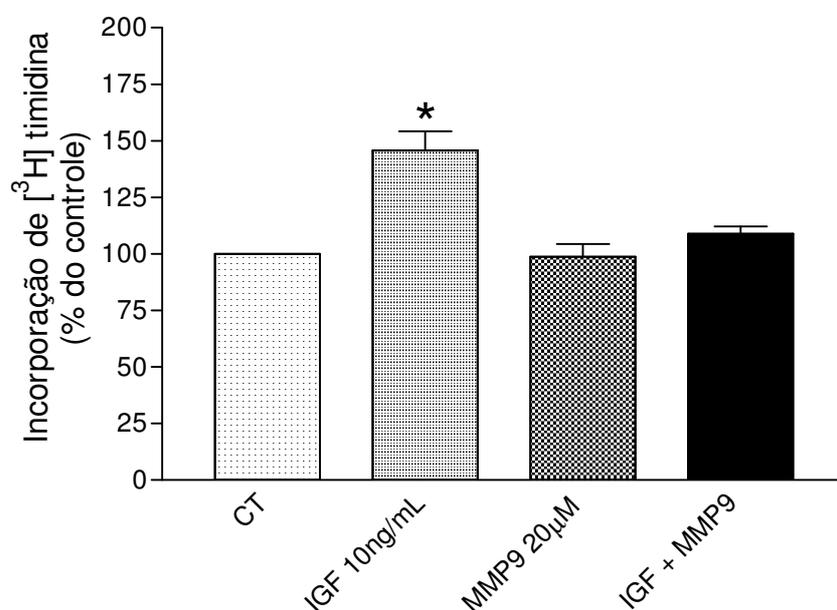


Figura 26 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL sobre a proliferação das células da retina é bloqueado pelo inibidor da metaloproteínase 9 20 $\mu$ M. Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n =6-7) (\* p < 0,001).

Nossa próxima etapa foi analisar o papel da fosfolipase C no efeito mediado pelo IGF-I em nossas culturas. Para tal utilizamos o U73122 4 $\mu$ M e como podemos observar analisando os resultados apresentados na figura 27 ele foi capaz de inibir o efeito proliferativo induzido pelo IGF-I.

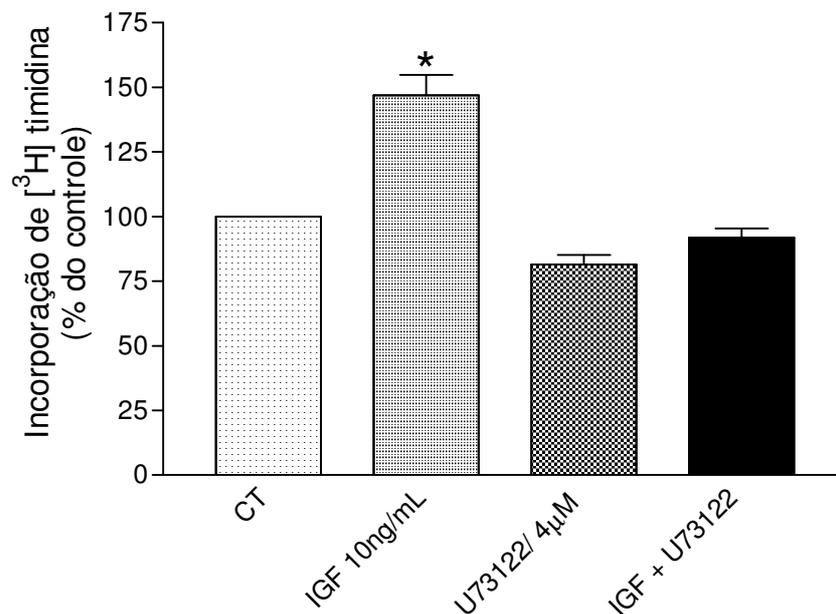


Figura 27 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL sobre a proliferação das células da retina é inibido pelo U73122 4 $\mu$ M. Os valores foram expressos em porcentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 6-10) (\* p < 0,001).

Nosso próximo passo foi utilizar um inibidor do receptor de IGF-I, o IOME AG538 na concentração de 20 $\mu$ M e verificar a provável inibição do efeito do IGF-I. Na figura 28 podemos observar que o bloqueio dos

receptores de IGF-I além de não inibir o efeito do IGF-I, ainda induz um aumento de aproximadamente 100% na proliferação celular. Esse resultado nos surpreendeu e inicialmente repetimos várias vezes a experiência a fim de que pudéssemos nos certificar do efeito. A partir do momento em que nos certificamos do resultado buscamos uma possível explicação para o fenômeno. Inicialmente pensamos que o tratamento com IGF-I pudesse induzir a internalização de receptores para fatores de crescimento e o bloqueio deste efeito poderia levar à ativação desses receptores aumentando assim a proliferação celular. Resultados do nosso laboratório mostram que a ativação dos receptores de EGF leva a um aumento de 100% na proliferação das células da retina. Assim sendo, fizemos experiências utilizando o inibidor do receptor de EGF na presença do inibidor do receptor de IGF. Na figura 29 podemos observar que o inibidor do receptor de EGF não reverteu o aumento na proliferação celular induzido pelo tratamento com o inibidor do receptor de IGF.

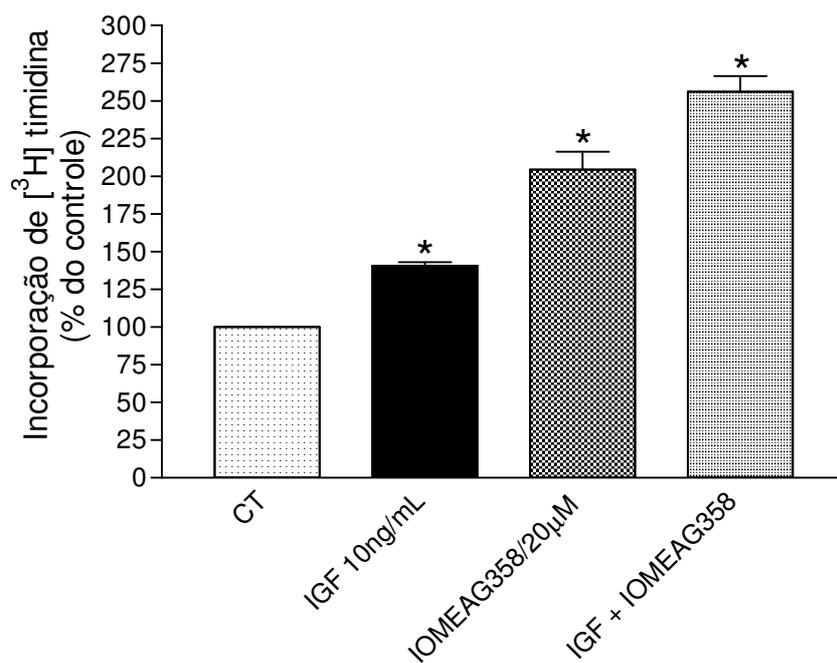


Figura 28 - Efeito do IGF-I 10 ng/mL sobre a proliferação das células da retina é potenciado pela tirfostina IOME AG 538 20µM. Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n =8-23 ) (\* p< 0,001).

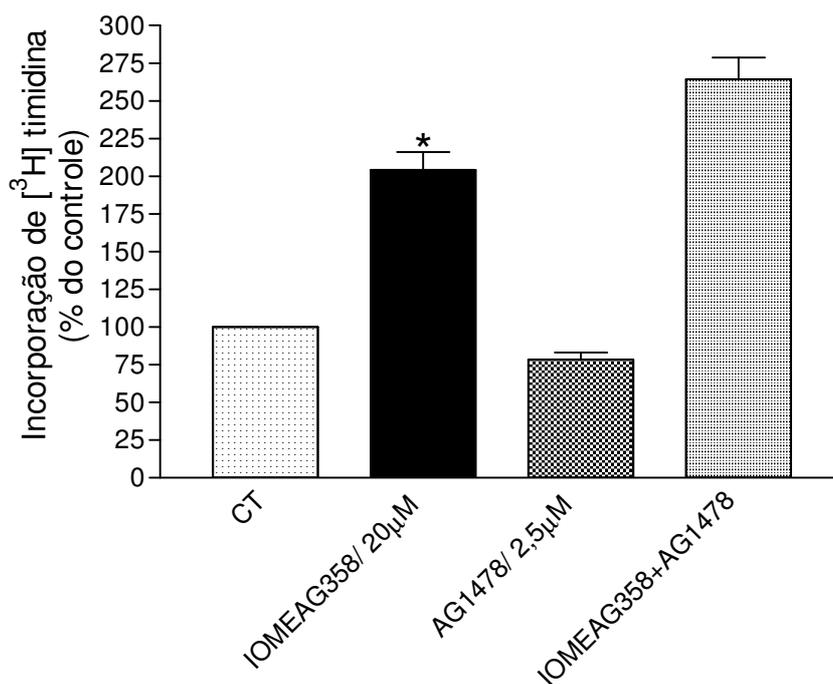


Figura 29 - Efeito dos inibidores dos receptores de IGF e EGF sobre a proliferação das células da retina é potenciado pelo IOME AG538 20µ e pelo AG1478 2,5µM. Os valores foram expressos em porcentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média ± erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 9-23) (\* p < 0,001).

Trabalhos da literatura demonstram que o tratamento com IGF-I induz um aumento no número de receptores TrkB na membrana. Dados prévios do nosso laboratório e que estão demonstrados na figura 30, mostram que o tratamento com o inibidor dos receptores Trk (K252a), na concentração de 25nM e 50nM, induz um aumento na proliferação das células retinianas de aproximadamente 100%. Já o tratamento com BDNF nas concentrações de 25 e 50ng/mL induz uma diminuição de aproximadamente 50% na proliferação das células retinianas (figura 31).

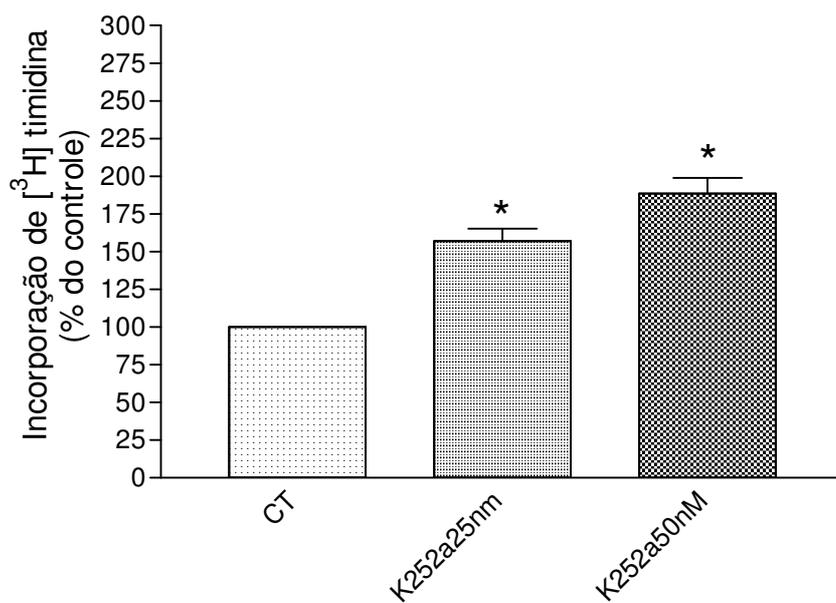


Figura 30 - Efeito do K252a 25 e 50 nM sobre a proliferação das células da retina. Ocorre um aumento da proliferação celular. Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n =7-10) (\* p< 0,001).

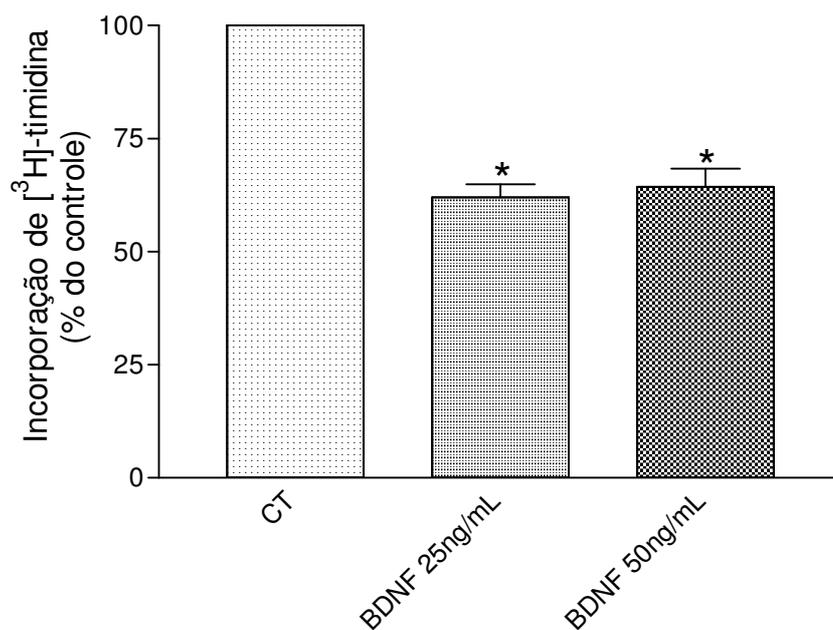


Figura 31 - Efeito do BDNF 25 e 50 ng/mL sobre a proliferação das células da retina. Ocorre uma diminuição da proliferação celular. Os valores foram expressos em percentagem do controle. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100%. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes ( $n = 7-10$ ) (\*  $p < 0,001$ ).

Da análise desse conjunto de resultados (inibidor do receptor de IGF-I, K-252a e BDNF) podemos sugerir que se o IGF-I está regulando a expressão e ou inserção dos receptores Trk na membrana e até mesmo a síntese e liberação de neurotrofinas como o BDNF, o bloqueio deste sinal poderia induzir um aumento na proliferação mediado pela ação de outros fatores de crescimento presentes em nossas culturas.

## 5- Discussão

O IGF-I é um fator de crescimento descrito na literatura como tendo um importante papel na diferenciação, na proliferação e na sobrevivência celular. Os resultados por nós obtidos nesse trabalho demonstram que o tratamento de células da retina com IGF-I, por 24-48 horas, induz um aumento de aproximadamente 50% na proliferação celular. Este efeito se dá de forma dose-dependente, sendo que a concentração de 10ng/mL já induz a maior resposta. Observamos também que o efeito do IGF-I é tempo-dependente e a partir de 72h não mais observamos seu efeito.

Quando comparamos nossos resultados com aqueles presentes na literatura, observamos que eles estão de acordo com o que vêm sendo descrito para muitas populações celulares. As semelhanças não só dizem respeito à taxa de aumento na proliferação como também à cinética das respostas. Em células da próstata do tipo DU 145 (Zhou et al., 2006) e em células musculares da aorta de ratos (Meng et al., 2007), o tratamento com IGF-I (50ng/mL), por 24h, foi capaz de aumentar a proliferação em aproximadamente 40%. Nas células HIRcB e em adipócitos 3T3L1, o tratamento com IGF-I, por 12h, induziu um aumento de 30-40% na proliferação celular (Dalle et al., 2001). Como em nossa preparação o efeito do IGF-I está em torno de 50%, podemos sugerir que a magnitude deste

efeito esteja relacionado à semelhança das respostas induzidas por este fator trófico em diferentes populações.

Em 1988, foi demonstrado que o tratamento com insulina de células do gânglio cervical superior de ratos induzia um aumento na proliferação. De forma semelhante o tratamento com IGF-I, na concentração de 10ng/mL, também foi capaz de aumentar a proliferação dessas células em torno de 5 vezes quando comparado com o controle. Neste mesmo trabalho os autores igualmente observaram que o IGF-II na concentração de 100ng/mL estimula a proliferação em torno de 53% (DiCicco-Bloom and Black, 1988). Esses resultados podem ser explicados pelo fato destas moléculas interagirem com os receptores do tipo 1 e desta forma estimularem com diferentes afinidades, as respostas observadas. Em nosso trabalho nos ativemos ao estudo do papel do IGF-I na proliferação das células da retina. Futuramente procuraremos identificar se este efeito também pode ser observado tanto com insulina como com IGF-II.

À primeira vista pode parecer contraditório o fato do IGF-I induzir um aumento tão grande na proliferação das células do gânglio cervical (500%) e em nossa preparação induzir um aumento de apenas 50%. Entretanto, como os autores trabalharam com células embrionárias e as condições experimentais não são idênticas às nossas, estas diferenças são perfeitamente esperadas. Diferenças nas taxas de aumento na proliferação

induzidas pelo IGF-I também foram observadas por Cui e Almazan (2007), analisando o efeito do IGF-I na proliferação de precursores oligodendrócitos. Nessa população, o aumento da proliferação também foi dose-dependente. Com 10ng/mL de IGF-I, o aumento foi de 1,7 vezes chegando ao seu valor máximo (2,4 vezes) com 50ng/mL de IGF-I (Cui and Almazan, 2007).

Em retinas de embrião de galinha (E7-E9), o IGF-I também tem um efeito na proliferação celular. Após tratamento por 48h, foi observado que a concentração de 40ng/mL induzia aumento de 20% e a concentração de 100ng/mL induzia aumento de 45%. Os autores observaram que o tratamento com IGF-II também aumentava a proliferação porém havia necessidade de se utilizar uma concentração bem mais alta (200ng/mL). Esse fato ocorre provavelmente porque tanto o IGF-I quanto o IGF-II se ligam ao receptor do tipo 1, sendo que o IGF-II apresenta menor afinidade (Calvaruso et al., 1995). Um outro grupo demonstrou que o efeito proliferativo do IGF-I em retinas de embriões de galinha (E5-E9) depende do substrato no qual as células foram plaqueadas pois na presença de laminina havia um aumento de 13 vezes, enquanto que na presença de fibronectina não era observado nenhum aumento no padrão de proliferação (Frade et al., 1996). Esses resultados reforçam a idéia que dependendo das condições experimentais o tratamento com IGF-I pode induzir efeitos até mesmo discrepantes.

Um trabalho realizado em retinas de humanos também mostra o papel do IGF na proliferação de células de Muller (população glial mais numerosa na retina). O tratamento com IGF-I na concentração de 50ng/mL é capaz de induzir aumento de 30% na proliferação após 48 horas de tratamento (Ikeda et al., 1995).

Ao compararmos os nossos resultados com os dados encontrados na literatura, podemos observar que o IGF-I tem um papel mitogênico para as células retinianas mas este efeito ocorre durante uma janela temporal relativamente pequena, visto que após 72 horas, não mais pudemos observar o aumento na proliferação quando comparado ao controle. O aumento na taxa de proliferação por nós encontrado está de acordo com aqueles encontrados em muitos sistemas, nos permitindo dizer que a maior parte dos trabalhos mostra um aumento na proliferação da ordem de 40-50%. Trabalhos futuros serão necessários para que possamos caracterizar se são células gliais ou células neuronais, ou mesmo ambas que estão proliferando após tratamento com IGF-I.

Estudos realizados com ratos Sprague-Dawley nas idades P10, P22, P35, P60, P90 e P180 mostraram a expressão de fatores tróficos em ratos normais e em ratos que sofreram lesão em um dos olhos (Cao et al., 2001). Comparando os níveis de IGF-I, FGFa e FGFb, podemos verificar que as cinéticas individuais apresentam-se de maneira distinta. A

expressão do RNAm para o FGFb e para o seu receptor vai aumentando nas diferentes idades nos animais controle. Os animais lesados apresentam níveis de expressão maiores do que o controle em todas as idades mas a partir de P90 o aumento observado é maior. O FGFa teve um comportamento um pouco diferente uma vez que não houve alteração nos níveis de RNAm com a lesão (Cao et al., 2001). Já a expressão do RNAm para IGF-I diminui com o tempo. Em P10 ele declina para 55% e em P35 para 50%, chegando a 46% em P60 permanecendo assim até P180. Em animais cujas retinas foram lesadas não houve alteração desta cinética. A expressão do receptor não apresentou alteração nenhuma tanto em resposta a injúria quanto em resposta a idade (Cao et al., 2001).

Nesses mesmos ratos foi analisado os níveis de IGF-I, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e GH (hormônio do crescimento) no soro, no homogenado retiniano e no humor vítreo. Os autores observaram que o IGF-I aumentava no soro do rato alcançando níveis elevados em P14 e P21 comparado com P0. Nessas mesmas idades, ocorria um declínio dos níveis de IGF-I no humor vítreo. O nível de VEGF é 10 vezes maior também no vítreo quando comparado com o soro já o de GH é 10 vezes menor no vítreo do que no soro. Baseados nestes resultados os autores propuseram que o VEGF e o IGF-I possam participar do desenvolvimento retiniano sendo o vítreo um reservatório para estes fatores que por difusão atingiriam a retina (Modanlou et al., 2006).

A distribuição do IGF-I e de suas proteínas de ligação também foi estudada em olhos de ratos normais e diabéticos. Em ratos normais, o RNAm para IGFBP1 foi detectado na retina, na córnea e na íris. Já o RNAm para as IGFBP 5 e 6 foram detectadas na retina, na íris e na córnea e os RNAs para IGFBPs 2, 3 e 4 não foram encontrados nos olhos de ratos. O RNAm para o IGF-I e seu receptor do tipo 1 foi detectado na retina. Em ratos com diabetes houve um aumento do RNAm para IGFBP 5 e uma redução para IGFBP 6, sendo que outros componentes do sistema de IGF não sofreram alterações detectáveis (Bergman et al., 2005).

Estudos realizados em olhos de bovinos analisaram a produção de IGF-I e de IGFBPs *in vitro* (72h) em quatro tipos celulares: células endoteliais microvasculares, pericitos, células do epitélio pigmentar e fibroblastos (Moriarty et al., 1994). Em todas estas células foi encontrado um aumento temporal dos níveis de IGF-I mas de forma diferente. As células endoteliais e os fibroblastos tiveram um aumento nos níveis de IGF-I até 48 horas permanecendo constante até as 72 horas, já os pericitos e as células do epitélio pigmentar apresentaram produção contínua de IGF-I sendo que os pericitos mostraram um maior aumento no período entre 48-72horas. Com relação à expressão das IGFBPs, cada tipo celular mostrou um perfil de expressão distinto (Morriarty et al.,1994). Essa diferença de expressão com relação ao tipo celular pode nos ajudar a entender esse

efeito transiente do IGF-I na retina dependendo do tipo celular envolvido. No futuro pretendemos analisar as células que estão respondendo ao IGF-I para melhor compreender o conjunto de ações deste fator sobre a população de células da retina.

Apesar de termos observado um aumento na proliferação celular da ordem de 50% após o tratamento com o IGF-I, a análise das culturas à microscopia óptica de contraste de fase não evidenciou alterações marcantes no padrão morfológico das culturas tratadas quando comparadas com as controle. Em algumas situações experimentais, as culturas tratadas apresentavam regiões com um maior espriamento dos grumos. Entretanto, este não era um padrão absoluto. Como o efeito do IGF-I ocorria apenas nas primeiras 48h de cultura é possível que o IGF-I esteja regulando a proliferação e na seqüência esteja induzindo a diferenciação de células da retina.

Depois de caracterizado o efeito do IGF-I nas nossas culturas, resolvemos verificar as vias bioquímicas que mediavam essa resposta. Uma via bem descrita na literatura é a via da PI3K/AKT, que participa da cascata de transdução de sinais de vários receptores do tipo tirosina cinase incluindo receptores de insulina e de IGF (Giorgetti et al., 1993). Em tecidos periféricos, a ativação tanto dos receptores de insulina como os de IGF-I dispara a via da PI3K que leva à ativação da proteína cinase B/Akt. A

ativação dessa cinase medeia a translocação dos transportadores de glicose para a membrana possibilitando a entrada de glicose na célula (Bondy and Cheng., 2004).

Um outro alvo para a sinalização da insulina/IGF via Akt é a glicogênio sintase cinase  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ). O IGF-I é capaz de inibir a GSK3 $\beta$  aumentando assim a síntese protéica e de glicogênio em neurônio que expressam IGF-I. A inibição da GSK3 $\beta$  medeia o efeito neuroprotetor do IGF-I uma vez que ela tem efeitos pró-apoptóticos nos neurônios (Bondy and Cheng, 2004).

Em fibroblastos de murinos, tanto a insulina quanto o IGF-I são capazes de aumentar a atividade da PI3K sendo que esse aumento depende da fosforilação da IRS1, um substrato do receptor de insulina. (Giorgetti et al.,1993). Em retinas de ratos Wistar Albino nas idades P1 e P2, o IGF-I age como um fator trófico para as células amácrinas regulando sua sobrevivência e diferenciação sendo que a via da PI3K está envolvida nessa regulação (Politi et al., 2001). Como nosso modelo experimental é a retina de ratos neonatos, possivelmente o tratamento com IGF-I esteja aumentando a sobrevivência e a proliferação das células amácrinas presentes em nossas culturas.

Em ratos Sprague-Dawley, o aumento observado na proliferação dos oligodendrócitos cerebrais induzido pelo IGF-I é dependente da ativação da PI3K (Cui and Almazan, 2007). Nossos resultados estão de acordo com todos estes previamente citados visto que a inibição da PI3K abole por completo o efeito do IGF-I.

O tratamento de células NIH-3T3 com PDGF 9 (fator de crescimento derivado de plaquetas) leva à direta associação da PKC- $\zeta$  com a proteína GTP-Ras que serve para recrutar a PKC- $\zeta$  à membrana plasmática. Dois produtos da fosforilação da PI3K, fosfatidilinositol -3,4-P<sub>2</sub> e fosfatidil inositol-3,4,5-P<sub>3</sub> são capazes de ativar a PKC  $\zeta$  mostrando que ela vem após a via da PI3K (Liu et al.,1998). Células HL-60 quando na presença de 10ng/mL de IGF-I exibem um aumento na proliferação de 2,5 vezes (Lui et al., 1997). Esse fator é capaz de promover a diferenciação dessas células em macrófagos induzida pela vitamina D<sub>3</sub>. Durante essa diferenciação o IGF-I é capaz de ativar tanto a PI3K quanto a PKC $\zeta$  (Liu et al., 1998).

Os miócitos ventriculares também são células que quando tratadas com IGF-I fazem com que a PKC $\alpha$  seja translocada, sendo essa requerida para regular a via da Raf-Ras-Erk (Pecherskaya and Solem, 2000). Em células cancerígenas também foi mostrada a importância da PKC. O IGF-I é capaz de induzir a expressão da Cox-2 em células cancerígenas de ovário humano. Esse aumento é mediado por 3 cascatas de sinalização

paralelas; a PI3K, MAPK, e a PKC (Cao et al., 2007) . Também foi mostrado que a PKC também está envolvida na proliferação induzida pela insulina. Tanto o IGF-I quanto a insulina são capazes de aumentar a proliferação de queratinócitos só que por mecanismos diferentes. A insulina induz a translocação da PKC $\delta$  do citosol para a membrana enquanto o IGF-I reduz os níveis de PKC $\delta$  na membrana e aumenta os níveis na porção citosólica, sendo que essa translocação independe da PI3K. Podemos ver que o IGF-I e a insulina podem causar o mesmo efeito nas células mas através de vias diferentes (Shen et al., 2001).

Um outro sistema no qual o IGF-I tem sua atividade relacionada com a PKC é em células da musculatura lisa vascular de porcine. Esse fator é capaz de regular quatro isoformas de PKC das sete encontradas nesse modelo experimental. A atividade da PKC é requerida para o IGF-I induzir a migração, síntese de DNA e expressão gênica nessas células. Esse efeito nesse caso também é independente da PI3K ou é uma via que vem abaixo da PKB/Akt (Yano et al., 1999).

Nossos resultados demonstram que o efeito do IGF-I foi bloqueado tanto pelo tratamento com o cloreto de queleritrina (inibidor seletivo das PKCs) como pela rottlerina (inibidor seletivo da PKC delta). Comparando estes resultados com os acima citados podemos constatar que também no nosso sistema a via da PKC desempenha um importante papel na

sinalização induzida pelo IGF-I. Pelos nossos resultados, a isoforma de PKC que está envolvida neste efeito é a PKC delta. Entretanto, não podemos descartar a participação de outras isoformas de PKC no nosso efeito.

Uma outra via envolvida na proliferação celular e bastante citada na literatura é a via da MAPK. No nosso trabalho, o bloqueio da via da MAPK inibiu o efeito do IGF-I na proliferação das células da retina. Na literatura encontramos vários trabalhos que demonstram a participação da via da MAPK no efeito do IGF. Em células SH-SY5Y o IGF-I aumenta o crescimento de neuritos de forma tempo e dose-dependente sendo que é necessária a fosforilação da ERK para que este fenômeno ocorra (Kim et al., 1997). Em adipócitos 3T3L1 o efeito do IGF-I no crescimento de neuritos também depende da fosforilação dessa via (Dalle et al., 2001).

A via da MEK também está envolvida na indução da proliferação pelo IGF-I em progenitores de oligodendrócitos. Nesse sistema foi visto que a fosforilação da ERK1/2 induzida pelo IGF-I é transiente. Em 5 minutos ocorre um pico de ativação e após 1h os níveis já retornam ao controle. Quando os autores utilizaram um bloqueador desta via o efeito proliferativo do IGF-I foi totalmente abolido, estabelecendo uma correlação entre a ativação desta enzima e a proliferação celular (Cui and Almazan, 2007).

Outra via importante que está envolvida no efeito do IGF-I é a via da JNK. O IGF-I é capaz de proteger linfócitos T e células Jurkat da morte induzida pelo Faz. Este efeito protetor se dá através da ativação das vias da PI3 cinase e da JNK (Walsh et al., 2002). Em nossa preparação a via da JNK também está envolvida no efeito do IGF-I. Estudos futuros serão realizados no intuito de compreender de que maneira as vias da MAPK e da JNK são ativadas pelo IGF-I em células da retina. Não podemos descartar um possível efeito trófico em nossa preparação pois ainda não avaliamos a sobrevida neuronal após o tratamento com IGF-I.

Em camundongos C57BL/6J, o IGF-I e o PACAP (polipeptídeo ativador da adenilil ciclase pituitária) aumentam a fosforilação de diferentes proteínas em neurônios. O IGF-I nesse sistema é capaz de transativar o receptor de PACAP do tipo 1 associado com o receptor de IGF do tipo 1, sendo esse efeito mediado por cinases da família da Src (Delcourt et al., 2007). Em pré-adipócitos do tipo 3T3-L1, o IGF-I também é capaz de aumentar a proliferação dessas células sendo esse efeito mediado por cinases da família Src (Boney et al., 2001). Em progenitores de oligodendrócitos, o IGF-I igualmente aumenta a proliferação de forma dependente da Src (Cui and Almazan, 2007). Nossos dados também mostram a participação das proteínas Src no efeito induzido pelo IGF-I. Entretanto ainda não nos é possível estabelecer em que ponto da via de sinalização esta proteína se torna ativa.

Em linhagens de células CHO foi mostrada a internalização do receptor de IGF do tipo 1 sendo que esse processo depende da Shc/MAP. Já a via da IRS-1 é ativada tanto pelos receptores presentes na superfície celular quanto pelos receptores endossomais (Chow et al., 1998). Experimentos realizados com linhagem de células gliais mostraram que a interação de ligantes com o seu receptor é capaz de levar a internalização do receptor de IGF do tipo 1 o qual medeia a fosforilação da Akt e que a reciclagem do receptor é sustentada pela fosforilação da Akt em progenitores gliais (Romanelli et al., 2007). Em nossa preparação o bloqueio da interiorização dos receptores de IGF pelo uso cadaverina inibiu o efeito do IGF-I. Este dado sugere que a via dependa da interiorização dos receptores para que possa ser plenamente ativada.

O processo de transativação do receptor de EGF pelo IGF-I também envolve a MEK. Em células de câncer de próstata DU145 o efeito do IGF-I depende da transativação do receptor de EGF e da ativação da via da ERK (Zhou et al., 2006). A transativação observada nas células vasculares da musculatura lisa induzida pelo IGF-I também necessita da participação da via da MEK (Meng et al., 2007). Quando analisamos o papel dos receptores de EGF no efeito do IGF-I em nossas culturas, observamos que de fato estes receptores participam da cascata de sinalização.

Um outro dado por nós observado foi a participação da metaloproteinase 9 no efeito do IGF-I. O IGF-I é capaz de ativar metaloproteinases que promovem a quebra do EGF presente na matriz extracelular associado à heparina (Molina-Muñoz et al., 2006). As metaloproteinases também exercem um importante papel na migração das células MCF-7. Esse fenômeno é induzido pelo IGF-I e é mediado pela atividade da metaloproteinase 9 na superfície celular e pela integrina  $\alpha_v\beta_5$  (Mira et al., 1998). Como em nossa preparação o efeito do IGF-I depende tanto da ativação dos receptores de EGF como da atividade da metaloproteinase 9, é possível que a ativação dos receptores de IGF leve à ativação de metaloproteinases que promoveriam a liberação do EGF ligado à matriz com conseqüente ativação dos receptores EGF.

Ao tratarmos as culturas com um inibidor dos receptores de IGF obtivemos um resultado que em muito nos surpreendeu. O bloqueio destes receptores induziu um grande aumento na proliferação das células da retina comparado com as culturas controle. Além disso, foi incapaz de inibir o efeito do IGF-I. A partir deste resultado nos perguntamos se o tratamento com IGF-I estaria modulando negativamente a resposta das células da retina a outros fatores tróficos presentes no meio. Nesta linha de raciocínio, o bloqueio desta via poderia potencializar o efeito proliferante.

Em nosso laboratório também analisamos os efeitos do EGF sobre a proliferação das células da retina. Dados ainda não publicados mostram que este fator trófico induz um aumento de 100% na proliferação das células da retina. Baseados nesses resultados decidimos verificar se o efeito do inibidor do receptor de IGF era mediado pela ativação dos receptores de EGF. Entretanto, o tratamento concomitante com o inibidor do receptor de IGF e do receptor de EGF não foi capaz de inibir o efeito do inibidor do receptor de IGF.

Dados da literatura mostram que o tratamento com IGF-I é capaz de regular a expressão de receptores TrkB em células nervosas (Mc Cusker et al., 2006). Anteriormente havíamos observado que o tratamento das células da retina com um inibidor seletivo dos receptores Trk induz um aumento de 100% na proliferação celular. Neste mesmo trabalho também demonstramos que o tratamento das culturas com BDNF induz uma diminuição de 50% na proliferação das células retinianas (Santos et al., 2003). Analisando este conjunto de resultados podemos aventar a hipótese do IGF-I induzir um efeito transiente na proliferação através da ativação dos receptores de EGF, mas ao mesmo tempo induzir um aumento na inserção de receptores Trk na membrana, o que controlaria a resposta proliferativa induzindo uma diferenciação. Como o efeito do IGF-I também foi inibido pelo tratamento com a brefeldina A, que bloqueia tanto a secreção vesicular de polipeptídeos como a inserção de receptores na membrana,

nossa hipótese parece ser plausível. Entretanto, precisaremos analisar se o tratamento com IGF-I aumenta a expressão de receptores Trk em células da retina mantidas em cultura; bem como se o IGF-I é capaz de aumentar a síntese e ou liberação de neurotrofinas. Também não podemos descartar a possibilidade do tratamento com IGF-I regular a resposta aos fatores tróficos indutores de proliferação como o EGF ou o FGF2 dentre outros.

Todo o nosso trabalho foi realizado com células da retina de animais neonatos. Neste estágio do desenvolvimento as células ganglionares, amácrinas e cones já saíram do período proliferativo. Por outro lado, precursores de células bipolares, bastonetes e células de Muller continuam proliferando (Cepko et al., 1996). Como o tratamento com IGF-I induz um aumento na proliferação celular, não podemos descartar sua ação sobre estas três populações, bem como não podemos excluir um efeito sobre células pluripotentes presentes na retina. Pretendemos, num breve futuro, caracterizar qual a população ou populações que são responsivas ao tratamento com IGF-I em nossa preparação.

## **6-Bibliografia:**

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. AND WALTER, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. United States of the America: Garland Science.1027-1062.

ADLER, R. (1993). Determination of cellular types in the retina. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 34:1677-1682.

AYLON, Y. AND OREN, M. (2007). Living with p53, dying of p53. Cell. 130:597-600.

BACH,L.A.; HEADEY,S.J. AND NORTON,R.S. (2005). IGF-binding proteins- the pieces are falling into place. Trends Endocrinology and Metabolism. 16:228-234.

BATEMAN, J. M. AND NEILL,H. (2006) Insulin/IGF signaling in neurogenesis. Cellular and Molecular Life Sciences. 63:1701-1705.

BERGMAN, P.B., MORAVSKI, C. J., EDMONDSON,S. R., RUSSO,V. C., BACH, L. A., WILKINSON-BERKA, J.L. AND WERTHER,G.A. (2004).

Expression of IGF system in normal and diabetic transgenic (mRen-2) 27 rat eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 46:2708-2715.

BONEY, C. M., SEKIMOTO, H., GRUPPUSO, P. A. AND FRACKELTON, JR. A. R. (2001). Src family tyrosine kinases participate in insulin-like growth factor I mitogenic signaling in 3T3-L1 cells. *Cell Growth & Differentiation*. 12:379-386.

BONDY, C. A. AND CHENG, C. M. (2004). Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *European Journal of Pharmacology*. 490:25-31.

BURREN, C. P., BERKA, J. L., EDMONDSON, S. R., WERTHER, G. A. AND BATCH, J. A. (1996). Localization of mRNAs for insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), IGF-I receptors, and IGF Binding Proteins in Rat Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 37:1459-1468.

CALVARUSO, G., VENTO, R., GIULIANO, M., LAURICELLA, M., GERBINO, E. AND TESORIERE, G. (1996). Insulin-Like growth factors in chick embryo retina during development. *Regulatory Peptides*. 61:p19-25.

CAO, W., LI, F., STEINBERG, R. H. AND LAVAIL, M. M. (2001). Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF,

bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. *Experimental Eye Research*. 72:591-604.

CAO, Z., LIU, L., DIXON, D. A, ZHENG, J. Z., CHANDRAN, B. AND JIANG, B. (2007). Insulin-Like Growth factor-I induces cyclooxygenase-2 expression via PI3K, MAPK and PKC signaling pathways in human ovarian cancer cells. *Cellular Signaling*. 19:1542-1553

CEPKO, C .L. (1993). Retinal cell fate determination. *Progress in Retinal and Eye Research*. 12:1-12.

CHESIK, 2004. [dissertations.ub.rug.nl/faculties/medicine](http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/medicine).

CHESIK, D., DE KEYSER, J. AND WILCZAK, N. (2007). Insulin-like growth factor-binding protein-2 as regulator of IGF actions in CNS: Implications in multiple sclerosis. *Cytokine & Growth Factors Reviews*. 18: 267-278.

CHESIK, D. (2004) Insulin-like growth factor system in glial cells. [Dissertations.ub.rug.nl/faculties/medicine](http://Dissertations.ub.rug.nl/faculties/medicine).

CHOW, J. C., CONDORELLI, G. AND SMITH, R. J. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor internalization regulates signaling via the

Shc/Mitogen-activated protein kinase pathway, but not the insulin receptor substrate-1 pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 20:4672-4680.

CUI, Q. AND ALMAZAN, G. (2007). IGF-I induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. *Journal of Neurochemistry*. 100:1480-1493

DALLE, S., RICKETTS, W., IMAMURA, T. AND VOLLENWEIDER, P. (2001) Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. *Journal of Biological Chemistry*. 11:15688-15695.

DELCOURT, N., THOUVENOT, E., CHANRION, B., GALÉOTTI, N., JOUIN, P., BOCKAERT, J. AND MARIN, P. (2007). PACAP type receptor I transactivation is essential for IGF-I receptor signaling and antiapoptotic activity in neurons. *The EMBO Journal*. 26:1542-1551.

DICICCO-BLOM, E. AND BLACK, I. B. (1988) Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85:4066-4070.

DOWLING, J. E. (1991). Retina. Encyclopedia of Human Biology. 6:615-631.

Duan, C. AND Xu, Q. (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. General and Comparative Endocrinology. 14:44-52.

FRADE, J. M., MARTI, E., BOVOLENTA, P., RODRIGUEZ-PENA, M. A, PÉREZ-GARCIA, D., ROHRER, H., EDGAR, D. AND RODRÍGUEZ-TÉBAR, A. (1996). Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the  $\alpha 6$  integrin subunit. Development. 122:2497-2506.

GAMMELTOFT, S., HASELBACHER, G. K., HUMBEL, R. E., FEHLMANN, M. AND VAN OBBERGHEN, E. (1985). Two types of receptor for Insulin-like growth factors in mammalian brain. The EMBO Journal. 4:3407-3412.

GIACINTI, C. AND GIORDANO, A. (2006). RB and cell cycle progression. Oncogene. 25:5220-5227.

GIORGETTI, S., BALLOTTI, R., KOWALSKI-CHAUVEL, A., TARTARE, S. AND OBBERGHEN, E. V. (1993). The insulin and insulin-like growth factor-I

receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. 268:7358-7364.

GOLIAS, C. H., CHARALABOPOULOS, A. AND CHARALABOPOLOS, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International Journal Clinical Practice*. 58:1134-1141.

GUILARDUCCI-FERRAZ, C. V., DA SILVA , G. M., TORRES, P. M., DOS SANTOS, A AND ARAUJO, E. G. (2007). The increase in retinal cells proliferation induced FGF2 is mediated by tyrosine and PI3K. *Neurochemistry Research* in press.

HEANEY, M. L. AND GOLDE, D. W. (1993). Soluble hormones receptors. *Blood*. 82:1945-1948.

IKEDA, T. ,WALDIBILLIG, R. J. AND PURO,D. G. (1995). Truncation of IGF-I yields two mitogens for retinal Müller glial cells. *Brain Research*. 686:87-92.

IKEDA, T. AND PURO, D. G. (1995). Regulation of retinal glial cell proliferation by antiproliferative molecules. *Experimental Eye Research*. 60:435-443.

IP, N. AND YANCOPOULOS, G. D. (1994). Neurotrophic factors and their receptors. *Annals of Neurology*. 35:513-516.

JONES, J. I. AND CLEMMONS, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Review*. 16:3-33.

KERMER, P., KLÖCKER, N., LABES, M. AND BÄHR, M. (2000). Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of Caspase-3 in vivo. *The Journal of Neuroscience*. 20:722-728

KIM. B., LEVENTHAL, P. S., SALTIEL, A. R. AND FELDMAN, E. L.(1997). Insulin-like growth factor-I mediated neurite outgrowth in vitro requires mitogen-activated protein kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:21268-21273.

KING, J. L. AND GUIRDY, C. (2004). Insulin-like growth factor-binding proteins modulate Müller cell responses to insulin-like growth factors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 45:2848-2855.

KING, J. L. AND GUIRDY, C. (2004). Müller cell production of insulin-like growth factor-binding proteins in vitro: Modulation with phenotype and

growth factor stimulation. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 45: 4535-4542.

KORSHING, S. (1993). The neurotrophic factor concept: a reexamination. Journal of Neuroscience. 13:2739-2748.

KURMASHEVA, R. T. AND HOUGHTON, P. J. (2006). IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. Biochimica et Biophysica Acta. 1766:1-22 .

De LACOPA, M. G., ALARCÓN, C., DE LA ROSA, E. J. AND DE PABLO, F. (1999). Insulin/ insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. Endocrinology. 140:233-243.

LIU, Q., NING, W., DANTZER, R., FREUND, G. G. AND KELLEY, W. K. (1998). Activation of protein kinase C- $\zeta$  and phosphatidylinositol 3'-Kinase and promotion of macrophage differentiation by insulin like growth factor-I. The Journal of Immunology. 160:1393-1401.

MAILE, L. A AND HOLLY, J. M. (1999). Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation.

Growth Hormone & IGF Research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society. 9:85-95.

McCUSKER, R. H., McCREA, K., ZUNICH, S., DANTZER, R., BROUSSARD, S.R., JOHNSON, R. W. AND KELLEY, K. W. (2006). Insulin like growth factor-I enhances the biological activity of brain derived neurotrophic factor on cerebrocortical neurons. The Journal of Neuroscience. 179:186-190.

MENG, D., SHI, X., JIANG, B. H. AND FANG, J. (2007). Insulin-Like Growth factor-I (IGF1) induces epidermal growth factor receptor transactivation and cell proliferation through reactive oxygen species. Free Radical Biology & Medicine. 42:1651-1660.

MIRA, E., MAÑES, S., LACALLE, R. A., MÁRQUEZ, G. AND MARTÍNEZ-A, C. (1999). Insulin-like growth factor I-triggered cell migration and invasion are mediated by matrix metalloproteinase-9. Endocrinology. 140:1657-1664.

MODANLOU, H. D., GHARRAE, Z., HASAN, J., WALTZMAN, J., NAGEOTTE, S., AND BEBARRY, K. D. A. (2005) Ontogeny of VEGF, IGF-I, and GH in neonatal rat serum, vitreous fluid, and retina from birth to weaning. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 47:738-744.

MOHAN, S. AND BAYLINK, D. J. (2002). IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and –independent mechanisms. *The Journal of Endocrinology*. 175:19-31.

MOLINA-MUNÓZ, T., ROMERO-ÁVILA, M. T. AND GARCÁ-SÁINZ. (2006). Insulin-Like Growth Factor-I induces  $\alpha_{1B}$ -Adrenergic receptor phosphorylation through  $G\beta\gamma$  and epidermal growth factor receptor transactivation. *Molecular Endocrinology*. 11:2773-2783.

MORIARTY,P., BOULTON,M., DICKSON,A. AND Mc LEOD,D. (1994). Production of IGF-I and IGF binding proteins by retinal cells in vitro. *The British Journal of Ophthalmology*. 78:638-642.

OBBERGHEN, E. V., BARON, V., DELAHAYDE, L., MANUELLI, B., FILIPPA, N. GIORGETTI-PERALDI, S., LEBRUN, P., MOTHE-SATNEY, I., PERALDI, P., ROCCHI, S., SAWKA-VERHELLE, D., TARTARE-DECKERT, S. AND GIUDICELLI, J. (2001). Surfing the insulin signaling web. *European Journal of Clinical Investigation*. 31:966-977.

DE PABLO, F. AND DE LA ROSA, J. (1995). The Developing CNS: scenario for the action of pro-insulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends in Neuroscience*. 18:143-150.

PECHERSKAYA, A AND SOLEM, M. (2000). IGF-I activates PKC  $\alpha$ -dependent protein synthesis in adult rat cardiomyocytes. *Molecular Cell Biology Research Communications* : MCBRC. 4:166-171.

POLITI, L. E., ROTSTEIN, N. P., SALVADOR, G., GIUSTO, M. N. AND INSUA, M. F.(2001). Insulin-like growth factor-I is a potential trophic factor for amacrine cells. *Journal of Neurochemistry*. 76:1199-1211.

RAJARAM, S., BAYLINK, D. J. AND MOHAN, S. (1997). Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: Regulation and functions. *Endocrine Reviews*. 18:801-831.

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

REHEN, S. K. *Ciclo Celular in: A Célula 2001*, Ed. Manole.

RINDERKNECHT, E. AND HUMBEL, R. E. (1978). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *Febs Letters*. 89:283-286.

ROMANELLI, R. J., LeBEAU, A. P., FULMER, C. G., LAZZARINO, D. A., HOCHBERG, A. AND WOO, T. L. T . (2007) IGF type-I receptor internalization and recycling mediate the sustained phosphorylation of AKT. *The Journal of Biological Chemistry*. 282:225113-225124.

ROSE-JOHN, S. AND HEINRICH, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *The Journal of Biochemistry*. 300:281-290.

RUSSO, V. C., GLUCKMAN, P. D., FELDMAN, E. L. AND WHERTHER, G. A. (2005). The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocrinology Reviews*. 26: 916-943.

SÁNCHEZ, I. AND DYNLACHT, D. (2005). News insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Cell & Development Biology*. 16:311-321.

SANTOS, A. A. , MEDINA, S. V., SHOLL-FRANCO, A, de ARAUJO, E. G. (2003). PMA decreases the proliferation of retinal cells in vitro: the involvement of acetylcholine and BDNF. *Neurochemistry International*. 42:73-80.

SHEN, S., ALT, A., WERTHEIMER, E., GARTSBEIN, M., KUROKI, T., OHBA, M., BRAIMAN, L., SAMPSON, S. R. AND TENNENBAM, T. (2001). A divergence point in the signaling of Insulin and IGF-I induced proliferation of skin keratinocytes. *Diabetes*. 50:255-264.

WALSH, P. T., SMITH, L.M. AND O'CONDOR, R. (2002). Insulin-like growth factor-1 activates Akt and Jun N-terminal kinases (JNKs) in promoting the survival of T lymphocytes. *Immunology*. 107:461-471.

[WWW.BIOCHEM.SZOTEU.U-SZEGED.HU/ASTROJAN/PRO2T.HTM](http://WWW.BIOCHEM.SZOTEU.U-SZEGED.HU/ASTROJAN/PRO2T.HTM)

YANO, K., BAUCHAT, J. R., LIMATTA, M. B., CLEMMONS, D. R. AND DUAN, C. (1999). Down-regulation of protein kinase C inhibits Insulin-like growth factor I-induced vascular smooth muscle cell proliferation, migration and gene expression. *Endocrinology*. 140:4622-4632.

ZHOU, Q., MENG, D., YAN, B., JIANG, B. AND FANG, J. (2006). Transactivation of epidermal growth factor receptor by Insulin-Like growth factor-1 requires basal hydrogen peroxide. *FEBS Letters*. 580:5161-5166.

# 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](#)