

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

LEANDRO DE ARAÚJO MARTINS

**EXPRESSÃO E AÇÕES DA IL-4 NO
TECIDO RETINIANO DE RATOS: VIAS
DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS**

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

Orientador(a): Elizabeth Giestal de Araujo



**NITERÓI
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LEANDRO DE ARAÚJO MARTINS

**EXPRESSÃO E AÇÕES DA IL-4 NO TECIDO RETINIANO DE RATOS:
VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS.** Trabalho desenvolvido no
Laboratório de Cultura de Tecidos Hertha Meyer do Departamento de
Neurobiologia, Instituto de Biologia – UFF

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

Orientadora: Elizabeth Giestal de Araujo

**NITERÓI
2009**

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais retornará ao seu tamanho original."
"Não tentes ser bem-sucedido, tenta antes ser um homem de valor."
"Se os fatos não se encaixam na teoria, modifique os fatos."

Albert Einstein.

LEANDRO DE ARAÚJO MARTINS
EXPRESSÃO E AÇÕES DA IL-4 NO TECIDO RETINIANO
DE RATOS: VIAS DE SINALIZAÇÃO

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

Aprovada em fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Roberto Leão Ferreira
UFF

Dr. Marcelo Cossenza Pettezzoni de Almeida
UFF

Dr. Raphael do Carmo Valente
UFRJ

REVISOR E SUPLENTE

Dra. Aline Araujo dos Santos
UFF

NITERÓI
2009

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são sempre interessantes! São a fonte de nosso carinho e determinação, aquilo que nos faz, que nos guia e nos une. Agradeço primeiramente a Deus. Ao estudar a vida, descobrimos ser impossível que uma força extremamente inteligente não seja a criadora desse aparato, é tudo perfeito!

Aos meus avós, por serem uma base sólida, meus segundos pais, meus eternos amigos, sou grato por tudo o que vocês fizeram (e fazem) por mim. Essa conquista é de vocês, eu os amo muito!

Aos meus pais, vocês me tornaram forte e decidido. Aprendemos muito uns com os outros. A criação que vocês me deram, servirá como exemplo para meus filhos! Acho que em toda a minha vida, nunca vi duas pessoas tão sorridentes, tão quistas. Só espero ter me espelhado o máximo em vocês! Amo muito os dois!

Adriano e Brunno, meus queridos irmãos! Obrigado pelas risadas, pela companhia e amizade! Dizem que família a gente não escolhe, mas se escolhêssemos eu os escolheria de novo! Amo vocês!

Existem amigos que vem e passam, alguns ficam um tempo, outras amizades duram para sempre, Marcella, Thaís, Tati, Maurício, Felipe, Léo, muito obrigado pela amizade e pelas boas risadas! Vocês são demais!

Aos grandes amigos do laboratório, Docinho, Babu, Karinne, Xeila, Raphael (Fafá), Thaís (Thathá), Raphael (Bebê), Sarah, outro Rafael, Gabi, Lucienne, Simone e Cavalão, o “lendável” da “drogagem” (Babu, 2009).

À Mãe-íne que com muita paciência me ensinou a técnica de Western blot e abriu caminho para realização deste trabalho.

À minha orientadora (Professora Doutora Eliza) Beth, que me buscou “do nada” e apostou em mim. Tenho certeza que a entrada em seu laboratório foi a melhor coisa que aconteceu em minha vida de estudante! Muito obrigado pelo apoio, e por me aturar!

Ao professor Alexandre, pela esterilização dos materiais, Alecsandro pelo cuidado com os animais e “seu” Bernardino pelo apoio técnico.

Buscar os sonhos é algo possível, mas ninguém pode buscar o amor. Ele te escolhe! O meu caso foi assim, conheci uma menina e a vi se tornar a mulher da minha vida! Dani, passar os dias contigo tornam o mundo um sonho infinito. Eu te amo!

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A retina.....	1
1.2 Morte Celular.....	5
1.3 Células Ganglionares da Retina.....	13
1.4 Citocinas.....	18
1.5 Histórico e Característica Molecular da IL-4.....	21
1.6 Perfil Filogenético da Molécula de IL-4.....	23
1.7 Receptor de IL-4.....	24
1.8 Sinalização da IL-4.....	26
1.9 Ações Gerais da IL-4.....	30
1.10 Interação da IL-4 com Outras Moléculas.....	31
1.11 IL-4 e suas Funções no Sistema Nervoso Central.....	34
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivos Gerais.....	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Materiais.....	39
3.2 Cultura de células da retina.....	39
3.3 Estimulação do Tecido.....	41
3.4 Análise da Expressão de IL-4 no Tecido Pós-natal (Extração de Proteínas do Tecido Pós-natal).....	42
3.5 Injeção de Peroxidase nos Colículos Superiores.....	42
3.5.1 Injeção de Peroxidase e Fixação do Controle de 4 Horas.....	42
3.5.2 Tratamento com IL-4.....	43
3.5.3 Fixação das Culturas para Revelação da Peroxidase.....	43
3.5.4 Revelação da Peroxidase.....	44
3.5.5 Avaliação do Número de Células Ganglionares.....	44
3.6 Western Blot.....	44
3.6.1 Dosagem de Proteínas.....	44
3.6.2 Géis de Poliacrilamida.....	45
3.6.3 Transferência de Proteínas do gel para Membrana de PVDF (Polivinylidene Difluoride).....	46
3.6.4 Bloqueio e Imunodeteção.....	47
3.6.5 Revelação.....	47
3.6.6 Análise Estatística dos Resultados.....	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1 O Efeito Protetor da IL-4 é Mediado pela ativação da PKA.....	49
4.2 Sub-concentrações de IL-4 e Forskolina são Capazes de Aumentar a Sobrevida das Células Ganglionares da Retina de Ratos Neonatos.....	50
4.3 Estimulação por IL-4 é Capaz de Aumentar a Fosforilação da CREB.....	51
4.4 Estimulação por IL-4 é Capaz de Aumentar a Fosforilação da MAPK.....	53
4.5 A Fosforilação de MAPK é Dependente de AMPc.....	54
4.6 A Expressão de p-MAPK Aumenta Durante o Desenvolvimento pós natal.....	56
4.7 Expressão de IL-4 entre P0 e P4.....	57
4.8 A Expressão de IL-4 Aumenta Durante o Desenvolvimento.....	59
5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIF:** fator indutor de apoptose
- AMPc:** 3`5`-adenosina monofosfato cíclico
- Anti-IgM:** Anti- imunoglobulina M
- Bcl-2:** Proteína do linfoma de célula B -2
- BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro
- Ca⁺²:** íon Cálcio
- CD23:** Receptor de IgE
- CD25:** Receptor de IL-2
- cDNA:** DNA complementar
- CGR:** células ganglionares da retina
- CMF:** solução salina sem cálcio e magnésio
- CNTF:** fator neurotrófico do gânglio ciliar
- CO₂:** dióxido de carbono
- Complexo SET:** complexo de proteína de 270 a 420kDa
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- E:** Dia do desenvolvimento embrionário
- EndoG:** endonuclease G
- EPO:** eritropoetina
- EPOR -** receptor da eritropoetina
- ERK1/2:** cinase regulada por sinais extracelulares
- FCS:** soro fetal bovino
- FGFb ou FGF-2:** fator de crescimento de fibroblasto básico
- GABA -** Ácido γ-aminobutírico
- G-CFS:** fator de estimulação de colônia de granulócitos humanos
- GFAP -** Proteína fibrilar ácida glial
- GM-CSF:** fator estimulante de colônia macrófago e granulócito
- GRB-2:** fator de crescimento ligado ao receptor 2
- IAP:** proteína inibidora da apoptose
- IFN-γ:** Interferon gama
- IgE:** imunoglobulina E
- IGF-1:** fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1: interleucina-1
IL-1- β : interleucina 1- β
IL-2: interleucina-2
IL-3: interleucina-3
IL-4: interleucina-4
IL-4R α : subunidade α do receptor de IL-4
IL-5: interleucina-5
IL-6: interleucina-6
IL-8: interleucina-8
IL-10: interleucina-10
IL-13: interleucina-13
IRS-2 - Substrato do receptor de insulina-2
Jak: janus cinase
L-DNase II: inibidor de elastase leucocítica DNase
LIF: fator inibidor de leucemia
LPS: Lipopolissacarídeos
M1: Receptores muscarínicos tipo 1
MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno
MEK: cinase ativadora da MAP cinase
Mg⁺²: íon Magnésio
MHC: complexo de histocompatibilidade principal
NGF: fator de crescimento do nervo
NK: natural killer
NRE-BP: Proteína de ligação do elemento de regulação negativa
NT- 4/5: Neurotrofina -4/5
P: Dia do desenvolvimento pós-natal
p53: gen supressor de tumores
PI3: inositol-3 fosfato
PI3K: cinase do fosfatidilinositol na posição 3
PKA: proteína cinase A
PKC: proteína cinase C
PMA: acetato de forbol miristato
Ras: proteína de sarcoma de rato
SNC: Sistema nervoso central

Sh2: domínio de homologia src

SOCS: supressores da sinalização da citocina

Src: família de proteínas cinases nomeada a partir do produto do genev-src do vírus do sarcoma Rous na retina de galinha.

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

TGF- β : fator de transformação de crescimento β

TMB: tetrametilbenzidina

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

Trk: cinase relacionada à tropomiosina

LISTA DE FIGURAS

Pag.

Figura 1. Esquema representativo da retina em diferentes etapas do desenvolvimento.....	4
Figura 2. Receptores e proteínas envolvidas no fenômeno da apoptose.....	10
Figura 3. Diferentes vias de ativação e controle da apoptose.....	12
Figura 4. Estrutura tridimensional da molécula de IL-4 humana.....	22
Figura 5. Perfil filogenético da IL-4.....	24
Figura 6. Receptores para IL-4.....	26
Figura 7. Vias de sinalização da IL-4.....	29
Figura 8. Ativação de células T naíves e interação de citocinas anti- e pró-inflamatórias.....	33
Figura 9. Efeito da forskolina na sobrevivência das células ganglionares.....	36
Figura 10. Efeito da IL-4 na sobrevivência das células ganglionares.....	37
Figura 11. Efeito da IL-4 na presença do inibidor da PKA.....	49
Figura 12. Efeitos de subconcentrações de forskolina (5µM) e IL-4 (0,5U/mL).....	50
Figura 13. Efeito da IL-4 na estimulação da CREB fosforilada com 4 dias pós-natais.....	51
Figura 14. A estimulação com IL-4 é capaz de aumentar a fosforilação de MAPK.....	53
Figura 15. Forskolina é capaz de aumentar a fosforilação de MAPK.....	55
Figura 16. Expressão de p-MAPK ao longo do desenvolvimento pós-natal.....	56
Figura 17. Expressão de IL-4 em retinas de ratos neonatos.....	58
Figura 18. A expressão de IL-4 em retina de ratos aumenta com a idade.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas da via extrínseca, abreviaturas e nomenclatura alternativa.....	11
Tabela 2. As diferentes citocinas e suas ações.....	20

RESUMO

A interleucina 4 é uma molécula pleiotrópica cujos efeitos já são bem conhecidos no sistema imune. Inicialmente foi descrita como um fator estimulante das células B (BSF-1), por seus efeitos nestes tipos celulares. Esta molécula pertence à família das citocinas (as interleucinas) que tem como característica ter um pequeno peso molecular (14,9 kDa) e se liga diretamente ao receptor de IL-4. Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram que esta citocina aumenta a sobrevivência das células ganglionares de rato in vitro, e que este efeito é mediado pela ativação de receptores muscarínicos do tipo M1. Neste trabalho, nós investigamos o papel deste Segundo mensageiro, o AMPc, no efeito da IL-4. Nós observamos um aumento na expressão de IL-4 a partir de P15 e que se mantém ao longo da vida adulta. Estimulação de retinas por 15 min com IL-4 e forskolina foi capaz de aumentar a fosforilação de MAPK e CREB. Este trabalho também demonstrou que a expressão de IL-4 aumenta ao longo do desenvolvimento pós-natal, possivelmente um efeito neuroprotetor.

ABSTRACT

Interleukin-4, initially described as a B-cell Stimulating Factor (BSF-1), is a pleiotropic cytokine and its effects are already well known in the immune system. Concerning the nervous system, during the last decades, it was demonstrated that IL-4 plays a neuroprotective role in this system. Interleukin 4 is a small protein (14,9 kDa) and its biological effects are mediated by IL-4 receptors. Previous studies from our group showed that this cytokine is able to increase retinal ganglion cell survival in vitro. This effect is mediated by the activation of muscarinic receptor (M1). In this present work we investigated the role of the second messenger AMPc in the IL-4 effect. Our data show that the effect of IL-4 in retinal ganglion cell survival depends on the increase in the cAMP levels. The expression of IL-4 in intact retinas during the post natal development was also analyzed. Our results show that at post natal 15 the maximum levels of this protein were obtained and the expression is maintained high during the adult life. Treatment of retinas with IL-4 for 15 min induces an increase in the phosphorylation of CREB and MAPK. Taken together our results suggest an important role for IL-4 during the development of the retinal cells.

1.INTRODUÇÃO

1.1 A retina

A retina, à semelhança das demais estruturas do sistema nervoso central, é uma estrutura organizada em múltiplas camadas de corpos celulares e de processos sinápticos. No tecido adulto é possível identificar as células que a compõem através da localização, das características estruturais, das propriedades bioquímicas e das características funcionais (Farber and Adler, 1986).

O tecido retiniano é translúcido e possui uma localização privilegiada (fora da caixa craniana) o que facilita em muito sua obtenção para a realização de diferentes tipos de experiências. Quando se isola este tecido sabemos que temos uma população formada de células da retina e que não temos outras populações de células de outras estruturas do sistema nervoso. Além disso, a retina possui uma circuitaria de neurotransmissores e de citocinas muito elaborada que a coloca na posição de um excelente modelo experimental para o estudo do desenvolvimento, da diferenciação e da fisiologia de células do sistema nervoso central, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Dowling, 1991). Acrescente-se a isso o fato da relação entre a retina e seus alvos centrais de projeção estar amplamente documentada, tanto em animais adultos quanto em desenvolvimento (Carter et al., 1991).

Em ratos neonatos a retina se apresenta ainda numa fase de proliferação e de diferenciação. Neste período é possível observar uma extensa neurogênese sendo que apenas os precursores das células ganglionares, amácrinas e dos cones já saíram do ciclo proliferativo. Dados da literatura demonstram que diversos fatores, como EGF, BDNF, FGF entre outros, são responsáveis pelo controle tanto da proliferação como da diferenciação de células da retina (Cepko, 1993). Na fase madura, este tecido apresenta uma organização em múltiplas camadas de corpos celulares (camadas nucleares) e de comunicação sináptica (camadas plexiformes) (figura 1).

Podemos, no tecido maduro, identificar as seguintes camadas celulares (Cepko & Dyer, 2001, Bear et al., 2002):

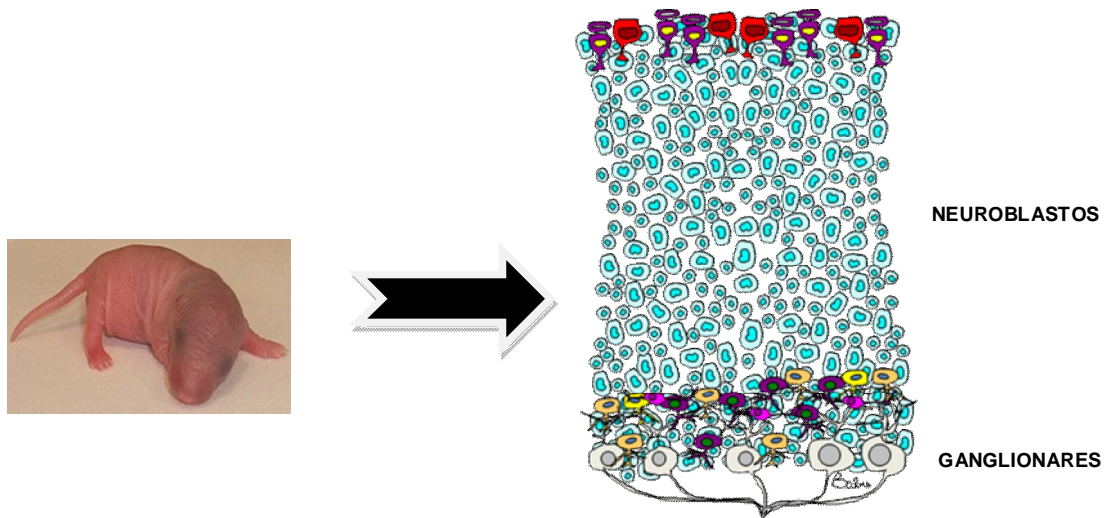
- **Camada nuclear externa (CNE)** – Estão localizados nesta área os corpos celulares dos fotorreceptores. Os segmentos externos destas células contém os elementos de transdução da retina (Faber & Adler, 1986 para revisão);
- **Camada plexiforme externa (CPE)** – Os prolongamentos dos fotorreceptores, células bipolares e células horizontais fazem conexões entre si nesta região;
- **Camada nuclear interna (CNI)** – Encontram-se os corpos celulares das bipolares, amácrinas, horizontais e de células ganglionares deslocadas;
- **Camada plexiforme interna (CPI)** – Local onde ocorrem as sinapses entre os prolongamentos das células bipolares, amácrinas e ganglionares;

- **Camada de células ganglionares (CCG)** – Encontram-se os corpos celulares das ganglionares e de amácrinas deslocadas.

Este tecido origina-se a partir do ectoderma neuronal, que no embrião originará as demais áreas cerebrais. Embora tenha os mesmos tipos de elementos funcionais e neurotransmissores encontrados em outras áreas do SNC, a retina apresenta em sua composição 5 classes neuronais e, em geral, apenas um tipo de célula glial, a célula de Müller. Oligodendrócitos estão completamente ausentes na retina da maioria das espécies e os astrócitos estão presentes apenas nas camadas de fibras do nervo óptico de mamíferos (Newman & Reichenbach, 1996).

A gênese do tecido retiniano é controlada por fatores mitóticos e por fatores de diferenciação. Os estudos da neurogênese da retina de ratos demonstram que a população de células ganglionares é sempre a primeira a ser gerada, entre E14 e E20 (Reese & Colello, 1992). As células amácrinas têm seu aparecimento entre E14 e P0. As células bipolares e os bastonetes surgem entre E20 e P13. As células de Müller, por sua vez, são geradas entre E20 e P13. A população de células horizontais se forma entre E16 e E18 e por fim surgem os cones entre E15 e P0 (Cepko, 1993).

A



B

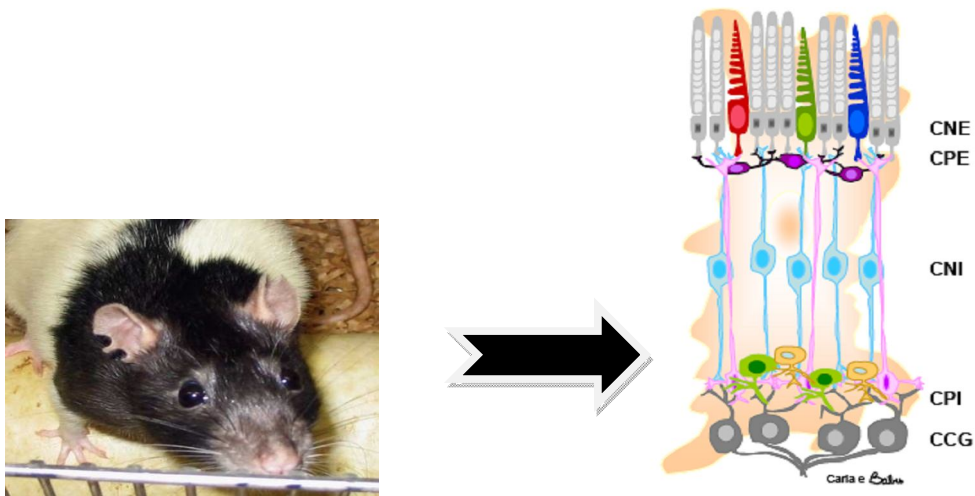


Figura 1. Esquema representativo da retina em diferentes etapas do desenvolvimento. Na parte superior da figura (A), observa-se um animal P0 e um esquema de sua retina. Podemos visualizar uma grande população de neuroblastos e apenas uma camada de células já formada, a camada de células ganglionares. Na parte inferior (B), observá-se uma fotografia de um animal adulto e o esquema da retina já totalmente formada exibindo uma estratificação em camadas: CNE (camada nuclear externa); CPE (camada plexiforme externa), CNI (camada nuclear interna), CPI (camada plexiforme interna), CCG (camada de células ganglionares).

1.2 Morte Celular

O processo de gênese dos tecidos compreende fenômenos de proliferação, de diferenciação e de morte celular (não obrigatoriamente nesta seqüência). Além disso, durante toda a vida adulta, a homeostasia deve ser mantida e dependendo do tecido estudado esses fenômenos podem naturalmente ocorrer. Por muitos anos, as pesquisas foram voltadas para o conhecimento dos mecanismos envolvidos tanto nos fenômenos de proliferação como de diferenciação e pouca atenção foi dada à análise dos processos envolvidos na morte celular. Talvez isso possa ser compreendido pela dificuldade da ciência da época aceitar que, durante o desenvolvimento, processos regressivos devessem ocorrer e que fossem de fundamental importância. Para nós os fenômenos regressivos são perfeitamente compreendidos no escopo do desenvolvimento, mas no início do século passado a realidade era outra (Oppenheim, 1999; Buss et al., 2006).

Apesar da morte celular programada durante o desenvolvimento ter sido descoberta em meados do século XIX, durante muitos anos foi deixada de lado e até mesmo negada. Em meados do século 20, o termo “morte celular programada” foi introduzido para se referir especificamente a morte celular durante o desenvolvimento. A morte celular é um fenômeno comum a todos os tecidos e aí se inclui o tecido nervoso. Existe na literatura um grupo de pesquisadores que acredita ser este tipo de morte o padrão celular de escolha e somente quando a sinalização do ambiente for adequada, essa degeneração será evitada (Zhivotovsky, 2004).

Até pouco tempo, pesquisadores pensavam que o fenômeno de morte celular programada tivesse uma relação direta com a multicelularidade observada tanto em plantas como animais. Nesse contexto, ela apresentaria uma função adaptativa que através de um mecanismo de defesa eliminasse células anormais que prejudicariam a sobrevivência do organismo. Em metazoários, essa explicação parece ser bem razoável, é uma hipótese adaptativa plausível. Porém, como considerar a morte celular em protozoários unicelulares e procariontes? A resposta a essa pergunta é simplesmente altruísmo (levando-se em conta a nossa visão do processo). Esses organismos normalmente vivem em colônias ou em comunidades composta de clones, e a morte de um indivíduo pode significar a manutenção da sobrevivência da espécie, por exemplo, em casos de escassez de nutrientes. A literatura demonstra que este fenômeno regressivo ocorre desde esponjas até cordados e em todos eles os eventos celulares característicos do processo são muito semelhantes (Buss et al., 2006).

A morte celular é a responsável pelo processo de crescimento em artrópodes modulando o fenômeno de muda, a redução da cauda dos girinos e o controle do tamanho de um órgão em mamíferos. O interesse neste fenômeno que vinha numa espiral ascendente, aumentou drasticamente principalmente após descoberta de genes pró- e anti-apoptóticos envolvidos na regulação deste processo (Buss et al., 2006).

Morte celular programada durante o desenvolvimento, pode ser definida como uma perda celular espécie-específica ou tecido-específica, reproduzível espacial e temporalmente, a qual tem papel importante para o desenvolvimento

normal. O estudo da morte natural no sistema nervoso foi extenso durante a década de 70 e início dos anos 80 (Cowan, 1979; Oppenheim, 1981; Hamburger & Oppenheim, 1982). No sistema nervoso os estímulos tróficos que levam a sobrevivência das células que o constituem, podem vir de células alvo, aferentes, gliais e também da própria célula através de um mecanismo de sinalização autócrina (Buss, et al., 2006). A pesquisa e o interesse acerca desse evento têm sido cada vez maiores, uma vez que está diretamente relacionado a fenômenos regressivos que ocorrem durante o seu desenvolvimento e a doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Oslo et al., 1994; Cowburn et al., 1996; Knusel & Gao, 1996; Mattson & Furukawa, 1996).

Já que os mecanismos de morte durante o desenvolvimento em condições fisiológicas e em alguns processos patológicos apresentam características comuns, hoje muitos pesquisadores usam o termo “morte celular programada” e “apoptose” como sinônimos (Zivotovsky, 2004). Porém, outros tipos de morte também podem ser citados, como a morte celular necrótica. Seus mecanismos são diferentes, apesar de poderem ser deflagrados por fatores similares. As diferenças entre necrose e apoptose não se baseiam apenas na morfologia, mas também nas mudanças bioquímicas que acontecem na célula. Enquanto na apoptose não há reação inflamatória facilmente identificada, na necrose, definida como uma morte passiva, há uma resposta inflamatória importante (Helewski et al., 2006).

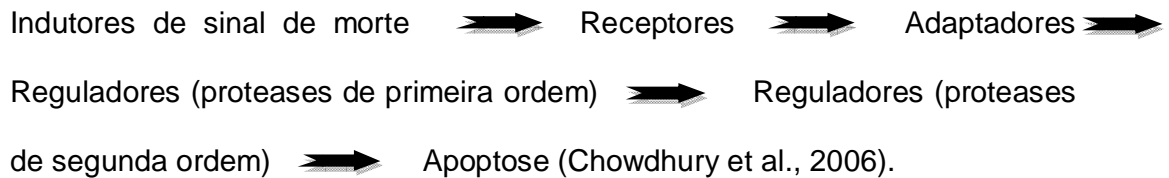
O termo apoptose (que já havia sido cunhado anteriormente) foi primeiramente usado por Kerr, Wyllie e Currie em 1972, para descrever uma

forma de morte celular morfológicamente distinta da necrose que já era bem caracterizada nesta época (Elmore, 2007, para revisão). Este estudo produziu evidências de que existiam pelo menos dois tipos distintos de morte celular: O primeiro tipo é conhecido como necrose, uma forma “violenta” e rápida de degeneração afetando uma extensa população celular, caracterizada por extravasamento do citoplasma, destruição de organelas e rompimento da membrana plasmática, levando a liberação do conteúdo intracelular e inflamação. O segundo tipo de morte, a apoptose, é a forma de morte celular programada mais estudada, e é caracterizada por uma variedade de aspectos morfológicos e bioquímicos, tais como condensação do núcleo e citoplasma, ativação de proteases (caspases) e nucleases, que respectivamente degradam proteínas celulares e DNA, e a fragmentação de células em corpúsculos apoptóticos que são rapidamente fagocitados pelas células vizinhas. Este mecanismo de defesa biologicamente conservado durante a evolução pode ser agrupado em quatro fases com sobreposição de alguns componentes (Domingos & Steller, 2007) como descrito a seguir:

- i. **O início ou fase inicial:** um estímulo provoca ou inicia a resposta apoptótica. Este pode ser um sinal externo mediado por receptores de superfície ou pode ser originado dentro da célula por ação de uma droga, toxina ou radiação;
- ii. **Fase de transdução do sinal:** A detecção de um sinal ou estágio metabólico e a transdução de qual via de sinalização que vai ativar a maquinaria de morte celular;
- iii. **A fase efetora:** Ativação de proteases e destruição coordenada da célula a semelhança de um mecanismo de implosão;

- iv. **A fase pós-morte**: A cromatina e o DNA celular são degradados. *In vivo* as células mortas são reconhecidas e englobadas por outras células.

Esta via pode ser resumida esquematicamente da seguinte forma:



A morte celular por apoptose pode ser observada em sua seqüência por microscopia. *In vitro* suas características incluem a diminuição do volume celular, convolução da superfície e formação de protuberâncias com “buddings”, e subsequente formação dos corpos apoptóticos. A formação das bolhas citoplasmáticas e a redução dos corpos apoptóticos devido à fagocitose por macrófagos são também rapidamente detectados através desta técnica (Kajta, 2004; Chowdhury et al., 2006; Elmore, 2007).

Por ser um processo fisiológico, a morte celular é bem regulada. Várias proteínas são responsáveis por essa regulação, dentre as principais, podemos destacar as caspases. As proteínas apoptóticas têm sua atividade altamente regulada e neste contexto destacam-se as proteínas inibidoras de apoptose referenciadas pela sigla vinda do inglês IAP (LeBlanc, 2003; Chowdhury et al., 2006). Outras famílias de proteínas que regulam este fenômeno merecem destaque como a da Bcl-2, do TNF e da p53 (Chowdhury et al., 2006) conforme podemos ver na figura 2.

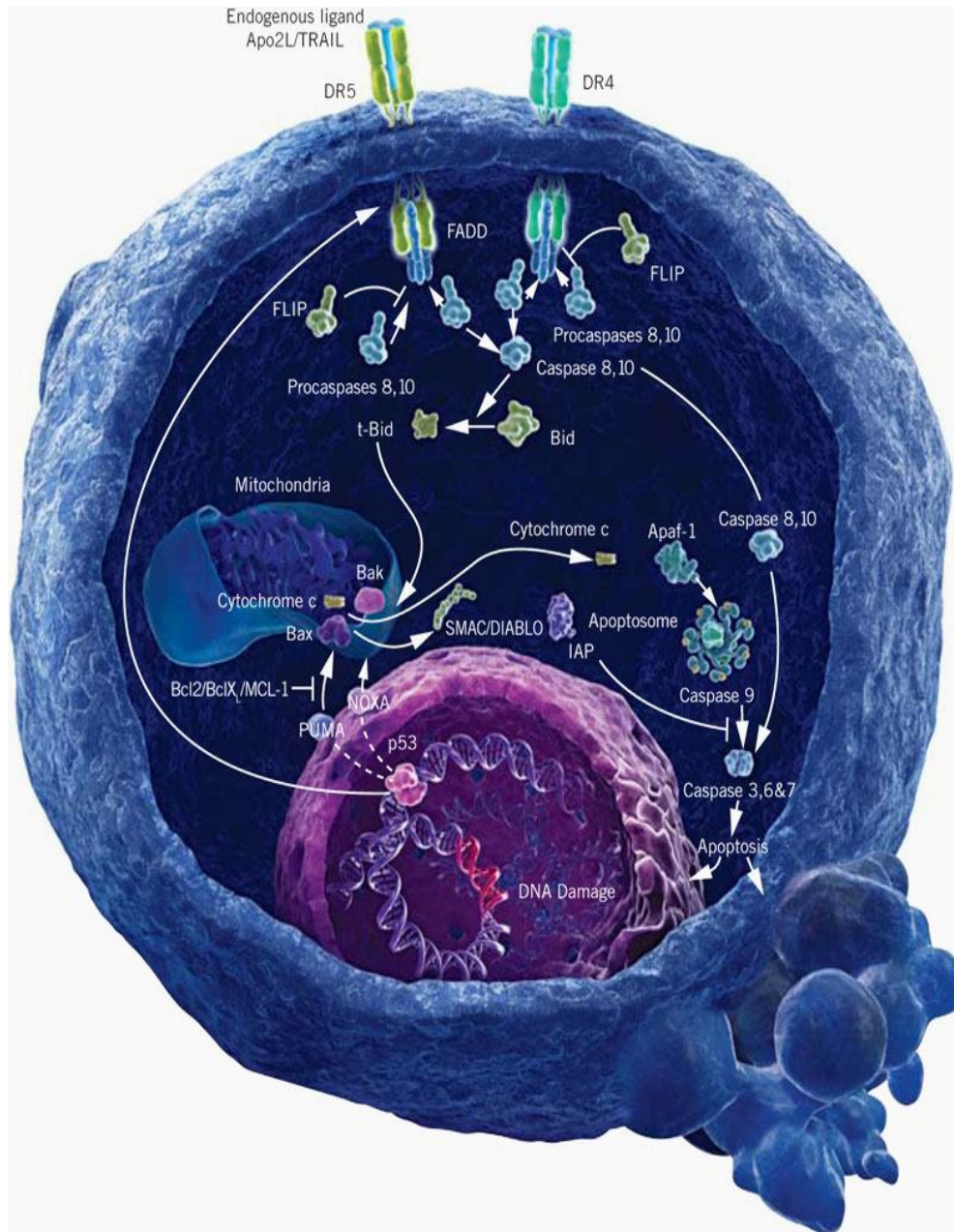


Figura 2. Receptores e proteínas envolvidas no fenômeno da apoptose. Podemos visualizar a participação de proteínas, organelas e núcleo neste processo degenerativo.

(<http://www.biooncology.com/bioonc/images/apoptosis-image-1g.jpg>).

Apoptose é um processo que pode ser ativado por vias extrínsecas (por meio de receptores de morte celular, ver tabela 1), por vias intrínsecas ativando

mudanças mitocondriais (por radiação, toxinas, hipóxia, etc.), por via de liberação de perforinas (células T citotóxicas) e por ativação do retículo endoplasmático (Elmore, 2007; Jeong & Seol, 2008). Há também vias que são independentes da ativação de caspases e envolvem proteínas como a AIF, EndoG e LDNAsell (Guimarães & Linden, 2004).

Uma vez estimulados por seus respectivos ligantes (tabela 2), os receptores de morte celular ativam adaptadores levando a ativação das caspases iniciadoras, como a caspase 8, que por sua vez ativa uma caspase executora, a caspase 3, levando às alterações morfológicas já descritas neste trabalho (Yaginuma et al., 2001; Elmore, 2007).

Através da via intrínseca (figura 3) ocorrem mudanças na mitocôndria, formação de apoptossomas, que levam a ativação de uma caspase iniciadora, a caspase 9. Esta por sua vez, ativa a executora, a caspase 3, levando à apoptose (Elmore, 2007).

Abbreviation	Protein Name	Select Alternate Nomenclature
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	TNF ligand, TNFA, cachectin
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1	TNF receptor, TNFRSF1A, p55 TNFR, CD120a
FasL	Fatty acid synthetase ligand	Fas ligand, TNFSF6, Apo1, apoptosis antigen ligand 1, CD95L, CD178, APT1LG1
FasR	Fatty acid synthetase receptor	Fas receptor, TNFRSF6, APT1, CD95
Apo3L	Apo3 ligand	TNFSF12, Apo3 ligand, TWEAK, DR3LG
DR3	Death receptor 3	TNFRSF12, Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD, DDR3
Apo2L	Apo2 ligand	TNFSF10, TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand
DR4	Death receptor 4	TNFRSF10A, TRAILR1, APO2
DR5	Death receptor 5	TNFRSF10B, TRAIL-R2, TRICK2, KILLER, ZTNFR9
FADD	Fas-associated death domain	MORT1
TRADD	TNF receptor-associated death domain	TNFRSF1A associated via death domain
RIP	Receptor-interacting protein	RIPK1
DED	Death effector domain	Apoptosis antagonizing transcription factor, CHE1
caspase-8	CysteinyI aspartic acid-protease 8	FLICE, FADD-like Ice, Mach-1, Mch5
c-FLIP	FLICE-inhibitory protein	Casper, I-FLICE, FLAME-1, CASH, CLARP, MRIT

Tabela 1. Proteínas da via extrínseca, abreviaturas e nomenclatura alternativa

(Retirado de Elmore, 2007).

Estimulação por perforinas leva à ativação de granzimas B ou A que podem ativar a caspase iniciadora 10 ou ao complexo SET, respectivamente. Uma vez ativa, a caspase 10 ativa a executora, a caspase 3, levando à apoptose. Já o complexo SET leva diretamente à clivagem do DNA, um caminho caspase independente (Linden & Guimarães, 2004; Elmore, 2007).

Nem todas as células respondem ao mesmo estímulo. Irradiação e drogas usadas no tratamento do câncer resultam em dano no DNA de algumas células as quais são levadas à morte apoptótica através de uma via dependente de p53. Alguns hormônios, tais como corticosteróides, podem provocar em algumas células, como os tímócitos, o aumento da apoptose espontânea, embora outras células não sejam afetadas (Elmore, 2007). Como existem várias vias de indução da apoptose é perfeitamente compreensível que haja diferenças nos mecanismos de indução desta resposta causando assim as diferenças entre as células.

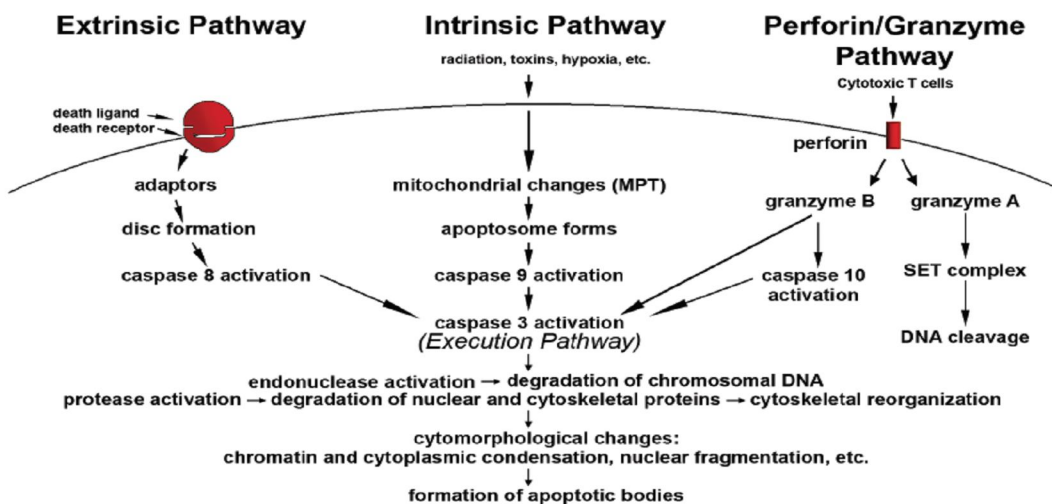


Figura 3. Diferentes vias de ativação e controle da apoptose

(Retirado de Elmore, 2007).

Um terceiro tipo de morte celular estudado é a autofagia. Este tipo de morte ocorre em muitos tipos de células eucarióticas. Durante esta morte, partes do citoplasma e de organelas intracelulares são seqüestradas em vacúolos autofágicos (denominados autofagossomas) e são direcionadas então, aos lisossomas para sua total degradação. A autofagia é um processo altamente regulado capaz de eliminar organelas danificadas, ou em excesso (Linden & Guimarães, 2004; Maiuri et al., 2007).

A autofagia tem sido descrita tanto como meio de resistir à escassez de nutrientes, quanto parte de um remodelamento durante a diferenciação, metamorfose, envelhecimento, transformação celular, mudanças fisiológicas em órgãos tais como, crescimento do útero durante a gravidez e atrofia após o nascimento do feto; bem como renovação de componentes anômalos que acumulam danos tóxicos (Linden & Guimarães, 2004).

No sistema nervoso, por exemplo, sinais morfológicos de autofagia são observados em processos fisiológicos, tais como renovação de segmentos externos dos fotorreceptores da retina pelo epitélio pigmentado (Reme et al., 1999).

1.3 Células Ganglionares da Retina

O período de morte celular natural das células ganglionares da retina (CGR) de ratos se dá entre P0 e P10, sendo que nos cinco primeiros dias pós-natais ocorre a maior taxa de morte (Linden & Perry, 1982). Entretanto, após axotomia 80% das CGR de ratos morrem, por apoptose, nas primeiras 24h (Rabacchi et

al., 1994). Logo, os estudos acerca dos fatores que controlam a sobrevivência das células ganglionares da retina de ratos em cultura, têm que levar em consideração o fato de que para a realização destas experiências as células ganglionares são obrigatoriamente axotomizadas.

Somente na década de 70 a primeira cultura de células da retina de mamífero foi obtida e assim começaram os estudos que analisaram a sobrevivência das células ganglionares *in vitro* (Linden et al, 2005 para revisão).

Já foi demonstrado que durante o desenvolvimento as CGR são dependentes de diferentes fatores tróficos. *In vitro* foi demonstrado o papel do BDNF em CGR de diferentes espécies. Já a NT-4 parece ser eficiente somente em células ganglionares de ratos (von Bartheld, 1998). Em culturas de células ganglionares purificadas foi observado que os níveis de AMPc regulam o efeito trófico de inúmeras citocinas tais como: BDNF, NT-4/5, CNTF, LIF, FGFb e TGF β (Meyer-Franke et al., 1995).

Células de Müller liberam fatores tróficos que aumentam a sobrevivência das células ganglionares de ratos neonatos em cultura (Raju & Bennett, 1986). Esses fatores poderiam agir durante o desenvolvimento e maturação da retina, bem como poderiam ser potentes agentes terapêuticos em doenças degenerativas e após lesão de nervo óptico (von Bartheld, 1998).

Em 1986, Lipton descreveu o efeito do bloqueio da atividade elétrica sobre a sobrevivência das células ganglionares da retina de ratos "in vitro". O seu trabalho demonstrou que quando a atividade elétrica era suprimida, havia um aumento da morte celular. Em 1990, Araujo e Linden demonstraram o efeito de meio condicionado, obtido a partir da manutenção de agregados de células

retinianas, na sobrevivência das células ganglionares mantidas em cultura de monocamada. Os autores observaram que a presença do meio condicionado aumentava significativamente a sobrevivência das células ganglionares “in vitro”. Os dados obtidos com os trabalhos de Araujo e Linden em 1993, juntamente com outros trabalhos da literatura (Okado & Oppenheim, 1984), permitem concluir que a regulação do processo de morte celular natural exercida pelas células aferentes não se limita apenas ao controle da atividade elétrica, mas também pela presença de moléculas sinalizadoras.

Agentes despolarizantes também são capazes de aumentar a sobrevivência das células ganglionares de ratos em cultura. A veratridina, um antagonista da inativação de canais de sódio dependentes de voltagem, promove uma despolarização que induz um aumento na sobrevivência das CGR. Esse efeito não depende do cálcio externo, mas sim do cálcio interno, pois é abolido por quelantes intracelulares de cálcio e bloqueadores da liberação de estoques internos de cálcio, ativação das enzimas tirosina cinases. O efeito da veratridina também é abolido pelo bloqueio da proliferação celular, e pelo bloqueio dos receptores muscarínicos do tipo M_1 (Pereira e Araujo, 2000).

O papel do sistema colinérgico no aumento da sobrevivência das CGR foi avaliado por Pereira e colaboradores em 2002. Eles demonstraram que a estimulação por agonistas colinérgicos aumenta a sobrevivência das CGR em cultura e que o bloqueio dos receptores M_1 abole totalmente esse efeito. O efeito da estimulação colinérgica é abolido pela inibição dos receptores Trk e pela inibição da secreção vesicular de polipeptídeos. Esses resultados sugeriram aos autores que a atividade elétrica poderia mediar a liberação de fatores tróficos capazes de regular a sobrevivência das CGR. Esses dados estão

de acordo com outros dados da literatura que demonstram o envolvimento de neurotransmissores na liberação de fatores tróficos de células do tecido neuronal (Berzaghi et al., 1993; Elliot et al., 1994).

A via da proteína cinase C (PKC) também está envolvida no controle da sobrevivência das CGR. Santos e Araujo, em 2000, mostraram que a ativação da PKC, através do PMA (acetato de forbol miristato), tem papel importante na sobrevivência das CGR mantidas em culturas mistas por 48 horas. Em 2005, Corrêa e colaboradores demonstraram que a ouabaína aumenta a sobrevivência das CGR de forma dose-dependente sendo seu efeito mediado pela PKC.

Há algum tempo vem sendo demonstrado o efeito trófico da eritropoetina (EPO) no SNC (Jelkmann & Metzen, 1996). Estudos mostraram a expressão da EPO e do seu receptor EPOR na retina e no cérebro (Bocker-Meffert et al., 2002; Marti et al., 1996). Estes receptores são encontrados no corpo celular e nos dendritos das CGR, sendo que a axotomia não interfere na sua expressão. De forma interessante, após a axotomia, ocorre o resgate das CGR quando a EPO é oferecida de forma exógena. O efeito é mediado pela PI3 cinase e pela inibição da ativação da caspase 3 (Weishaupt et al., 2004). Outros trabalhos mostram que, após axotomia, a estimulação dos EPOR resulta na ativação das vias da PI3 cinase e da ERK-1/2 em CGR em degeneração. No entanto, apenas a ERK- 1/2 confere neuroproteção às células, não tendo a participação da PI3 cinase nesse efeito (Kilic et al., 2005).

Estudos demonstraram que a administração de G-CFS (fator de estimulação de colônia de granulócitos humanos), induz neuroproteção após o esmagamento do nervo óptico de rato. Os efeitos neuroprotetores da

administração do G-CFS podem envolver tanto processos anti-apoptóticos como anti-inflamatórios (Tsai et al., 2008). Em investigações sobre as mudanças temporais nos sinais de sobrevivência e morte das CGR, após esmagamento do nervo óptico, foi observada uma diminuição do nível pAKT em CGR de ratos após 2-3 dias do esmagamento do nervo óptico. Subseqüente a este fato ocorre um aumento na atividade da Bax e caspase -3 depois 6-7 dias após a lesão. Foi caracterizado também a diminuição dos níveis de IGF-1 dois dias antes do decréscimo na atividade da AKT. Paralelamente, a suplementação com IGF promove sobrevivência celular e crescimento de neuritos em cultura de explante das CGR de ratos (Homma et al., 2007).

Torres e Araujo, em 2001 demonstraram que o tratamento de culturas mistas de células retinianas com a interleucina 6, aumenta a sobrevivência das CGR após 48h "in vitro". O efeito da IL-6 é mediado pelo influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, ativação da proteína cinase C, mas não da ativação da proteína cinase A. O aumento da sobrevivência das CGR pela IL-6, é abolido por bloqueadores dos receptores tirosina cinase, e por bloqueadores da MEK e PI-3 cinase.

Dados prévios do nosso laboratório demonstraram que o tratamento de culturas mistas de células da retina com IL-2 (50U/mL) ou com IL-4 (5U/mL), por 48h, induz um aumento da sobrevivência das CGR de maneira dose - dependente. O efeito da IL-2 não foi abolido pelo bloqueio da atividade colinérgica e também não foi afetado pela inibição da proliferação celular, porém o efeito da IL-4 depende tanto da atividade colinérgica como da proliferação celular (Sholl-Franco et al., 2001).

1.4 Citocinas

Apesar de alguns aspectos da comunicação entre neurônios, como transmissão sináptica e sinalização neurotrófica serem altamente especializados e restritos ao sistema nervoso central, outros não são. Todos os órgãos e tecidos em vertebrados regulam seu crescimento e função através de moléculas de sinalização difusas. Em muitos tecidos, a expressão dessas proteínas está aumentada em resposta à lesão, inflamação ou crescimento tumoral. Em 1974, Stanley Cohen propôs que fatores inibitórios de migração e fatores quimotáticos derivados de células linfocíticas ou não, seriam agrupados em e pertenceriam à família das citocinas (“fatores de movimento celular”) (Johnson, 1999 para revisão).

As citocinas são polipeptídeos de pequeno peso molecular, que podem ser secretadas por diversos tipos celulares e possuem diversas ações no crescimento e diferenciação celular, em respostas imunes e inflamatórias, e em vários sistemas fisiológicos e patológicos (Rothwell et al., 1996).

Estas moléculas foram inicialmente reconhecidas como mediadores primários da caquexia (oposto da obesidade, onde não há deposição da gordura). Este efeito seria mediado por ações tanto no sistema nervoso periférico como no sistema nervoso central. Por este motivo, uma das primeiras citocinas identificadas foi denominada “cachexina” (hoje conhecida como o fator de necrose tumoral, TNF- α) (Rothwell et al., 1996).

Este grande e crescente grupo de polipeptídeos (pequenas proteínas) compreende as interleucinas, as quimocinas, os fatores de necrose tumoral, interferons, as neurotrofinas, os fatores estimulantes de colônias e os fatores de crescimento (tabela 2). As citocinas modulam e medeiam respostas sistêmicas e apresentam papel em determinadas patologias do sistema nervoso estando presentes em processos inflamatórios, causados por infecções e por lesão (Rothwell & Luheshi, 1994).

As citocinas têm três mecanismos de ação gerais:

i. Pleiotropismo

É a habilidade de ter uma variabilidade de efeitos em diferentes tipos celulares;

ii. Redundância

Capacidade de várias citocinas mediarem um efeito comum;

iii. Sinergismo e antagonismo entre elas

Elas podem induzir ou inibir a síntese de outras citocinas.

FAMÍLIAS	MEMBROS	ATIVIDADE BIOLÓGICA
NEUROTROFINAS	NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6	Sobrevivência e diferenciação neuronal.
CITOCINAS HEMATOPOIÉTICAS	CNTF, LIF, CT-1, ONCOM, IL-6, IL-11, NT-1 etc	Sobrevivência de neurônios ciliares, aumento das propriedades colinérgicas.
FATORES DE CRESCIMENTO DO TECIDO	GDNF, TGF- α , TGF- β , FGFs, IGF-1 α , IGF-1 β , IGF-2, EGF, PDGF	Proliferação celular e diferenciação em diversos órgãos e tecidos, diferenciação celular dopaminérgica induzir a síntese de NO.
INTERLEUCINAS	IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2 até IL-35	Imunorregulação, diversas atividades no sistema imune
FATORES DE NECROSE TUMORAL	TNF- α , TNF- β	Citotoxicidade tumoral
QUIMOCINAS	Eotaxina 1, MCAF, MGSA, RANTES, NAP-1, NAP-2, MIP-1, IL-8	Quimiotaxia leucocítica e ativação celular
FATORES ESTIMULANTES DE COLÔNIA	G-CSF, M-CSF, GM-CSF	Proliferação celular hematopoiética
INTERFERONS	IFN- α , IFN- β , IFN- γ	Inibição de replicação viral, crescimento celular ou imunorregulação

Tabela 2. As diferentes citocinas e suas ações (adaptado de Johnson, 1999).

1.5 Histórico e característica molecular da IL-4

A molécula que hoje denominamos de interleucina-4 foi descoberta em 1982 (Paul, 1987). Inicialmente ela recebeu a denominação de fator de crescimento de células B devido a sua habilidade de induzir a proliferação de linfócitos B de camundongos estimulados com anticorpos anti-IgM. Posteriormente, foi observado que esta molécula era capaz de induzir a síntese de moléculas de MHC de classe II e aumentar a responsividade a anticorpos anti-IgM, e então, passou a ser chamada de fator estimulatório de células B – 1. Esta última designação foi substituída por interleucina 4 devido a sua ação pleiotrópica e pelo fato dela poder agir em outras células que não os linfócitos B (Paul, 1991).

A interleucina 4 é produzida por células T helper 2 (Th2) ativadas, basófilos, mastócitos, eosinófilos e também por um subconjunto de células T especializadas, algumas das quais expressam NK1.1 e parecem ser específicas para células T CD-1 (células T natural killers). A literatura já demonstrou que células T γ/δ também são capazes de sintetizar IL-4 (Nelms et al., 1999; Paludan, 1998).

Já houve um tempo em que a literatura apresentava uma família de citocinas denominada de Família da Interleucina 4 (IL-4, a IL-5, o GM-CSF e a IL-3). Essa classificação deveu-se ao fato dessas moléculas apresentarem, por vezes, efeitos similares e serem frequentemente co-expressas. Entretanto, o grau de homologia entre esses polipeptídeos é baixo o que fez com que esta classificação cunhada por Boulay and Paul, 1992 fosse revista. Hoje estas

moléculas são classificadas de acordo com a tabela 2 desta dissertação, obedecendo a um critério de homologia e efeitos no sistema imune e em outros sistemas (Steinke & Borrish, 2006).

A interleucina 4 é uma pequena proteína glicosilada, com aproximadamente 129 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 15kDa (Choi & Reiser, 1998). A estrutura tridimensional da IL-4 humana já foi descrita e ela apresenta quatro estruturas em alfa hélice. A alfa hélice A (hélice N-terminal) e a hélice C estão conectadas às hélices B e D, respectivamente, por longas alças como representado na figura 4 (Paul & Boulay, 1992).

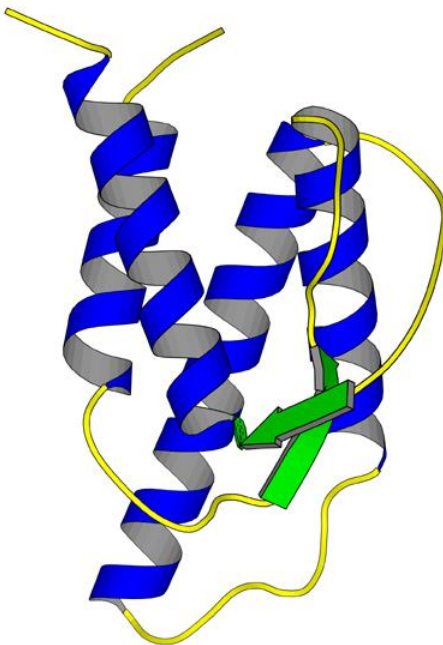


Figura 4. Estrutura tridimensional da molécula interleucina 4 humana.

(<http://arginine.chem.cornell.edu/Structures/StructurePictures/2INT.jpg>)

1.6 Perfil Filogenético da molécula de IL-4

Como um representante dos vertebrados inferiores e um elo de ligação evolutivo com vertebrados superiores, o peixe tem sido modelo de estudo para a origem e evolução de moléculas sinalizadoras e do sistema imune. Acredita-se que os peixes possuam sistema imune inato, no entanto o sistema adaptativo é incompleto (Li et al., 2007). A proteína codificada de IL-4 em baiacú, por exemplo, apresenta uma homologia de 11 a 16% quando comparada a IL-4 de mamíferos. Dados da literatura demonstram que esta citocina está presente de forma constitutiva em diferentes partes do organismo como o rim, o baço, o fígado, o cérebro, o músculo esquelético e o coração (Li et al., 2007). Em suínos, por exemplo, Nuntaprasert e colaboradores em 2005 demonstraram um cDNA codificando 135 aminoácidos, com homologia entre 63 e 42%, com a IL-4 de humanos e de camundongos respectivamente.

Na molécula de interleucina 4 existe um resíduo de cisteína que é altamente conservado entre as espécies. Quando comparamos a homologia entre humanos, camundongos e ratos, observamos que ela é de 100%. Já entre cães e gatos ela é de 89% e entre humanos e cavalos ela é de 98% (figura 5). Esta característica mostra não só a importância deste resíduo quanto a conservação principalmente entre as espécies de mamíferos (Odbileg et al., 2004).

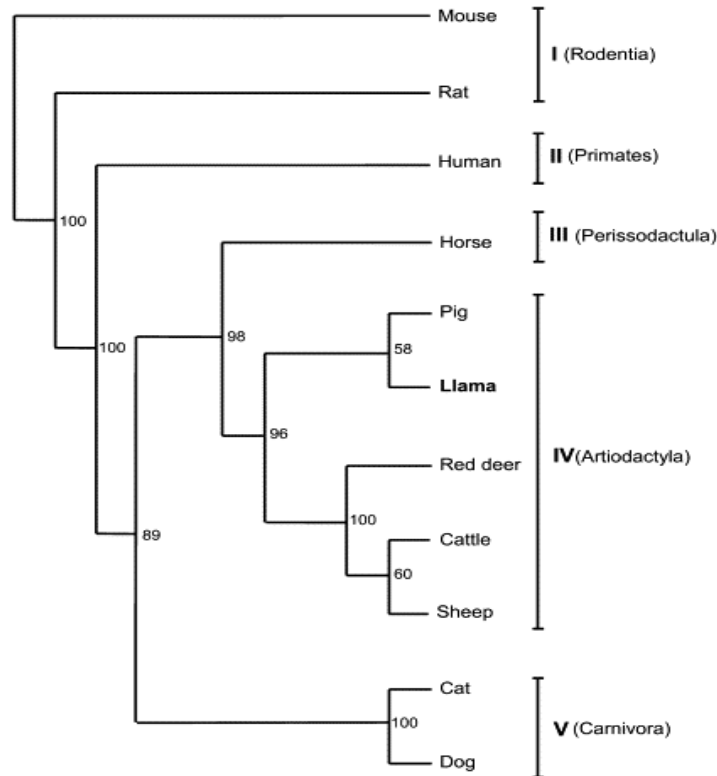


Figura 5. Perfil filogenético da IL-4. A homologia entre diferentes espécies mostram que o resíduo de cisteína é bem conservado na evolução (Odbileg et al. 2004).

1.7 Receptor de IL-4

Os receptores de IL-4 estão presentes em células hematopoiéticas, endoteliais, hepáticas e nervosas. São normalmente expressos em número de 100 a 5000 por célula. Para que haja a sinalização da IL-4 é necessário haver uma associação de receptores na forma de homodímeros ou de heterodímeros e dependendo das associações poderão ser deflagradas cascatas de sinalização distintas. A subunidade alfa (IL-4R α) apresenta peso molecular de 140kDa e a ligação da IL-4 a esta subunidade se dá com grande afinidade. Normalmente, em situações fisiológicas, ocorre a heterodimerização com a

subunidade gama (γ) como pode ser observado na figura 6. Esses receptores recebem a denominação de receptores de classe I. Apesar da subunidade γ aumentar modestamente a afinidade do complexo IL-4R para IL-4, esta associação parece ser necessária para que as cascatas de sinalização intracelulares sejam ativadas (Nelms et al., 1999).

A subunidade α do receptor de IL-4 em murinos, é uma cadeia longa com 785 aminoácidos e possui uma região citoplasmática com 553 aminoácidos. A região citoplasmática apresenta resíduos altamente conservados quando comparamos subunidades alfa de diferentes espécies (Keegan & Pierce, 1994; Nelms et al., 1999). Em particular, existem cinco resíduos de tirosina na região citoplasmática que são altamente conservados sugerindo que estas regiões sejam muito importantes. Uma sequência rica em prolina, na região da membrana proximal da IL-4R α , denominada “box 1 motif” é encontrada em vários membros da família das hematopietinas. Uma região acídica subjacente ao “box 1 motif” é similar à região do receptor β de IL-2 que tem a propriedade de interação com as cinases da família Src (Paul et al., 1999).

O receptor de IL-4 da classe II é um complexo que envolve a heterodimerização da subunidade alfa do receptor de IL-4 com a subunidade alfa 1 do receptor de IL-13. Este complexo é também um receptor funcional para IL-13. É importante ressaltar que a IL-13 compartilha 25% de homologia com a IL-4 e isto explica a sobreposição dos efeitos biológicos dessas duas interleucinas. Este complexo não é encontrado em células T e é mais ativo em células regulatórias, macrófagos e células dendríticas que medeiam a hipersensibilidade e secreção de muco das vias aéreas. A subunidade alfa 1 do

receptor de IL-13 contem um domínio extracelular N-terminal semelhante à imunoglobulina (D1), que não é encontrado em outros receptores da subfamília γc , e que é requerido para a sinalização da IL-13, mas não da IL-4 (LaPorte et al., 2008) (Figura 6).

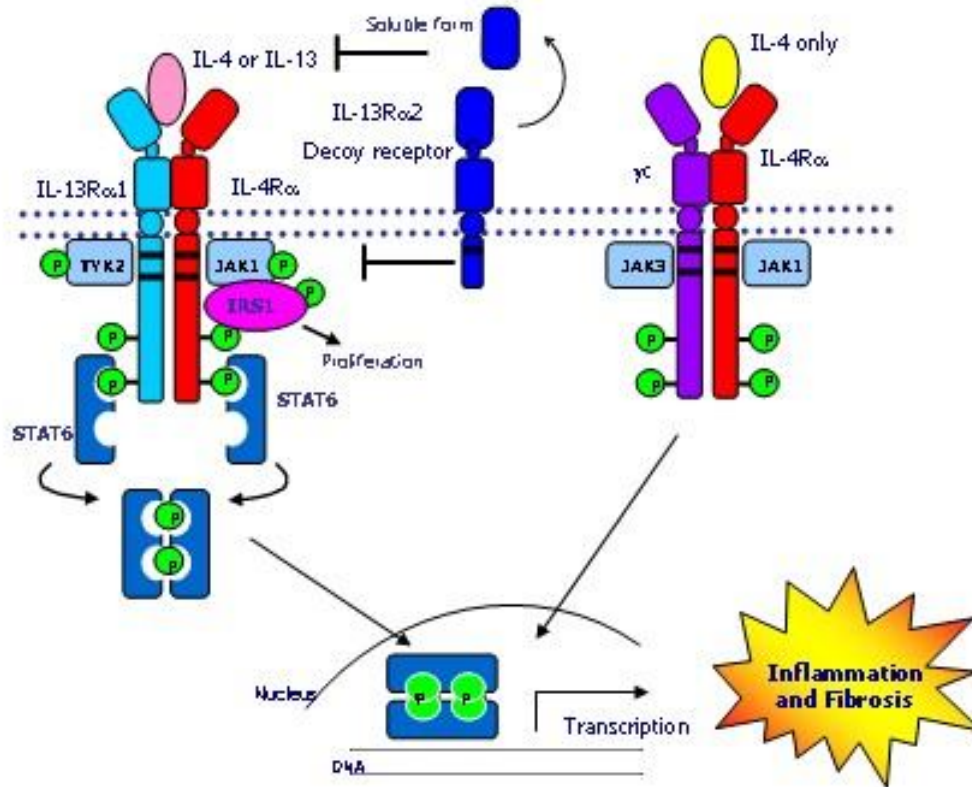


Figura 6. Receptores para a IL-4. Vias de sinalização ativadas pelos receptores de IL-4. O receptor de classe I é formado pelas subunidades IL-4R α e γc . O receptor de classe II é formado pelas subunidades IL-4R α e IL-13 α 1.

(http://www.som.soton.ac.uk/research/iir/Groups/respiratory/Growth_factors/il4-13.jpg).

1.8 Sinalização da IL-4

É preciso que se tenha em mente que nenhuma das subunidades do receptor de IL-4 apresenta atividade tirosina cinase, mas ativam cinases

citoplasmáticas associadas ao receptor para iniciar a transdução do sinal (Figura 7). A família Janus kinases (Jak) que compreende tirosinas cinases citoplasmáticas, desempenha um importante papel na sinalização desses receptores (Nelms et al., 1999). Dados da literatura mostram que os membros da família Janus cinases, Jak-1, Jak-2, Jak-3 e Tyk2, são ativados após ligação de IL-4 ao seu receptor. Jak-1 parece se associar com a subunidade alfa, enquanto a Jak-3 se associa à subunidade γ c. Ao se ligar ao seu receptor, a IL-4 é capaz de induzir a ativação por fosforilação da Jak-1 e da Jak-3 e consequentemente a fosforilação de resíduos de tirosina das subunidades do receptor (Paul et al., 1999). Cinco resíduos de tirosina na região citoplasmática da subunidade alfa são potenciais sítios de fosforilação e subsequente interação com proteínas de sinalização “downstream” através de proteínas homologas a Src 2 (SH2) ou domínios de ligação fosfotirosina (PTB) com essas moléculas (Nelms et al., 1999).

A fosforilação e consequente ativação da Jak-3 leva à fosforilação de uma outra proteína sinalizadora, a STAT6, que muda sua conformação formando homodímeros. Essa proteína é um fator de transcrição citoplasmático latente, recrutado para o receptor de IL-4 e ativado por fosforilação. Ao ser ativada a STAT6 forma homodímeros, que são capazes de atravessar a membrana nuclear e então podem influenciar a transcrição de genes responsivos ao estímulo pela IL-4 (Shimoda et al., 1996; Kaplan et al., 1996; Wuster et al., 2002). Tem sido demonstrado também a participação de outras duas proteínas da família STAT na sinalização por IL-4, a STAT-3 e a STAT-5. A fosforilação destas moléculas está relacionada com a supressão da apoptose em diferentes populações celulares (Leonard & O’Shea, 1998).

Estudos comparativos das vias de sinalização ativadas por IL-4 e IL-13 em células hematopoiéticas observaram a presença de uma proteína de 170 kDa que é ativada pelos receptores de classe II. Esta proteína foi inicialmente denominada substrato de fosforilação de IL-4 (4PS), e foi comparada ao substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), que é fosforilado em resposta ao tratamento de células não-hematopoiéticas com IGF-1. Em vista da semelhança entre essas duas proteínas, 4PS e IRS-1, a primeira passou a ser designada IRS-2 (Keegan and Pierce, 1994; Nelms et al., 1999).

Estudos *in vitro* demonstraram que a ativação via IRS-2 pela IL-4 está envolvida tanto na regulação de sinais mitogênicos (através de heterodimerização com a proteína GRB-2 e ativação da via da Ras/MAPK) como em respostas anti-apoptóticas (mediante ativação da proteína AKT via PI-3 cinase) (Zamorano et al., 1996; Ryan et al., 1996, Nelms et al., 1999).

Estudos com agentes farmacológicos, que mimetizam os efeitos na expressão gênica induzidos pela IL-4 em células B, mostram que a ativação das vias de PKA e PKC são necessárias para que ocorra a expressão de CD23 (Finney et al., 1990) ou CD25 (Mckay & Cushley, 1996). Em células B tonsilares de humanos, o aumento dos níveis de AMPc e a ativação de PKA induzidos pela IL-4 atenuam a atividade de NRE-BP, que é responsável pela inibição da expressão de CD-23 e CD-25. Desta forma o aumento na expressão se dá através da inibição das vias inibitórias (Mckay et al., 2000).

Os receptores podem ter sua atividade regulada por fosfatases de fosfotirosinas. Essas proteínas removem o grupamento fosfato e desta maneira

fazem com que resíduos fosforilados do receptor não possam permitir a ligação e conseqüente ativação de proteínas adaptadoras. Outra via envolve a regulação negativa da via Jak-STAT, pelas moléculas CIS (para via SH2), SOCS-1, 2, 3 (para supressores da sinalização da citocina) e SSI-1 (para indução de inibidor de STAT). Há ainda, a regulação negativa da via Ras/Map cinase, resultante da ativação por IRS-1/2. As proteínas p62^{dok} e a FRIP interagem com a proteína que ativa a Ras GTPase (RasGAP) (Paul et al., 1999).

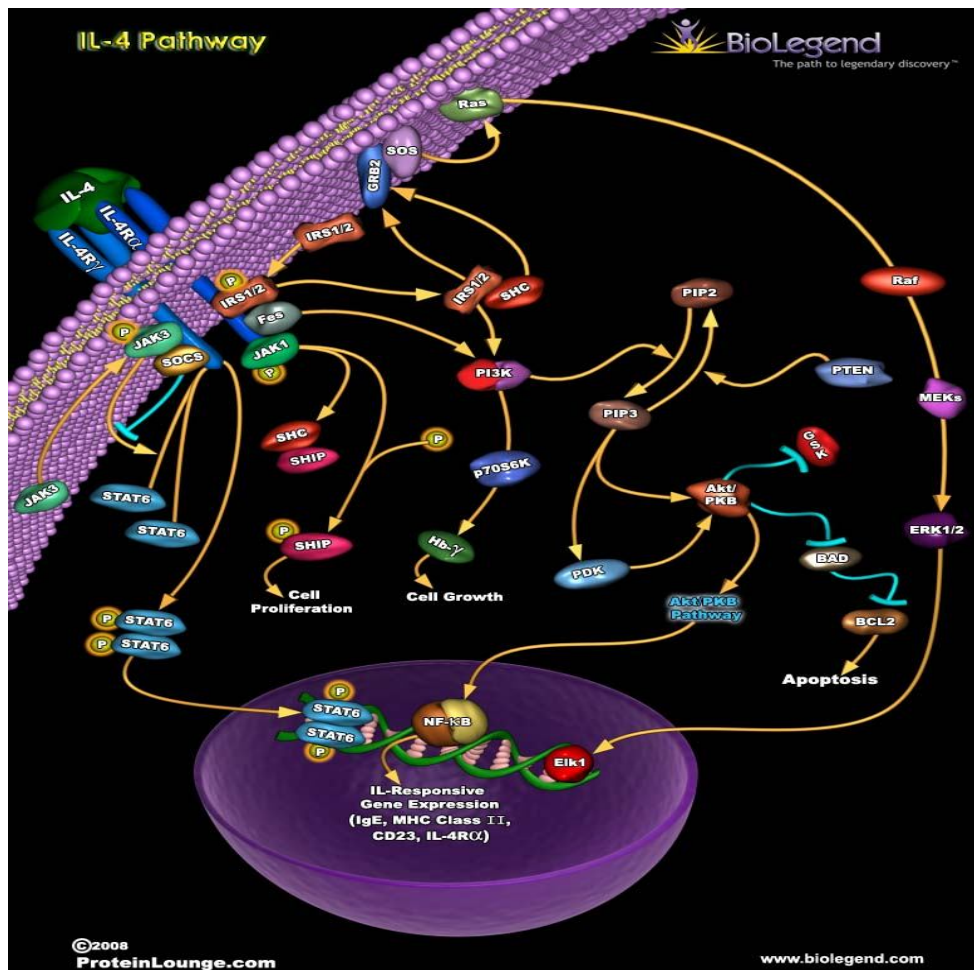


Figura 7. Vias de sinalização da IL-4 (http://www.biologend.com/pop_pathway.php?id=43)

1.9 Ações Gerais da IL-4

Por ser uma molécula pleiotrópica, a interleucina 4 age em diferentes tipos celulares, particularmente, esta proteína tem um papel chave na resposta imune. Quando de sua descoberta pensava-se que a IL-4 induzisse as células B blásticas a entrarem na fase S do ciclo celular mas hoje sabemos que de fato ela medeia a saída da fase G1 (Nelms et al., 1999). Esta citocina serve como um fator de crescimento autócrino e um fator de diferenciação e como consequência é uma promotora para proliferação de células T imaturas e diferenciação destas mesmas células em células efetoras (Choi & Reiser, 1998).

A IL-4 é responsável pela autorrenovação das células tronco em tumores do câncer de cólon, e bloqueando sua sinalização pode-se direcionar este grupo celular a estímulos apoptóticos oferecendo um possível tratamento contra o carcinoma de cólon (Francipane et al., 2008; Todaro et al., 2008).

A interleucina 4 tem sido estudada extensivamente no contexto do tratamento de doenças que afetam as vias respiratórias, tais como asma. Há evidências do aumento da concentração desta citocina em tais pacientes (Church et al., 1994).

A interleucina 4 também é responsável pela produção de IgE em camundongos em resposta a uma variedade de estímulos, que elicitam a troca de classe da Ig e aumento da produção de IgE. Camundongos tratados com anti-corpos anti-IL4 são incapazes de promover a produção de IgE, sendo o

aumento desta classe a responsável em casos de infecções por nematodos (Nelms et al., 1999).

Por fim esta citocina pode agir também de diversas formas em células hematopoiéticas, seja inibindo o crescimento de macrófagos e aumentando sua atividade citotóxica para certas células tumorais, seja estimulando o crescimento de mastócitos. A IL-4 também aumenta a formação de colônias hematopoiéticas em ágar. Por exemplo, na presença de G-CSF (fator de estimulação de colônia de granulócito), ela aumenta a formação de colônias de granulócitos. Ela também aumenta a formação de colônias de eritrócitos na presença de eritropoietina. Esses últimos exemplos demonstram o efeito da IL-4 na potenciação da ação de outras citocinas. Na presença de IL-1 pode acentuar a produção de colônias mistas contendo eritrócitos, megacariócitos e elementos mielóides (Nelms et al., 1999).

1.10 Interação da IL-4 com outras moléculas

Sendo a IL-4 uma molécula pleiotrópica, e considerando que *in vivo* múltiplas sinalizações ocorrem, é factível que haja cooperação da IL-4 com outras proteínas na geração de múltiplas respostas. A estimulação tanto com LPS, IL-1 e membros da família TNF, por exemplo, e ativação de receptores de antígenos dos linfócitos são capazes de atuar como sinais acessórios para respostas mediadas por IL-4. A interleucina 4 é capaz de regular a produção de RANTES e IL-8 em células epiteliais da córnea de humanos. TNF- α é capaz de promover a produção dessas duas citocinas. No entanto, quando o TNF é

administrado juntamente com IL-4 há uma significativa redução da produção tanto de RANTES quanto de IL-8.(Ghosh et al., 1998, Takano et al., 1999).

Já são bem estabelecidas as funções biológicas da interleucina 4 em humanos e seus efeitos nos macrófagos de suínos estimulados com LPS. É bem estudada também a atividade desta interleucina em camundongos, ratos, bovinos e cães (Nuntaprasert et al., 2005).

IL-4 e IL-13 por compartilharem receptores apresentam sobreposições de ações tais como na regulação da proliferação de fibroblastos do pulmão (Lewis et al., 2003).

Estudos *in vitro*, mostram que separadamente IL-4 e IL-10 podem inibir as respostas inflamatórias em pacientes com artrite reumatóide, porém em modelos experimentais *in vivo* o benefício clínico de uma ou outra citocina no tratamento dessa patologia é limitado. Isto ocorre pois ambas podem exercer um papel tanto anti- quanto pró-inflamatório. No entanto, a combinação das duas citocinas leva a um sinergismo e supressão da inflamação e reversão da lesão causada por esta patologia (Van Roon et al., 2001).

A interleucina 4 possui efeitos antagônicos ao IFN- γ . Enquanto a primeira é responsável pela polarização das células T não diferenciadas em células Th2, o interferon é capaz de promover a diferenciação no tipo pró-inflamatório, Th1. Ambas citocinas podem afetar a mudança de classe do anticorpo e promover a expressão de receptores Fc diferencialmente, os quais afetam fortemente os mecanismos efetores de produção de anticorpos. As atividades dos

macrofágos podem ser induzidas ou potenciadas pelo interferon, tais como expressão de certas citocinas, moléculas de superfície e enzimas, todas antagonizadas por IL-4 (Paludan, 1998).

No sistema imune a IL-2 é conhecidamente uma molécula pró-inflamatória secretada por células T do tipo 1. A regulação da transformação de células T não diferenciadas (naives) é feita por citocinas. Uma vez ativadas pela molécula de IL-2, as células T ainda indiferenciadas podem se diferenciar em TH1 ou TH2 de acordo com a necessidade celular e a estimulação por uma determinada citocina, entretanto, a IL-4 é a responsável pela maturação das células T naives em seu fenótipo anti-inflamatório TH2, e sua produção inibe o fenótipo TH1 (figura 8).

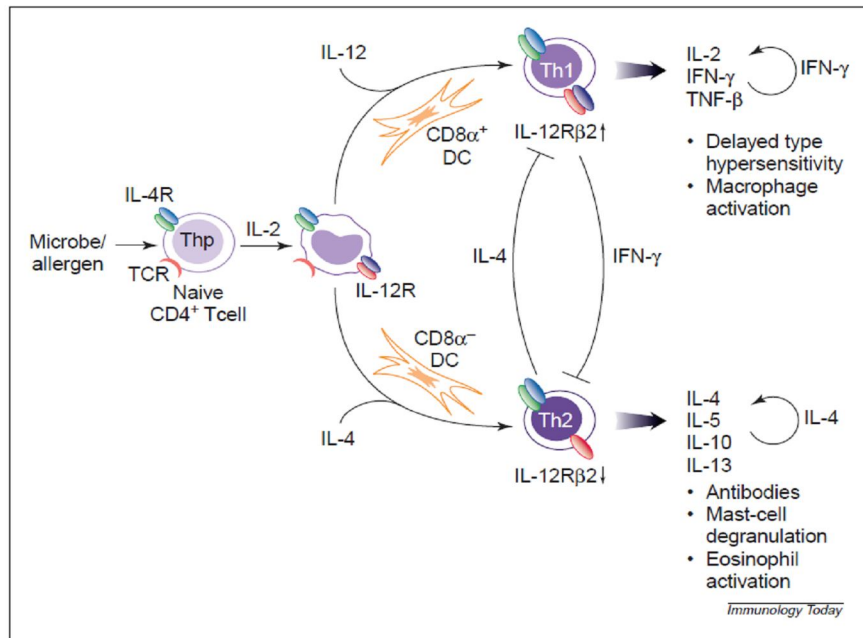


Figura 8. Ativação de células T naivas e interação de citocinas anti e pró-inflamatórias. Células Th0 possuem o receptor de IL-4 e respondem a sua produção, a diferenciação destas células depende da resposta a inflamação a ser dada. Uma vez que a resposta é pró-inflamatória, IL-2 ou IL-12 são produzidas e medeiam a diferenciação em um fenótipo Th1, se a resposta for anti-inflamatória, a produção de IL-4 medeia sua transformação no fenótipo Th2. (Rengarajan et al, 2000).

1.11 *IL-4 e suas funções no Sistema Nervoso Central*

Células do sistema nervoso central são capazes de sintetizar, secretar e responder às interleucinas (Brodie et al., 1998; Lovett-Racke et al., 2000). Este fato não apenas contribui para respostas imediatas a lesões e para o processo de resposta imunológica dentro do SNC, como também está implicado na regulação dos processos de desenvolvimento e diferenciação das células presentes neste sistema (Sawada et al., 1995).

Dados da literatura demonstram que a IL-4 é capaz de suprimir a inflamação no sistema imune (Ponomarev et al., 2007) e igualmente exerce função anti-inflamatória no cérebro. Neste contexto a IL-4 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF- α (Lee et al., 1995; Mori et al., 1995) e também antagoniza os efeitos do IFN- γ no sistema nervoso (Fiorentino et al., 1991).

Foi mostrado que tanto a neurogênese quanto a oligodendrogênese de células progenitoras neurais adultas em camundongos são bloqueadas pela presença de células da microglia em condições de respostas inflamatórias. Entretanto, quando a microglia é ativada por IL-4 o efeito é oposto, ou seja, ocorre a neurogênese e a oligodendrogênese (Butovsky et al., 2005). Em processos inflamatórios, a IL-4 pode inibir os efeitos da microglia (ativada pela inflamação) e desta maneira proporcionar um aumento na sobrevivência (Park et al., 2005).

A IL-4 aumenta o número de células GFAP positivas em cultura (Araujo & Cotman, 1993), diminui a proliferação de astrócitos humanos (Estes et al., 1993; Barna et al., 1995) e aumenta o efeito anti-proliferativo do TNF- α em certas linhagens celulares de glioblastoma (Iwasaki et al., 1993).

A IL-4 também é capaz de aumentar o fenótipo GABAérgico em cultura de células da retina de ratos sugerindo um importante papel desta citocina durante o desenvolvimento normal da circuitaria retiniana ou durante a neuroproteção após lesões (Sholl-Franco et al., 2002).

Estudos demonstram a indução de síntese e secreção de NGF pela IL-4 em células astrogliais de ratos (Awatsuji et al., 1993), em células gliais C6 (Brodie & Goldreich, 1994) e em astrócitos corticais e cerebelares de camundongos (Brodie et al., 1998).

Foi também mostrado, que a IL-4 é capaz de diminuir a proliferação de forma dependente da PKA e induzir a diferenciação de bastonetes em roedores através de uma via envolvendo a ativação de tirosinas cinases, PKC e MAP cinase, de maneira independente da liberação de fatores tróficos na cultura (da Silva et al., 2008).

A interleucina 4 também é capaz de aumentar a sobrevivência de neurônios hipocámpais de embriões de ratos mantidos em cultura entre 24 e 72 horas, de forma dependente da concentração utilizada (Araujo & Cotman, 1993). Já foi demonstrado também que esta citocina pode aumentar a sobrevivência de células ganglionares de ratos neonatos em cultura através da atividade colinérgica

mediante ativação de receptores muscarínicos do tipo 1 (M1) e por células proliferantes em cultura (Sholl-Franco et al., 2001).

Dados prévios do nosso laboratório já haviam demonstrado a importância do AMPc no controle da sobrevivência das CGR mantidas em cultura mista e na ausência de moléculas neurotróficas exógenas. Para que se obtivesse um aumento nos níveis de AMPc as culturas foram tratadas com diferentes concentrações de forskolina. A figura 9 demonstra o efeito do tratamento com forskolina na sobrevivência das CGR. Podemos observar que a forskolina é capaz de aumentar a sobrevivência das CGR de maneira dose-dependente. Nesse mesmo trabalho as autoras observaram que o efeito da forskolina era dependente da atividade colinérgica, mais especificamente da ativação de receptores M1 (Santos & Araujo, 2001).

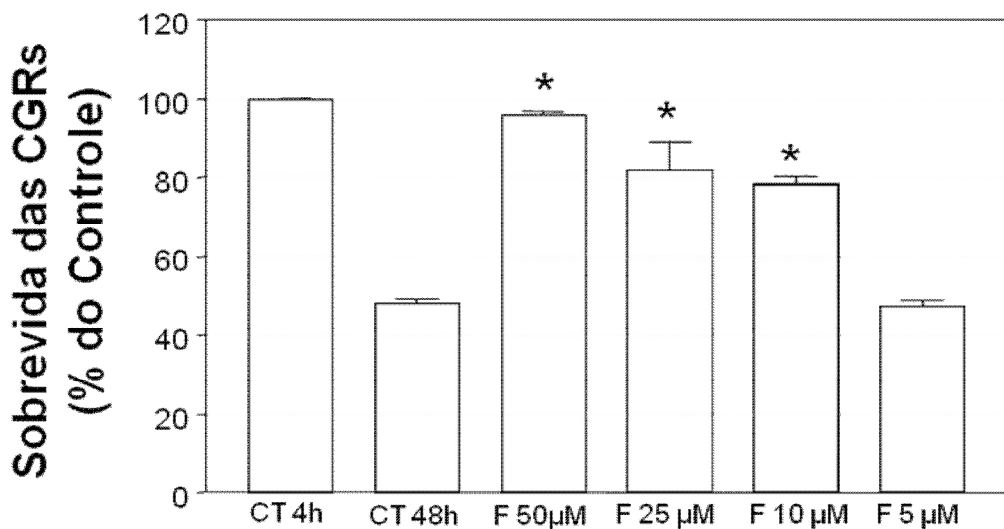


Figura 9. Efeito da forskolina na sobrevivência das células ganglionares. A forskolina é capaz de aumentar a sobrevivência das células ganglionares em cultura de maneira dependente da concentração, alcançando o efeito máximo em 50µM (Santos & Araujo, 2001).

Resultados também obtidos em nosso laboratório e igualmente já publicados, demonstraram que o tratamento de culturas de células da retina com IL-4 induzia um aumento na sobrevivência das células ganglionares (Figura 10). O efeito da IL-4 se dava de maneira concentração dependente e efeitos máximos foram obtidos com 5 e 50U/mL. Quando o tratamento era feito com 100U/mL o efeito observado já era menor. Nesse mesmo trabalho, os autores caracterizaram o envolvimento de receptores M1 da acetilcolina no efeito da IL-4 no aumento da sobrevivência das células ganglionares (Sholl-Franco et al., 2001).

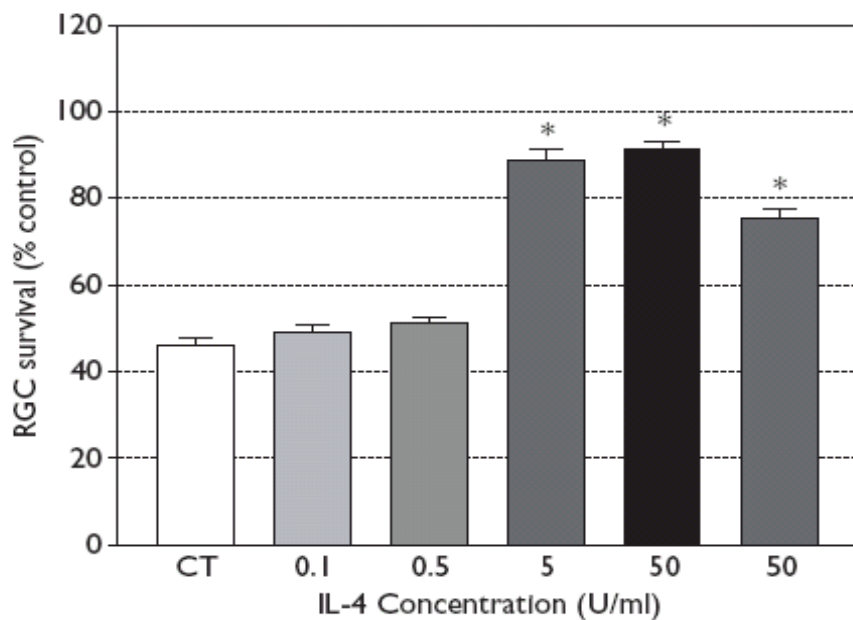


Figura 10. Efeito da IL-4 na sobrevivência das células ganglionares. A IL-4 aumenta a sobrevivência das células ganglionares em cultura mista de maneira concentração dependente, atingindo o máximo do seu efeito em 50 U/mL (Sholl-Franco et al., 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Estudar a ação da interleucina 4 na retina de ratos em diferentes idades do desenvolvimento pós natal, e verificar seus efeitos na sobrevivência das células ganglionares de ratos neonatos in vitro, caracterizando suas vias de sinalização.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar o envolvimento do AMPc no efeito trófico da IL-4 sobre as CGR.
2. Estudar o efeito do tratamento do tecido retiniano com a IL-4 na fosforilação da CREB e da MAPK.
3. Analisar a expressão da IL-4 no tecido retiniano ao longo do desenvolvimento pós-natal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A IL-4 recombinante humana e anticorpos anti-human IL-4 foram comprados da PeproTech (NJ-EUA). Os anticorpos anti-p-MAPK (Tyr 202 e Tyr 204) e anti-p-CREB (Ser 133) foram adquiridos da Cell Signaling (MA-EUA). O meio de cultura 199, a solução salina Hanks e o soro fetal bovino foram comprados da Gibco (MD, EUA). A tripsina foi comprada da Worthington (NJ, EUA). As placas de Petri foram compradas da TPP (Suíça). A penicilina G, o sulfato de streptomicina, a L-glutamina, a poli-L-ornitina, a peroxidase, a tetrametilbenzidina, o nitroprussiato de sódio e a forskolina vieram da Sigma (MO, EUA). H89 (inibidor da PKA) foi comprado da Calbiochem (Darmstadt – Alemanha). Todos os sais e reagentes utilizados tinham pureza determinada e adequados para estudos com células. Todo o material utilizado nas experiências de Western blot foi adquirido da GE (CT-EUA) e o vermelho de Ponceau comprado da VETEC. O Entellan nos foi fornecido pela Merck (Darmstadt-Alemanha). A albumina do soro bovino veio da Santa Cruz (CA-EUA).

3.2 Cultura de células da retina

Ratos da linhagem Lister Hooded com 0 a 72h de nascidos (dias pós-natal 0 a 2) foram sacrificados por decapitação, seus olhos removidos por enucleação e colocados em placa de Petri preenchidas com solução salina sem Ca^{+2} e Mg^{+2} (CMF) acrescido de antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100 μg /mL). A seguir, as retinas foram dissecadas e colocadas num tubo de ensaio contendo CMF onde era adicionada a tripsina 0,1% por 20 min a 37°C, para dissociação química do tecido. A tripsina era inativada após a

retirada do CMF e lavagem por duas vezes com meio de cultura acrescido de 5% de soro fetal bovino (FCS), glutamina 2,0mM, estreptomicina 100 μ M e penicilina 100U/mL.

Para completar o processo de separação das células induzia-se a passagem das mesmas em meio de cultura, por uma pipeta Pasteur de ponta afilada por até de 10 vezes. A suspensão de células obtida foi contada em um hemocitômetro ao microscópio óptico, em campo claro, para estabelecermos o quanto de meio de cultura precisava ser adicionado para a obtenção da densidade desejada. Para todos os experimentos, as células eram semeadas em placas de Petri de 40 mm na densidade de $1,25 \times 10^6$ células/placa. Todo o procedimento de dissecação, dissociação e plaqueamento das células foi realizado em capela de fluxo laminar.

As culturas recebiam 1mL de meio completo com as células e eram mantidas por até 4 h, a 37°C, para que as células pudessem aderir às placas. Após este período as culturas recebiam 1mL de meio completo (culturas controle) ou 1 mL de meio contendo IL-4 e ou drogas a serem testadas. Seguiam-se um período de incubação das células de 44h, a 37°C, em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂.

Todos os nossos procedimentos envolvendo animais foram realizados seguindo as normas do comitê de ética da Sociedade Internacional de Neurociências.

3.3 Estimulação do tecido

Animais com a idade pós natal 4(P4) foram sacrificados por decaptação e seus olhos foram removidos por enucleação e colocados em uma placa de Petri com CMF. As retinas foram dissecadas e mantidas intactas, sendo então transferidas para uma placa de cultura de 24 poços. De acordo com o protocolo estabelecido, em cada poço foi adicionado 1mL de meio de cultura 199 e nele foram imersas as retinas (quatro retinas por poço). A seguir as placas foram colocadas na estufa a 37°C com uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ por aproximadamente 30 minutos, para que houvesse um equilíbrio do tecido nesta condição experimental. Após este tempo o meio foi retirado e de acordo com o tratamento, foram adicionados o meio de cultura livre de qualquer droga, sendo este o controle, interleucina 4 (IL-4) na concentração de 10U/mL, IL-4 na concentração de 50U/mL, IL-4 na concentração de 100U/mL e Forskolina 50ng/mL e a incubação foi feita de acordo com o tempo desejado (5 minutos, 15 minutos ou 2 horas).

Em seguida as retinas foram rapidamente retiradas da placa e colocadas em seus respectivos Eppendorfs contendo 200µL de tampão de amostras SDS (glicerol, 2-mercaptoetanol, SDS, Tris 0,5M). A seguir as amostras foram fervidas a 100°C por cerca de 10 minutos, para desnaturar as proteínas e homogenizar a amostra. Logo a seguir os Eppendorfs foram colocados a -20°C até o momento em que se fizesse a dosagem das proteínas.

3.4 Análise da expressão da IL-4 no tecido pós natal (Extração de proteínas do tecido neonatal)

Para realizar este experimento os animais foram sacrificados por decaptação (P0, P2) ou por inalação de éter (P4, P9, P15, P30, P90, 1 ano). Os olhos foram removidos por enucleação e colocados em uma placa de Petri contendo CMF. As retinas foram dissecadas tomando-se o cuidado de mantê-las o mais intacta possível. Após a dissecação as retinas foram colocadas diretamente em Eppendorfs contendo 200µL de tampão de amostras SDS. Foram adicionadas 4 retinas por ponto nas idades P0, P2 e P4 e 3 retinas por ponto nas demais idades. Em seguida os Eppendorfs foram fervidos a 100°C por cerca de 10 minutos para desnaturação do tecido. As amostras após serem retiradas, são rapidamente congeladas para então ser feita a dosagem de proteínas.

3.5 Injeção de peroxidase nos colículos superiores

3.5.1 Injeção de peroxidase e fixação do controle 4 horas

As células ganglionares da retina foram marcadas pelo transporte retrógrado de peroxidase. Nas primeiras 24h após o nascimento, os animais foram anestesiados por hipotermia e foi feita uma incisão na região occipital da cabeça. A cartilagem foi cortada com o auxílio de uma tesoura de microcirurgia e os colículos foram expostos. Ambos os colículos superiores receberam injeções de peroxidase (30% em DMSO 2%). Após um período de no mínimo 16h, os animais foram sacrificados e foi iniciado o procedimento para a obtenção das culturas como já descrito neste trabalho. As células

permaneceram aderindo nas lamínulas por um período de 4 horas na estufa, a 37°C e 5% de CO₂. A seguir, foram fixados os controles de 4 horas e as demais placas receberam os respectivos tratamentos.

3.5.2 Tratamento com IL-4

Após o processamento da cultura de forma convencional, as placas foram tratadas com:

1. Meio de cultura 199 (controles)
2. IL-4 na concentração de 50U/mL
3. IL-4 50U/mL juntamente com H89 na concentração de 1µM
4. Forskolina 5µM
5. IL-4 0,5U/mL
6. Forskolina 5µM juntamente com IL-4 0,5U/mL

3.5.3 Fixação das culturas para revelação da peroxidase

As culturas foram fixadas em Karnovski (Paraformaldeído 1% e glutaraldeído 2%) por um período de 5 a 10 minutos. Esse período de fixação é crítico, pois ele pode interferir na atividade da peroxidase e comprometer a visualização das células ganglionares. Em seguida, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4.

3.5.4 Revelação da peroxidase

A revelação da peroxidase foi realizada através de uma reação histoquímica segundo o método de Mesulan (Mesulan, 1978). Foi utilizada a tetrametilbenzidina (TMB) como cromógeno e o peróxido de hidrogênio como substrato. Após a reação, as lamínulas foram desidratadas, banhadas em xilol e montadas em Entellan sobre lâminas histológicas.

3.5.5 Avaliação do número de células ganglionares

Utilizamos um método de contagem sistemática, em microscópico de campo claro, com um aumento de 1000X. Nossos resultados foram expressos em porcentagens relativas ao controle de 4 horas.

3.6 Western Blot

A técnica de Western Blot foi utilizada para marcação de CREB fosforilada (Ser 133), MAPK fosforilada (Tyr 202 e Tyr 204) e também para detectar a presença de IL-4 no tecido retiniano ao longo do desenvolvimento pós natal. O controle do carregamento foi feito através da marcação de actina.

3.6.1 Dosagem de proteínas

A dosagem foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A curva padrão foi feita com 0, 5, 10, 15 e 20 μ g de uma solução de albumina (BSA) na concentração de 1mg/mL. As amostras são medidas em um espectrofotômetro regulado para apurar na faixa do visível, em 595nm. As amostras são coradas com azul de bromofenol (2 μ L de azul de bromofenol a cada 100 μ L de amostra).

3.6.2 Géis de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado na concentração de 9% para analisar a expressão de p-CREB (49 KDa), a actina (48KDa) e p-MAPK (42 a 44 KDa). Para analisar a expressão de IL-4 (14 KDa) o gel foi preparado na concentração de 15%. O gel de corrida na concentração de 9% foi preparado contendo água destilada (4,05mL) Tris base 1,5M pH 8,8 (2,25mL), acrilamida 30% e metileno bisacrilamida 0,9% (2,7mL), SDS 10% (15µL), TEMED (30µL) e persulfato de amônia 10%(30µL). O gel de corrida na concentração de 15% foi preparado contendo água destilada (2,25mL) Tris base 1,5M pH 8,8 (2,25mL), acrilamida 30% e metileno bisacrilamida 0,9% (4,5mL), SDS 10% (15µL), TEMED (30µL) e persulfato de amônia 10% (30µL). Estes géis foram aplicados e em seguida completou-se o volume dos mesmos com água com o objetivo de manter o gel bem nivelado e impedir a entrada de O₂.

Após a polimerização, a água foi retirada e adicionou-se o gel de compactação contendo Tris base 0,5M pH 6,8 (0,625ml); acrilamida 30% + 0,9% de metileno bisacrilamida (0,325ml), SDS 10% (25µl), TEMED (12,5µl), persulfato de amônia 10% (25µl). Após aplicar este gel, o pente foi colocado e aguardamos a sua polimerização overnight em ambiente umedecido.

O gel foi colocado na cuba contendo tampão de corrida (14,4g de glicina, 3g de Tris base e 1g de SDS em 1L de água MILLI-Q). As amostras foram aplicadas nos poços. Utilizamos 5µl do padrão de peso molecular no primeiro poço e volumes variados das amostras das experiências que representando 60µg de proteínas por poço. A corrida foi realizada na cuba de

eletroforese com corrente constante de 15mA por um tempo aproximado de 90 minutos.

3.6.3 Transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride)

A membrana foi incubada por 60 segundos em metanol e transferida para uma cuba contendo tampão de transferência (glicina 14,4g, Tris base 3g, e 200mL de metanol completando com água MILLI-Q para o volume final de 1L de solução), onde ficou equilibrando por aproximadamente 20min. O “sandwich” com o gel e a membrana foi montado, imersos neste tampão e a transferência foi realizada utilizando voltagem constante de 45V por 60 min em uma temperatura de aproximadamente 4°C. Após a transferência a membrana foi incubada por cerca de 1min em vermelho de Ponceau afim de verificar a qualidade do procedimento, lavada em água Milli-Q para se retirar o excesso do vermelho de Ponceau. Para a retirada da marcação com Ponceau, utiliza-se o próprio tampão de transferência, então, incubou-se em solução salina tamponada de Tris (TBS) pH 7.6, para realizar o bloqueio e a imunodeteção.

3.6.4 Bloqueio e imunodeteção

O bloqueio foi realizado com 5% de leite desnatado em TBS (pH 7.6) com 0,1% tween 20, por 2h, em temperatura ambiente. Após este período, a solução para o bloqueio foi retirada e então, incubada com o anticorpo primário específico em TBS (5% de leite e 0,1% tween), overnight. Foram utilizados anticorpos anti-pCREB (diluição 1: 1000), anti-actina (diluição 1:100), anti-pAKT (diluição 1: 1000), anti-pMAPK (diluição 1: 1000) e anti-IL-4 (diluição 1: 100).

Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana era lavada três vezes em TBS (0,1% tween e 1% de leite) por 10 min cada lavagem. A membrana era então incubada com o anticorpo secundário específico, ligado a peroxidase. Utilizamos o anticorpo anti-mouse (para experimentos utilizando o anti-p-MAPK), o anticorpo anti-rabbit (nos experimentos utilizando anti-actina, anti-pCREB, anti-pAKT e anti-IL-4). As membranas foram lavadas duas vezes, por 10 min cada, em TBS com 0,1% tween, e a última lavagem era realizada apenas com TBS por 10min.

3.6.5 Revelação

A revelação era realizada com exposição da membrana ao ECL por 5 minutos. Esta reação é baseada na quimioluminescência que resulta da oxidação do luminol, catalizada pela peroxidase presente no anticorpo secundário. A membrana fica então exposta ao filme (Hiperfilme – Amersham) por 5 minutos. O filme era retirado e a revelação realizada com revelador GBX Kodak 1:10 por 15 segundos, seguido de fixação (Fixador Kodak 1:5) por 1 minuto.

3.7 Análise estatística dos resultados.

A intensidade das bandas foi analisada pelo programa Scion Image e expressas em unidades arbitrárias. Os resultados são expressos na forma de histograma e na apresentação das bandas reveladas no filme. Nos gráficos estão representados a média e o erro padrão da média. Foi feita a análise de variância (ANOVA) seguida de um pós teste de comparação entre as diferentes condições experimentais (Newman-Keuls).

A mesma análise estatística foi realizada na análise dos resultados obtidos na avaliação da sobrevivência das células ganglionares após os diferentes tratamentos, sendo que os histogramas são apresentados em percentagem do controle.

4. RESULTADOS

4.1 O efeito protetor da IL-4 é mediado pela ativação da PKA

Analisando estes resultados prévios nos surgiu a pergunta se o efeito da IL-4 envolvia, de alguma forma, a produção de AMPc e conseqüentemente a ativação da proteína cinase A. Tratamos então as culturas com IL-4 na presença de H-89 que é um bloqueador seletivo da proteína cinase A.

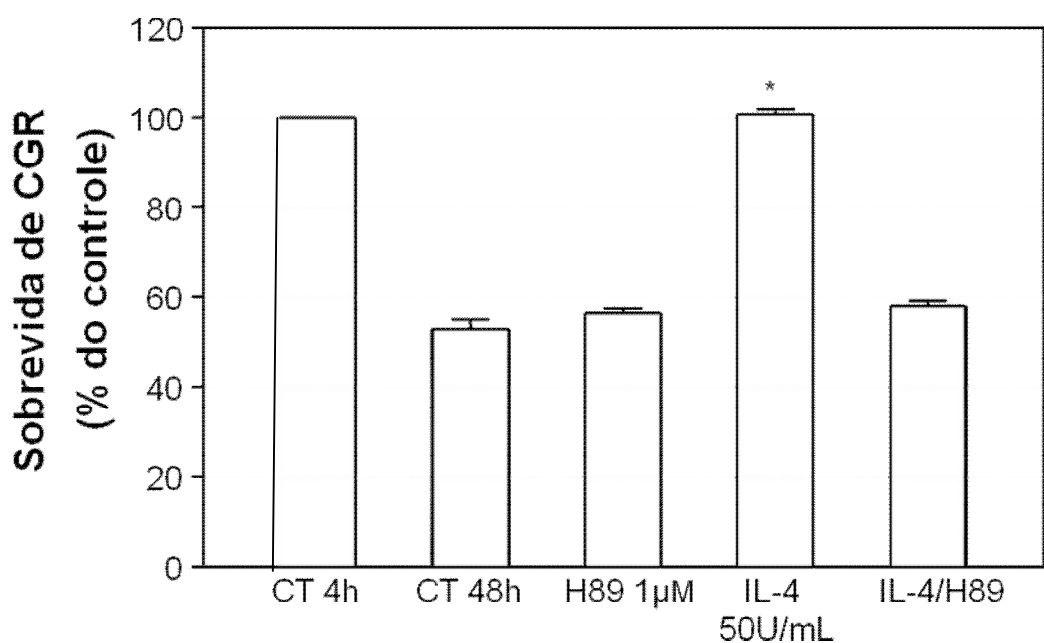


Figura 11. Efeito da IL-4 na presença do inibidor da PKA. As culturas foram tratadas com IL-4 50U/mL e e/ou com 1µM de H89 por 48h. CT: controle; IL-4: Interleucina 4; H89: inibidor da PKA. Os resultados são expressos na forma de médias \pm EPM (erro padrão da média). (n=6-9) *p<0,001 em relação ao controle de 48horas.

O resultado desta experiência mostra que na presença de H-89, na concentração de 1µM, o efeito da IL-4 era totalmente abolido. Esse resultado nos sugeriu que a ativação da proteína cinase A deveria ser um importante passo na via de sinalização da IL-4.

4.2 Concentrações de menor eficácia de IL-4 e forskolina são capazes de aumentar a sobrevivência das células ganglionares da retina de ratos neonatos.

Como havíamos observado que tanto o tratamento com forskolina como o tratamento com a IL-4 era capaz de aumentar a sobrevivência das CGR e suspeitávamos que a via do AMPc desempenhasse um papel chave, decidimos tratar as culturas com subconcentrações de forskolina e IL-4 e analisar o efeito na sobrevivência dessa população neuronal. A figura 12 mostra o resultado destas experiências e podemos observar que ocorre um sinergismo quando tratamos com 5 μ M de forskolina e 0,5U/mL de IL-4, sugerindo que houvesse um aumento nos níveis intracelulares de AMPc quando do tratamento com IL-4 em baixas concentrações.

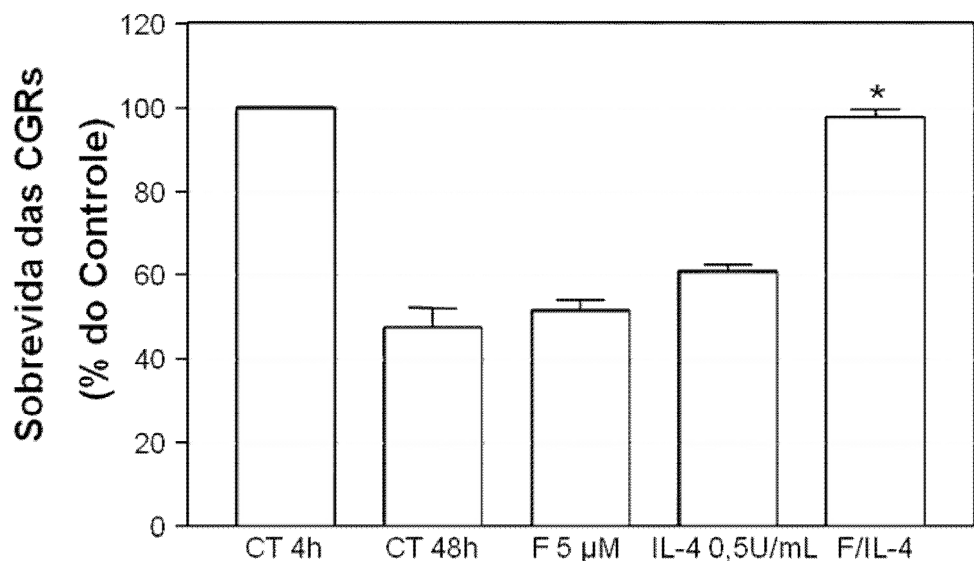
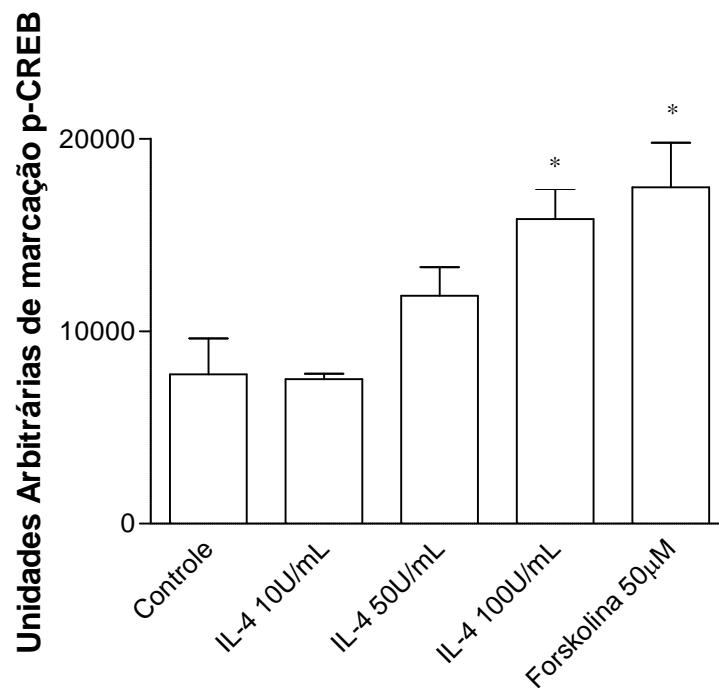


Figura 12. Efeito de concentrações de menor eficácia de forskolina (5 μ M) e IL-4 (0,5 U/mL). As culturas foram tratadas com IL-4 0,5U/mL e/ou com forskolina 5 μ M por 48h. CT: controle; F: forskolina. Os resultados são expressos em médias \pm EPM (erro padrão da média) (n=6-9) *p<0,001 em relação ao controle de 48 horas.

4.3 Estimulação por IL-4 é capaz de aumentar a fosforilação da CREB.

Nossos resultados, obtidos em culturas primárias de células da retina, indicavam que o tratamento com a IL-4 induzia um aumento nos níveis de AMPc e subsequente ativação da proteína cinase A. Para avaliarmos se o tratamento com IL-4 podia aumentar os níveis de AMPc no tecido retiniano, fizemos o tratamento de retinas intactas de animais P4 com diferentes concentrações de IL-4 e analisamos a fosforilação da CREB, já que quem a fosforila é a PKA e esta é ativada pelo AMPc. Para realizar estes estudos utilizamos a técnica de Western blot.

A



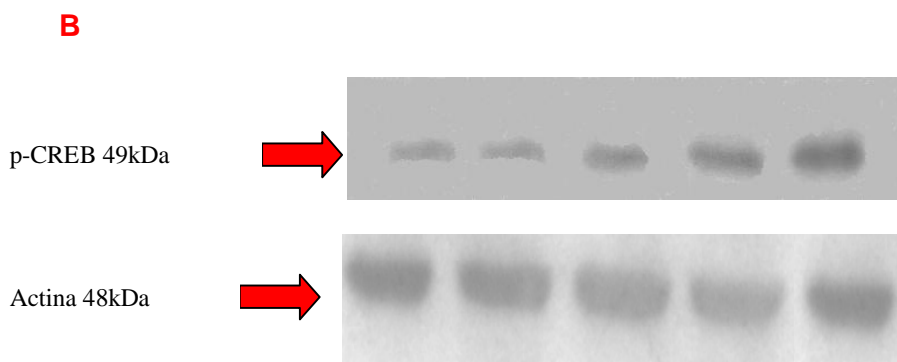


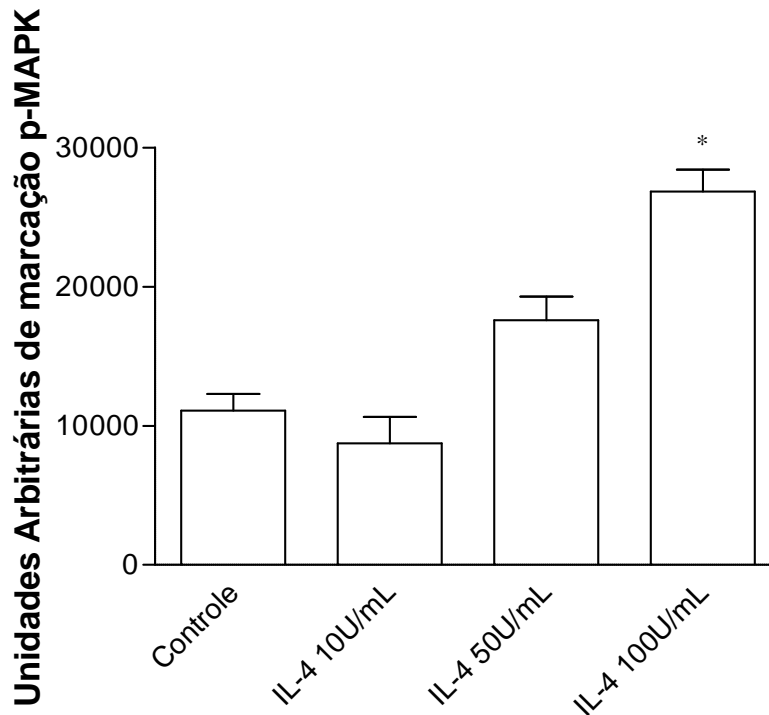
Figura 13. Efeito da IL-4 na estimulação da CREB fosforilada em tecido retiniano com 4 dias pós natais. As retinas foram estimuladas por 15 minutos com IL-4 (10, 50 e 100 U/mL) ou com forskolina 50 μ M. Figura A: Gráfico representativo (em unidades arbitrárias) do efeito da IL-4 na estimulação da CREB. Figura B: Imagem de um filme representativo do efeito da IL-4 na estimulação da CREB. Concentração dos anticorpos: anti-CREB 1:1000; anti-rabbit 1:5000. Os resultados são expressos em médias \pm EPM (erro padrão da média) (n=3-5) *p<0,001 em relação ao controle.

Podemos observar com este resultado que a expressão de CREB fosforilada é aumentada quando tecidos retinianos de ratos neonatos são estimulados por 15 minutos com IL-4 nas concentrações de 50 e 100U/mL. Utilizamos também o tratamento com forskolina (como um controle) e também observamos um aumento na fosforilação desta proteína. Esse resultado vem corroborar experimentos prévios de nosso laboratório que demonstravam a importância do AMPc nesta via de sinalização de sobrevivência.

4.4 A estimulação por IL-4 é capaz de aumentar a fosforilação de MAPK.

Dados da literatura demonstram que o tratamento com a IL-4 é capaz de induzir a ativação da via da MAPK. Essa ativação está envolvida nos efeitos da IL-4 no controle da sobrevivência e da proliferação de diferentes tipos celulares como fibroblastos e células musculares (Bhogal & Bona, 2008). Baseados nestes resultados, estimulamos o tecido retiniano de animais P4, com diferentes concentrações de IL-4 por 15 minutos e analisamos por Western blot a fosforilação da MAPK.

A



B

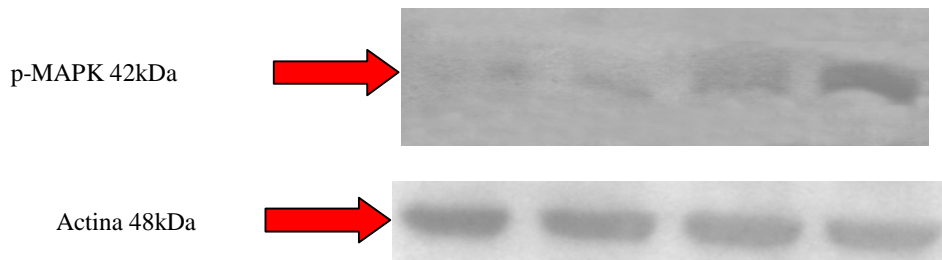


Figura 14. A estimulação com IL-4 é capaz de aumentar a fosforilação de MAPK. As retinas foram estimuladas por 15 minutos com IL-4 em diferentes concentrações (10, 50 e 100 U/mL). Figura A: Gráfico representativo (em unidades arbitrárias) do efeito da IL-4 na estimulação da p-MAPK. Figura B: Imagem de um filme representativo do efeito da IL-4 na estimulação da p-MAPK. O anticorpo anti-p-MAPK foi utilizado na concentração de 1:1000 e o seu secundário, anti-mouse na concentração de 1:5000. Os resultados são expressos em médias \pm EPM (erro padrão da média) (n=3-6) *p<0,001.

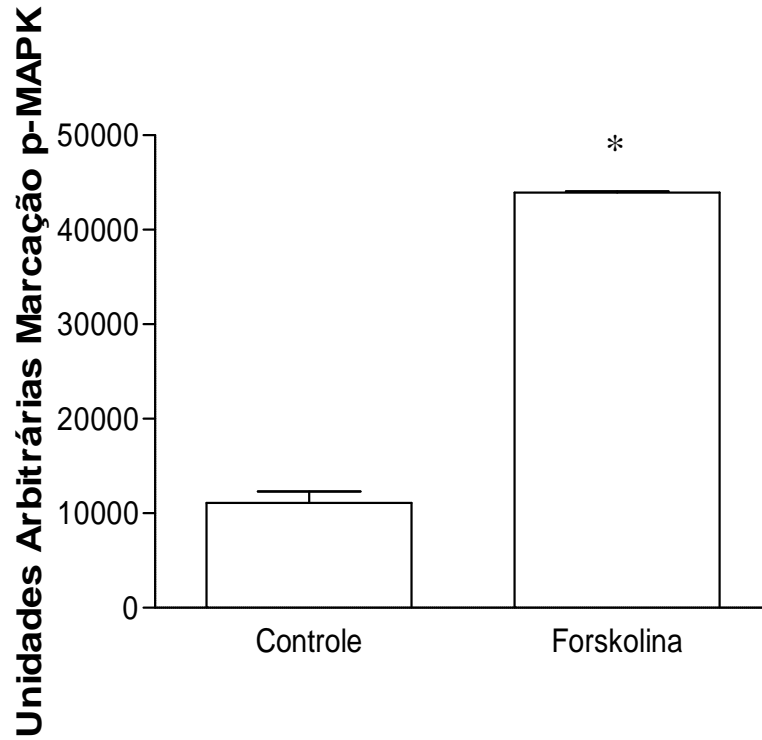
Os resultados apresentados na figura 14 demonstram que o tratamento com IL-4, nas concentrações de 50 e 100U/mL, leva a um aumento significativo na fosforilação da MAPK.

4.5 A fosforilação de MAPK é dependente do AMPc

Como nossos resultados anteriores haviam demonstrado que o tratamento com IL-4 leva ao aumento na sobrevivência das CGR e a um aumento da CREB fosforilada no tecido retiniano, nos perguntamos se o efeito da IL-4 na fosforilação da MAPK também seria mediado por um aumento nos níveis de AMPc. Analisamos então, se o tratamento do tecido retiniano com foskolina induziria um aumento na fosforilação da MAPK. Na figura 15 estão

apresentados os resultados obtidos na fosforilação da MAPK quando o tecido retiniano foi tratado por 15 min com 50 μ M de forskolina.

A



B

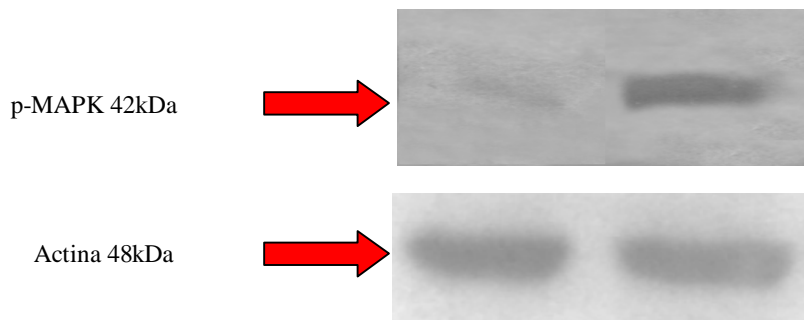


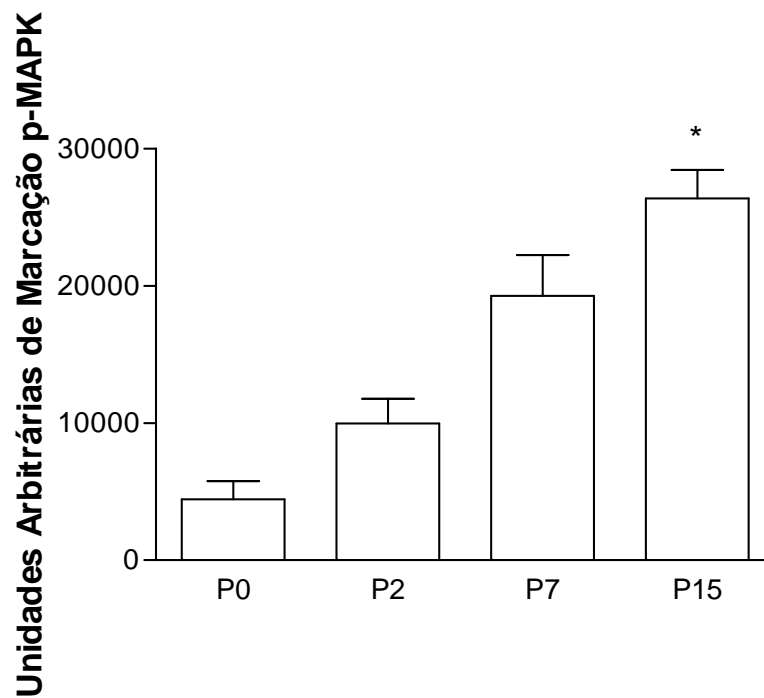
Figura 15. Forskolina é capaz de aumentar a fosforilação de MAPK. As retinas foram estimuladas por 15 minutos com forskolina 50 μ M. Figura A: Gráfico representativo (em unidades arbitrárias) do efeito da IL-4 na estimulação da p-MAPK. Figura B: Imagem de um filme representativo do efeito da forskolina na estimulação da p-MAPK. O anticorpo anti-p-MAPK foi utilizado na concentração de 1:1000 e o seu secundário, anti-mouse na concentração de 1:5000. Os resultados são expressos em médias \pm EPM (erro padrão da média) (n=3-6) *p<0,001.

Como podemos observar, a forskolina também aumenta a fosforilação de MAPK, mostrando um efeito similar àquele observado quando da estimulação com IL-4. Este resultado indica que possivelmente os efeitos promovidos pela IL-4 são mediados por vias que envolvem tanto um aumento nos níveis de AMPc como da fosforilação da MAPK.

4.6 A presença de p-MAPK aumenta durante o desenvolvimento pós-natal.

A partir do resultado anterior, resolvemos traçar um perfil de fosforilação de MAPK ao longo do desenvolvimento pós-natal.

A



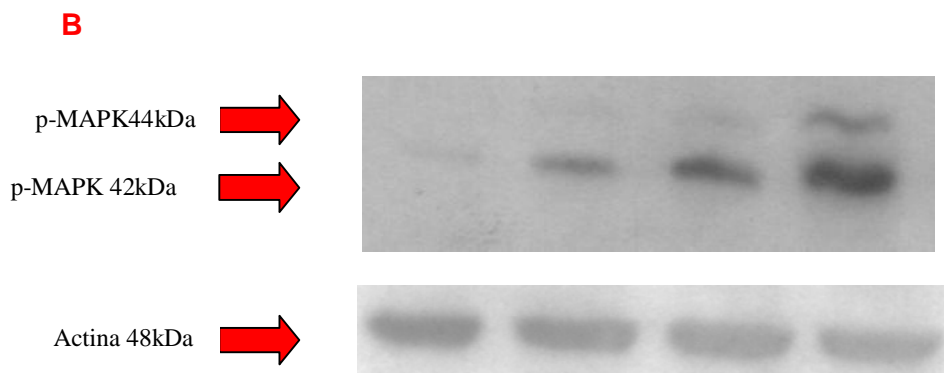


Figura 16. Expressão da p-MAPK ao longo do desenvolvimento pós-natal. As retinas foram dissecadas e colocadas diretamente em tampão de amostras e a presença da p-MAPK foi medida diretamente sem qualquer tratamento. Figura A: Gráfico representativo (em unidades arbitrárias) da presença de p-MAPK em diferentes etapas do desenvolvimento. Figura B: Imagem de um filme representativo da presença de p-MAPK em diferentes etapas do desenvolvimento. O anticorpo anti-p-MAPK foi utilizado na concentração de 1:1000 e o seu secundário, anti-mouse foi usado na concentração 1:7500. Os resultados são expressos na forma de médias \pm EPM (erro padrão da média). (n=3) * $p < 0,001$ em relação a P0.

Nossos resultados demonstram que a fosforilação da MAPK aumenta ao longo do desenvolvimento pós-natal.

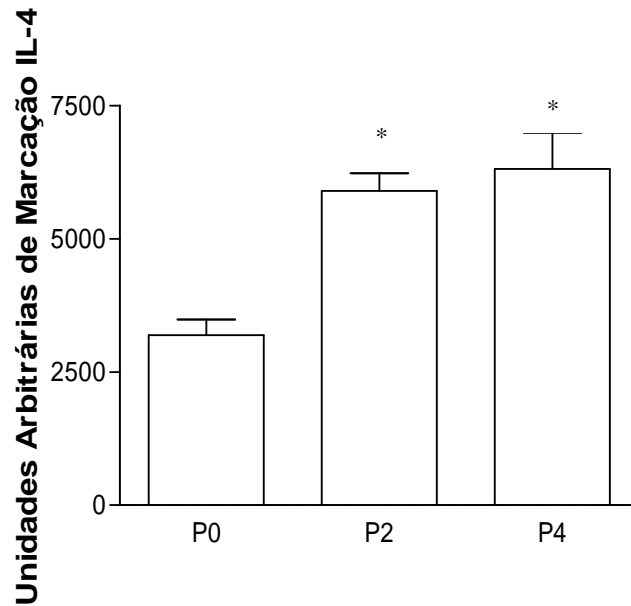
4.7 A expressão de IL-4 entre P0 e P4.

Embora tenhamos estabelecido que as células ganglionares são capazes de responder a estímulos de IL-4 em cultura e que o tecido retiniano também responde a estimulação com IL-4, ainda restava uma dúvida. Existe a presença da molécula de IL-4 na retina? E em caso afirmativo, qual o perfil desta expressão ao longo do desenvolvimento pós-natal?

Para responder a essa pergunta utilizamos a técnica de Western Blot para verificar a presença da interleucina 4 em diferentes idades: P0, P2 e P4. Inicialmente utilizamos estas idades visto utilizarmos animais entre P0 e P1 para obter o tecido retiniano e por termos estabelecido o protocolo de

manutenção das culturas por 48h para avaliação da sobrevivência das CGR após o tratamento com IL-4.

A



B

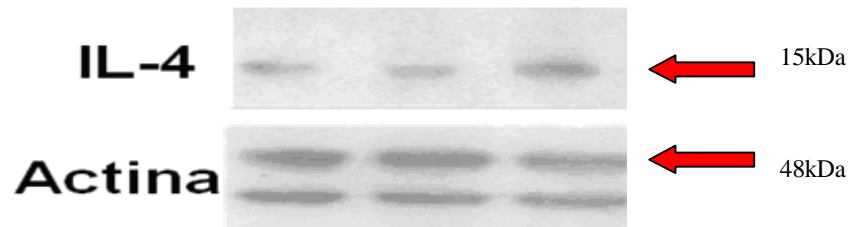


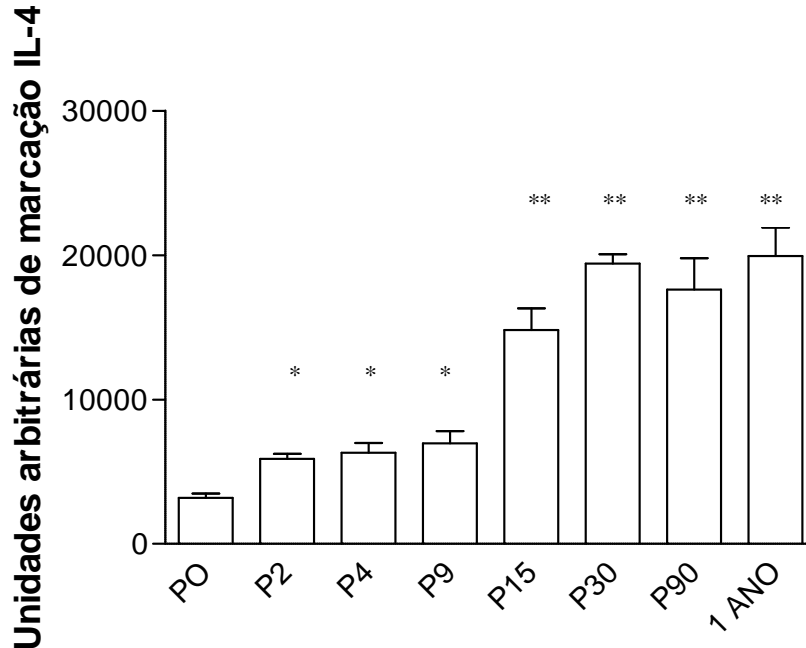
Figura 17. Expressão de IL-4 em retina de ratos neonatos. As retinas foram dissecadas e colocadas diretamente em tampão de amostras, onde foi medida a expressão de IL-4 sem qualquer tratamento. Figura A: Gráfico representativo (em unidades arbitrárias) da presença de IL-4 em diferentes etapas do desenvolvimento. Figura B: Imagem de um filme representativo da presença de IL-4 em diferentes etapas do desenvolvimento. O anticorpo anti IL-4 foi utilizado na concentração de 1:100 e o seu secundário, anti-rabbit foi usado na concentração 1:1000. Os resultados são expressos na forma de médias \pm EPM (erro padrão da média). (n=3)* $p < 0,01$ em relação a P0.

Nossos resultados apresentados na figura 17 demonstram que a IL-4 está sim presente no tecido retiniano e que a expressão desta proteína está ligeiramente aumentada entre P0 e P4.

4.8 A expressão de IL-4 aumenta durante o desenvolvimento.

Como observamos no resultado anterior, os níveis de IL-4 endógenos aumentam durante o período pós natal precoce. Então, resolvemos verificar como seria o padrão desta mesma citocina durante períodos pós-natais mais tardios. Para isso utilizamos as idades P9, P15, P30, P90 e 1 ano afim de descobrir como é esse padrão.

A



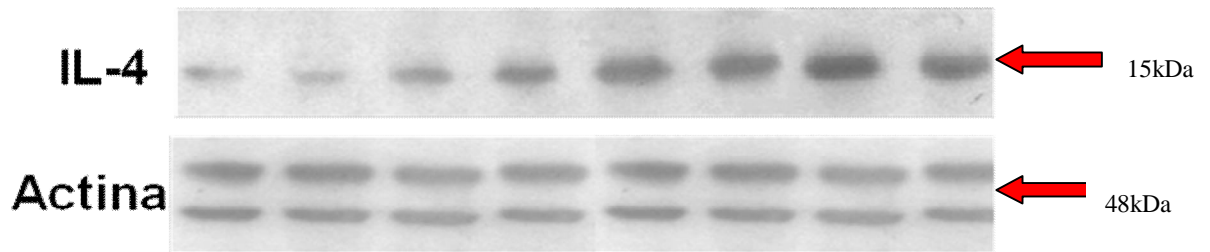
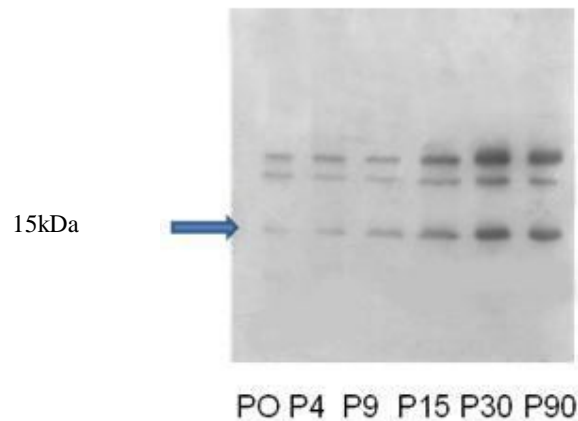
B**C**

Figura 18. A expressão de IL-4 em retina de ratos aumenta com a idade. As retinas foram dissecadas e colocadas diretamente em tampão de amostras, onde foi medida a expressão de IL-4 sem qualquer tratamento. Figura A: Gráfico representativo (em unidades arbitrárias) da presença de IL-4 em diferentes etapas do desenvolvimento. Figura B: Imagem de um filme representativo da presença de IL-4 em diferentes etapas do desenvolvimento. Figura C. Imagem de um filme inteiro representativo da presença de IL-4 e uma proteína de 45kDa em diferentes etapas do desenvolvimento. O anticorpo anti IL-4 foi utilizado na concentração de 1:100 e o seu secundário, anti-rabbit foi usado na concentração 1:1000. Os resultados são expressos na forma de médias \pm EPM (erro padrão da média). (n=3-5) *p<0,01 e **p<0,001 em relação a P0.

A expressão de IL-4 passa por dois picos de aumento ao longo do desenvolvimento. Uma em P2, que caracteriza o dobro da expressão inicial de IL-4. Em P15 há novamente um aumento, agora sendo 4 vezes maior que o valor inicial em P0. Há também uma banda de marcação de 45 kDa, que apresenta exatamente o mesmo perfil da IL-4.

5. DISCUSSÃO

Apesar da interleucina 4 ser uma molécula pleiotrópica e suas ações serem bem caracterizadas em células do sistema imune, seus efeitos no sistema nervoso ainda são bem menos conhecidos. Além disso as vias de sinalização através das quais a IL-4 induz diferentes respostas ainda necessitam ser melhor compreendidas. Neste sentido, o presente trabalho dá seqüência a uma linha de pesquisa já iniciada em nosso laboratório e que analisa os efeitos da IL-4 na sobrevivência das células ganglionares da retina.

Analisando os efeitos da IL-4 no sistema nervoso podemos observar que ao longo das últimas décadas vários trabalhos demonstraram a ação desta interleucina em eventos relacionados ao desenvolvimento tais como: a proliferação celular (Barna et al., 1995; Estes et al., 1993), a diferenciação celular (Brodie & Goldreich, 1994), o controle da sobrevivência neuronal (Araujo & Cotman, 1993; Sholl-Franco et al., 2001), a modulação do arranjo do citoesqueleto e do fenótipo de células gliais (Wirjatijasa et al., 2002), dentre outros.

Especificamente analisando o efeito desta citocina na sobrevivência neuronal já foi a ela atribuído um efeito neuroprotetor de grande importância na fisiologia do sistema nervoso. O tratamento com IL-4 induz um aumento dose-dependente na sobrevivência de neurônios hipocámpais de embriões de ratos em cultura (Araujo & Cotman, 1993). Estudos recentes mostram ainda que a transfecção gênica da IL-4 mediada por adenovírus (Ad.IL-4) aumenta a

sobrevida das células ganglionares da retina após a axotomia (Koeberle et al., 2004).

Dados prévios do nosso laboratório demonstram que o tratamento de culturas de células da retina com IL-4, leva a um aumento na sobrevida das células ganglionares. Este efeito é dose-dependente, mediado pela atividade colinérgica muscarínica, mais especificamente de receptores M1, e pela atividade proliferativa das células mantidas em cultura (Sholl-Franco et al., 2001). Igualmente já havia sido caracterizado pelo nosso grupo que o tratamento crônico com forskolina induzia um aumento na sobrevida das CGR. Este efeito também era dose-dependente, mediado pelos receptores M1 da acetilcolina e pela atividade proliferativa em cultura (Santos & Araujo, 2001). Como havia uma semelhança entre os dois resultados decidimos analisar a participação do AMPc no efeito trófico da IL-4 sobre as células ganglionares, já que a forskolina é um ativador da enzima adenil ciclase que leva a um aumento nos níveis de AMPc.

Nossos resultados demonstraram que na presença de um inibidor seletivo da PKA (H89 na concentração de 1 μ M) o efeito da IL-4 era totalmente bloqueado. Também observamos que o tratamento concomitante, com sub-concentrações de forskolina e IL-4, induzia aumento na sobrevida das CGR. Este resultado demonstrou uma potenciação dos efeitos da IL-4 pela forskolina indicando que ambas utilizam uma via de sinalização comum que leva ao aumento na sobrevida das CGR. Em nossa hipótese a via comum deveria ser à relacionada ao aumento nos níveis de AMPc. Corroborando nossa hipótese, recentemente foi demonstrado que o tratamento com IL-4 aumenta os níveis de AMPc em explantes de retinas de camundongos C57/bl6 (da Silva et al., 2007).

Futuros estudos serão por nós desenvolvidos para analisar o aumento dos níveis de AMPc após o tratamento com IL-4. Resultados bastante preliminares mostram que a IL-4 é capaz de aumentar significativamente os níveis de AMPc em retinas de animais P1-P2.

Ao analisarmos o efeito da IL-4 na fosforilação da CREB no tecido retiniano de animais P4 observamos que após 15 min de estimulação ocorre aumento nos níveis desta proteína. Como o aumento da sobrevida das células ganglionares induzido pela IL-4 parece estar relacionado ao aumento nos níveis de AMPc este resultado nos sugeriu que este aumento na CREB fosforilada fosse devido a este segundo mensageiro através da ativação da PKA. Futuramente pretendemos inibir a enzima adenilato ciclase na presença de IL-4 para averiguar se de fato a fosforilação da CREB envolve um aumento na produção de AMPc. Também pretendemos avaliar a seqüência temporal de ativação da CREB após o tratamento com IL-4.

Dados prévios da literatura mostram que uma das vias ativada após o tratamento com IL-4 é a da MAPK. Boghal e colaboradores demonstraram em fibroblastos que a IL-4 é capaz de ativar a via da MAPK e essa via estava relacionada ao aumento na sobrevida e proliferação destas células (Boghal et al., 2008). Também Wei e colaboradores mostraram que a IL-4 é capaz de aumentar a divisão celular da musculatura lisa. Este efeito é mediado pelas vias da MAPK, PKA e PI3K que levam a um aumento na produção da enzima ornitina descarboxilase (ODC) o que justifica o aumento na proliferação observado (Wei et al., 2008).

Baseados nestes resultados averiguamos se o tratamento com a IL-4 leva a um aumento nos níveis da MAPK fosforilada. Nossos resultados corroboram os dados da literatura mostrando que a IL-4 induz um aumento na fosforilação da MAPK. Um resultado que nos chamou atenção foi o fato da forskolina também ter induzido um aumento na fosforilação da MAPK. Como a literatura apresenta um número muito reduzido de dados sobre as vias de sinalização estimuladas pela IL-4 ficamos sem a possibilidade de comparar nossos resultados com dados prévios. Entretanto, pretendemos analisar através de um estudo farmacológico a cascata de sinalização que leva ao aumento na MAPK fosforilada após o tratamento com a IL-4.

É interessante ressaltar que na maioria das vezes a via da MAPK está relacionada com proliferação celular, e que em nosso modelo experimental não observamos efeito proliferativo induzido pelo tratamento com a IL-4 na presença de soro fetal bovino (Silva, 2006). Entretanto, resultados prévios do nosso laboratório mostram que a IL-4 é capaz de potencializar o efeito proliferativo do FGFb em cultura de retinas de ratos neonatos (Silva, 2006). Como a IL-4 é capaz de regular a síntese de outras citocinas tais como a IL-8 (Bonocchi et al., 2000) e de receptores para IL-1 (Pousset et al, 2001) é possível que o mesmo esteja acontecendo em nossas culturas e leve à potenciação do efeito do FGFb na proliferação celular. Assim, futuros estudos serão necessários para que se possa caracterizar os efeitos da IL-4 no controle da proliferação de células da retina.

Tem sido descrito a ativação de CREB dependente da atividade da MAPK. Esta fosforilação ocorreria através das proteínas RSK-2 que fosforilariam a CREB no resíduo serina 133. Um tipo celular em que esta via

está presente são as células PC12 (Xing et al, 1996). Não podemos excluir a ativação desta via em nosso sistema pois não fizemos experiências em que a via da MAPK fosse inibida e nesta condição fizéssemos o tratamento com IL-4 e avaliássemos a fosforilação da CREB.

Tem sido analisada a expressão da MAPK em retinas de roedores. Por imunohistoquímica demonstrou-se que essa proteína está presente na sua forma fosforilada/ativada na retina de ratos adultos e que a marcação está distribuída nas diversas camadas da retina (Kikuchi et al, 2000). Foi também realizado um estudo analisando a presença da MAPK fosforilada, em diferentes regiões do sistema visual de ratos, sem porém variar a expressão de MAPK total (Oliveira et al., 2008). Nossos resultados estão em acordo com os previamente publicados mostrando que há um aumento dos níveis desta proteína no período de abertura dos olhos.

Nossos resultados mostram claramente o papel da IL-4 no controle da sobrevivência das CGR e também demonstram que na idade em que nossos experimentos são realizados existe a expressão desta proteína no tecido retiniano. Este resultado realmente é muito interessante. É surpreendente que não somente exista a presença da molécula como que sua expressão aumente ao longo do desenvolvimento. De forma ainda mais interessante é que este aumento tem um pico no décimo quinto dia pós-natal que mais ou menos equivale a abertura dos olhos. Desta maneira podemos sugerir que a IL-4 tenha um papel regulador da sobrevivência desses neurônios durante o desenvolvimento. Silva e colaboradores em 2007 demonstraram a presença da IL-4 e de seu receptor em fotorreceptores da retina de camundongos. Dados prévios do nosso laboratório demonstram que culturas de células gliais

respondem à IL-4. Assim, procuraremos identificar em cortes histológicos da retina de ratos quais as populações que expressam esta citocina.

A interleucina 4 parece ser bem regulada ao longo do desenvolvimento pós-natal, e uma prova disso é o seu primeiro pico de aumento entre P0 e P2, que pode estar relacionado com os primeiros estágios do desenvolvimento e diferenciação da retina. Um dado que nos causou grande interesse foi o fato da expressão da IL-4 apresentar um pico em P15 e manter níveis elevados durante a vida adulta. É provável que o aumento da expressão desta proteína esteja associado ao seu efeito neuroprotetor, pois a abertura dos olhos faz com que haja um aumento na atividade elétrica no tecido retiniano e este aumento na excitabilidade pode, se não for bem controlado, levar a condições propícias à degeneração neuronal. Corroborando esta hipótese de neuroproteção, estudos nos quais pacientes com Alzheimer são tratados com inibidores da acetilcolinesterase, evidenciam um aumento na produção de IL-4. Como a IL-4 é capaz de inibir as respostas inflamatórias da microglia ativada, este pode ser um mecanismo de ação que leve a diminuição da morte neuronal (Lugaresi et al., 2004).

Ao mesmo tempo em que observamos um aumento na expressão da IL-4 durante o desenvolvimento pós-natal, outros pesquisadores demonstraram que a expressão desta citocina ocorre em maior quantidade em idades precoces (Lovett-Racke et al., 2000). Além disso, a expressão de seus receptores também está documentada em períodos mais precoces do desenvolvimento em diversas áreas do cérebro, como córtex e cerebelo (Sawada et al, 1995). Esses trabalhos não analisaram a expressão no tecido

retiniano e talvez nesta região do sistema nervoso ocorra uma diferença no perfil desta proteína.

Alguns artigos citam a importância da IL-4, no hipocampo, e sua distribuição. Maher e colaboradores mostraram que com o envelhecimento, os níveis de IL-4 são reduzidos, sendo assim reduzida também a fosforilação e ativação da via JAK/STAT. Esses efeitos implicam em redução da memória e deficiência na formação de LTP (Maher et al., 2005).

Um dado que nos chamou atenção ao analisarmos a especificidade da marcação da IL-4, conforme mostrado na figura 18C, observamos duas bandas fortemente marcadas. Uma delas com 15kDa e outra com 40kDa. Inicialmente pensamos que a proteína de 40kDa fosse correspondente a forma pro desta interleucina. Entretanto, não conseguimos encontrar na literatura respaldo para esta hipótese. Como o perfil de expressão dessas duas proteínas é exatamente o mesmo acreditamos que haja realmente um aumento da expressão desta citocina relacionado com o desenvolvimento do tecido.

Analisando nossos resultados em conjunto podemos sugerir que a interleucina 4 desempenhe um importante papel neuroprotetor durante o desenvolvimento do tecido retiniano. Claro está, que esta não é a única citocina capaz de desempenhar este papel, mas como existe o aspecto de redundância na ação das citocinas, a IL-4 poderia ter uma importante função na homeostasia do tecido retiniano.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados nos permitem concluir que:

A interleucina 4 está presente na retina de ratos, e sua expressão aumenta ao longo do desenvolvimento pós-natal;

Essa citocina é responsável pelo aumento da sobrevivência das células ganglionares *in vitro*, e utiliza uma via comum à via ativada pela forskolina, ou seja a via do AMPc;

O tratamento com IL-4 induz um aumento na fosforilação das proteínas CREB e MAPK;

A interleucina 4 deve desempenhar um importante papel na homeostasia do tecido retiniano em diferentes etapas do desenvolvimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, D.M. AND COTMAN, C.W. (1993) Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. *Brain Res.*, v. 600 (1), p. 49-55.

ARAUJO, E.G. AND LINDEN, R. (1990) Survival of retinal ganglion cells *in vitro*: the effect of conditioned medium from retinal cell aggregates. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.23 (8), p. 743-746.

ARAUJO, E.G. AND LINDEN, R. (1993) Trophic factors produced by retinal cells increase the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* v.5 (9), p. 1181-1188.

AWATSUJI, H.; FURUKAWA, Y.; HIROTA, M.; MURAKAMI, Y.; NII, S.; FURUKAWA, S.; HAYASHI, K. (1993) Interleukin-4 and -5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes. *J. Neurosc. Res.*, v.34, p. 539-545.

BARNA, B.P.; ESTES, M.L.; PETTAY, J.; IWASAKI, K.; ZHOU, P.; BARNETT, G.H. (1995) Human astrocyte growth regulation: interleukin-4 sensitivity and receptor expression. *J. Neuroimmunol.*, v.60, p. 75-81.

BEAR, M.F., CONNORS, B.W. & PARADISO, M.A. (2002) Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Ed. Artmed 2ª edição.

BERZAGHI, M.P., COOPER, J., CASTRÉN, E., ZAFRA, F., SOFRONIEW, M., THOENEN, H. and LINDHOLM, D. (1993) Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not

neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J. Neurosci.* v.13, p. 3818-3826.

BHOGAL, R.K. AND BONA, C.A. (2008) Regulatory Effect of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) on Type I Collagen Synthesis in Human Dermal Fibroblasts Stimulated by IL-4 and IL-13. *International Reviews of Immunology.* v.27 (6), p. 472-496.

BOCKER-MEFFERT, S.; ROSENSTIEL, P. AND ROHL, C. (2002) Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* v.43, p. 2021–2026.

BONECCHI,R., FACCHETTI,F., DUSI,S., LUINI,W., LISSANDRINI,D., SIMMELINK,M., LOCATI,M., BERNASCONI,S., ALLAVENA,P., BRANDT,E., ROSSI,F., MANTOVANI,A. & SOZZANI,S. (2000) Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J.Immunol.*, 164, 3862-3869.

BOULAY, J.L. AND PAUL, W.E. (1992) The interleukin-4-related lymphokines and their binding to hematopoietin receptors. *J Biol Chem.* v.267 (29), p. 20525-20528.

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

BRODIE, C.; GOLDREICH, N. (1994) Interleukin-4 modulates the proliferation and differentiation of glial cell. *Journal of Neuroimmunology*, v.55, p. 91-97.

BRODIE, C., GOLDREICH, N.; HAIMAN, T.; KAZIMIRSKY, G. (1998) Functional IL- 4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocytes activation and induces NGF secretion. *J. Neuroimmunol.*, v. 81, p. 20-30.

BUSS, R.R., SUN, W. & OPPENHEIM. (2006) Adaptative roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci.* v.29, p. 1-35.

BUTOVSKY, O; ZIV, Y.; SCHWARTZ, A.; LANDA G.; TALPALAR, E.A.; PLUCHINO, S.; MARTINO, G.; SCHWARTZ, M. (2005) Microglia activated by IL-4 and IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* v.31, p. 149-160.

CARTER D.A.; AGUAYO, A.J.; BRAY, G.M. (1991) Retinal ganglion cell terminals in the hamster superior colliculus: an ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.*, v.311, p. 97-107.

CEPKO, C. L. (1993) Retinal cell fate determination. *Prog. In: Progress in neural research. Pergamon Press, Retinal Res.*, v.12, p. 1-12.

CEPKO, C. L.; DYER, M. A. (2001) Regulating proliferation during retinal development. *Neuroscience*, vol. 2, p. 333-342.

CHOI, P. AND REISER, H. (1998) IL-4: role in disease and regulation of production. *Clin Exp Immunol.* v.113 (3), p. 317-319.

CHOWDHURY, I., THARAKAN, B. AND BHAT, G.K. (2006) Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol. Biol. Lett.* v.11 (4), p. 506-525.

CHURCH, M.K., OKAYAMA, Y. AND BRADDING, P. (1994) The role of the mast cell in acute and chronic allergic inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* v.725, p. 13-21.

CORRÊA, G. R.; SANTOS, A. A.; FONTES, C. F. L. AND ARAUJO, E. G. (2005) Ouabain induces an increase of retinal ganglion cell survival in vitro: The involvement of protein kinase C. *Brain Res.* v.1049, p.89-94.

COWAN, W. M. (1979) Selection and control in neurogenesis. *The Neuroscience 4th Study Program.* Cambridge: MIT Press.

COWBURN, R. F.; FOWLER, C. J.; O'NEIL, C. (1996) Neurotransmitters, signal transduction and second-messengers in Alzheimer's disease. *Acta. Neurol. Scand.,* v. 165, p. 25 - 32.

DA SILVA, A.G., CAMPELLO-COSTA, P., LINDEN, R. AND SHOLL-FRANCO, A. (2008) Interleukin-4 blocks proliferation of retinal progenitor cells and increases rod photoreceptor differentiation through distinct signaling pathways. *J Neuroimmunol.* v.196 (1-2), p. 82-93.

DOMINGOS, P.M. & STELLER, H. (2007) Pathways regulating apoptosis during patterning and development. *Curr Opin Genet Dev.* v.17(4), p. 294-299.

DOWLING, J. E. (1991) "Retina." *Enc. Hum. Biol.* v.6, p. 615-631.

ELLIOT, K., NINAMI, N., KOLESNIKOV, Y.A., PASTERNAK, G.W. AND INTURRISI, C.E. (1994) The NMDA receptor antagonists, LY 274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, *N*^G-nitro-L-arginine attenuate

analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to the kappa opioids. *Pain* v.56, p. 69–75.

ELMORE, S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* v.35, p. 495

ESTES, M.I.; IWASAKI, K.; JACOBS, B.S.; BARNA, B.P. (1993) Interleukin-4 downregulates adult human astrocytes DNA synthesis and proliferation. *Am. J. Pathol.*, v.143, p. 337-341.

FARBER, D.; ADLER, R. (1986) Issues and questions in cell biology of the retina. In Farber, D. and Adler, R. (eds): *The Retina. A model for Cell Biology Studies. Part I. Academic Press Inc. (London) Ltd.*, p. 2 - 16.

FINNEY, M.J.; GUY, G.; MICHELL, R.H.; GORDON, J.; DUGAS, B.; RIGLEY K.P.; CALLARD, R.E. (1990) Interleukin 4 activates human B lymphocytes via transient inositol phospholipid hydrolysis and delayed cyclic adenosine monophosphate generation. *Eur. J Immunol*, v.20, p. 151-156.

FIorentino, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWANR, M.;

O'HARA, A. (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*, v.147, p. 3815-3822.

FRANCIPANE, M.G., ALEA, M.P., LOMBARDO, Y., TODARO, M., MEDEMA, J.P. AND STASSI, G. (2008) Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res.* v.68 (11), p. 4022-4025.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, v.16, p. 225.

GUIMARÃES, C.A. & LINDEN, R. (2004) Programmed cell death

Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* v.271, p. 1638–1650.

HAMBURGER, V.; OPPENHEIM, R. W. (1982) Naturally occurring neuronal death in vertebrates. *Neurosci. Comment.*, v. 1, p. 39 - 55.

HELEWSKI, K.J., KOWALCZYK-ZIOMEK, G.I, KONECKI, J. (2006) Apoptosis and necrosis: two different ways leading to the same target *Wiad Lek.* v.9 (9-10), p. 679-684.

HOMMA, K., KORIYAMA, Y. MAWATARI, Y., KOSAKA AND J. KATO, S. (2007) Early downregulation of IGF-I decides the fate of rat retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Neurochem Int.* v.50 (5), p. 741-748.

IWASAKI, K.; ROGERS, L.R.; ESTES, M.L.; BARNA, B.P. (1993) Modulation of proliferation and antigen expression of a clonal human glioblastoma by Interleukin-4 alone and in combination with tumor necrosis factor- α and/or Interferon- γ . *Neurosurg.*, v.33, p. 489-494.

JELKMANN, W. & METZEN, E. (1996) Erythropoietin in the control of red cell production. *Anat. Anz.* v.178, p. 391 – 403.

JEONG, S.Y. & SEOL, D.W. (2008) The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* v.41 (1), p. 11-22.

JOHNSON, J.E. (1999) Neurotrophic factors. In: Zigmond et al. (eds): Fundamental neuroscience. Chapter 21 *Academic Press* (San Diego, USA), p.611-635.

KAPLAN, M.H.; SCHINDLER, U.; SMILEY S.T.; GRUSBY, M.J. (1996) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, v.4, p. 313-319.

KAJTA, M. (2004) Apoptosis in the nervous system: mechanisms and protective strategies. *Pol. J. Pharmacol.* v.56 (6), p. 689-700.

KEEGAN, A.D.; PIERCE, J.H. (1994) The interleukin-4 receptor: signal transduction by a hematoitin receptor. *J. Leucocyte.*, v. 55, p. 272-279.

KIKUCHI, M., TENNETI, L., LIPTON, S.A. (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* v.20, p. 5037–5044.

KILIC, U; KILIC, E.;SOLIZ, J. BASSETTI, C. I.; GASSMANN, M. AND HERMANN, D. M. (2005) Erythropoietin protects from axotomy- induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/2. *FASEB J.* n.19, v.2, p.249-251.

KNUSEL, B.; GAO, H. (1996) Neurotrophins and Alzheimer's disease: beyond the cholinergic neurons. *L. Sci.*, v. 58, n° 22, p. 2019 - 2027.

KOEBERLE, P.D.; GAULDIE, J., BALL, A.K. Effects of adenoviral- mediated gene transfer of interleukin-10, interleukin-4 and transforming growth factor-beta on the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Neuroscience*, v.125, 903-920, 2004.

LAPORTE, S.L., JUO, Z.S., VACLAVIKOVA, J., COLF, L.A., QI, X., HELLER, N.M., KEEGAN, A.D. AND GARCIA, K.C. (2008) Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell*. v.132 (2), 259-272.

LEBLANC, A.C. (2003) Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. v.27(2), p. 215-29.

LEE, J.D.; RHOADES, K.; ECONOMOU, J.S. (1995) Interleukin-4 inhibits the expression of tumor necrosis factor alpha and beta, interleukins-1 beta and -6 and interferon-gama. *Immunology and Cell Biology*, v.73, p. 57-61.

LEONARD, W.J.; O'SHEA, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol*, v.16, p. 29.

LEWIS, C.C., SUTHERLAND, E.R., MOSS, T.A., METZE, T.L., REX, M.D. AND KRAFT, M. (2003) Interleukin-4 and interleukin-13 augment the proliferative effect of dexamethasone on distal lung fibroblasts. *Chest*. v.123 (3 suppl.), p. 356.

LI, J.H., SHAO, J.Z., XIANG, L.X. AND WEN, Y. (2007) Cloning, characterization and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: the first evidence of Th2-type cytokine in fish. *Mol Immunol*. v.44 (8), p. 2078-2086.

LINDEN, R., MARTINS, R.A. AND SILVEIRA, M.S. (2005) Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. v.24 (4), p. 457-491.

LINDEN, R. AND PERRY, V.H. (1982) Ganglion cell death within the developing retina: a regulatory role for retina dendrites? *Neurosci.*, v.11, p. 2813-2827.

LOVETT-RACKE, A.; SMITH, M. E.; ARREDONDO, L. R.; BITTNER, P. S.; RATTS, R. B.; SHIVE, C. L.; FORSTHUBER, T. G.; RACKE, M. K. (2000) Developmentally regulated gene expression of TH2 cytokines in the brain. *Brain res.*, v. 870, p. 27-35.

LUGARESI, A., DI LORIO, A., IARLORI, C. REALE, M., DE LUCA, G., SPARVIERI, E., MICHETTI, A., CONTI, P.M., GAMBI, D., ABATE, G. AND PAGANELLI, R. (2004) IL-4 *in vitro* production is upregulated in Alzheimer's disease patients treated with acetylcholinesterase inhibitors. *Experimental Gerontology*. v.39 (4), p. 653-657.

MAHER, F.O., NOLAN, Y. AND LYNCH, M.A. (2005) Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. *Neurobiol. Aging*. v.26 (5), p. 717-728.

MAIURI, M.C., ZALCKVAR, E. KIMCHI, A. AND KROEMER, G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. v.8 (9), p. 741-752.

MARTI, H. H.; WENGER, R. H. AND RIVAS, L. A. (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur. J. Neurosci*. v.8, p. 666 – 676.

MATTSON, M. P.; FURUKAWA, K. (1996) Programmed cell life: anti-apoptotic signaling and therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Res. Neurol. Neurosci.*, v. 9, p. 191 - 205.

MCKAY C.E.; CUSHLEY, W. (1996) Induction of Cd25 expression in human B lymphocytes by pharmacological mimetics of signaling pathways. *Cytokine*, v.8, p. 305-312.

MCKAY C.E.; HEWITT, E.L.; OZANNE, B.W.; CUSHLEY, W. (2000) A functional role for interleukin (IL)-4-driven cyclic AMP accumulation in human B lymphocytes. *Cytokine*, v. 12, p. 731-736.

MESULAN, M.M. (1978) Tracing neural connections with horseradish peroxidase. Jonh Willey and Sons. *New York*, 251.

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

MORI, N.; SHIRAKAWA, F.; MURAKAMI, S.; ODA, S.; ETO, S. (1995) Interleukin-4 inhibits the production of interleukin-1 by adult T-cell leukemia cells. *European Journal of Hematology*, v.55, p. 121-125.

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

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

NUNTAPRASERT, A. MORI, Y., FUJITA, K., YOUNEDA, M., MIURA, R. TSUKIYAMA-KOHARA, K. AND KAI, C. (2005) Expression and purification of recombinant swine interleukin-4. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* v.28(1), p. 17-35.

ODBILEG, R., LEE, S.I., YOSHIDA, R., CHANG, K.S., OHASI, K., SUGIMODO, C. AND ONUMA, M. (2004) Cloning and sequence analysis of llama cytokines related to cell-mediated immunity. *Vet Immunol Immunopathol.* v.99 (1-2), p. 1-10. Corrected and republished in: *Vet Immunol Immunopathol.* (2004) v.102 (1-2), p. 93-102.

OKADO, N. & OPPENHEIM, R. W. (1984) Cell death of motoneurons in chick embryo spinal cord. IX. The loss of motoneurons following removal of afferent inputs. *J. Neurosci.* v.4, p. 1639-1652.

OLIVEIRA, C.S., RIGON, A.P., LEAL, R.B. AND ROSSI, R.M. (2008) The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *Int. J. Devl Neuroscience.* v.28, p. 355-362.

OPPENHEIM, R. W. (1981) Neuronal cell death and some related regressive phenomena during neurogenesis. A selective historical review and progress report. In: Cowan, W. M. (ed): *Studies in Developmental Neurobiology. Essay in Honor of Victor Hamburger*, NY: Oxford Univ. Press., pp. 74 - 133.

OPPENHEIM, R. W. (1999) Programmed Cell Death. Fundamental neuroscience – Zigmond, et al. *Academic Press*, p. 581-609.

OSLON, L., BÄCKMAN, L., EBENDAL, T., JÖNHAGEN, M. E., HOFFER, B., HUMPEL, C., FREEDMAN, R., GRACOBINI, M., MEYERSON, B., NORDBERG, A., SEIGER, A., STRÖMBERG, I., SYDOW, O., TOMAE, A., TROC, K. AND WINBLAD, B. (1994) Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system; clinical experiences with NGF in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neurol.*, v. 241, p. 12 - 15.

PALUDAN, S.R. (1998) Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol.* v.48 (5), p. 459-468.

PARK, K.W.; LEE, D.Y. JOE, E.H.; KIM, S.U.; JIN, B.K. (2005) Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *j. Neurosci. Res.*, v.81, p. 397-402.

PAUL, W.E. (1987) Interleukin 4/B cell stimulatory factor 1: one lymphokine, many functions. *FASEB J.* v.1 (6), p. 456-461.

PAUL, W.E. (1991) Interleukin 4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*, v.77, p. 1859-1872.

PEREIRA, S.P.F. & ARAUJO, E.G. (1997) Veratridine increases the survival of retinal ganglion cells *in vitro*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.30, p. 1467-1470.

PONOMAREV, E.D., MARESZ, K., TAN, Y. AND DITTEL, B.N. (2007) CNS derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation

and induces a state of alternative activation in microglial cells. *The J. of Neurosci.* v.27 (40), p. 10714-10721.

POUSSET,F., CREMONA,S., DANTZER,R., KELLEY,K.W. & PARNET,P.

(2001) IL-10 and IL-4 regulate type-I and type-II IL-1 receptors expression on IL-1 beta-activated mouse primary astrocytes. *J.Neurochem.*, 79, 726-736.

RABACCHI, S.A.; ENSINI, M.; BONFANTI, L.; GRAVINA, A. AND MAFFEI, L.

(1994) Nerve growth factor reduces apoptosis of axotomized retinal ganglion cells in the neonatal rat. *Neurosci.*, v.63, p. 969-973.

RAJU, T.R.; BENNETT, M.R. (1986) Retinal ganglion cell survival requirements: A major but transient dependence on Müller glia during development. *Brain Res.*, v.383, p. 165-176.

REESE, B.E.; COLELLO, R.J. (1992) Neurogenesis in the retinal ganglion layer of the rat. *Neurosci.*, v. 46, p. 419-429.

REMÉ, C.E., WOLFRUM, U., IMSAND, C. HAFEZI, F. AND WILLIAMS, T.P.

(1999) Photoreceptor autophagy: effects of light history on number and opsin content of degradative vacuoles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* v.40 (10), p2398-2404.

RENGARAJAN, J., SZABO, S.J. AND GLIMCHER, L.H. (2000) Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today.* v.21 (10), p.479-483.

ROTHWELL, N.J. AND LUHESHI, G. (1994) Pharmacology of interleukin-1 actions in the brain. *Adv Pharmacol.* v.25, p. 1-20.

ROTHWELL, N. J.; LUHESI, G. N.; TOULMOND, S. (1996) Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology and pathology., *Pharmacol. Ther.*, v.69, p. 85-95.

RYAN, J.J.; MCREYNOLDS, L.J.; KEEGAN, A.; WANG, L.H.; GARFEIN, E.; ROTHMAN, P.; NELMS, K.; PAUL, W.E. (1996) Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity*, v.4, p. 23-132.

SANTOS, A. A. & ARAUJO, E. G. (2000) The effect of PKC activation on the survival of rat retinal ganglion cells in culture. *Brain Research*. v.853, p.338-343.

SANTOS, R. C. & ARAUJO, E.G. (2001) Cyclic AMP increases the survival of ganglion cells in mixed retinal cell cultures in the absence of exogenous neurotrophic molecules, an effect that involves cholinergic activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* n. 34, v.12, p.1585-1593.

SAWADA, M.; SUZUMURA, A.; MARUNOUCHI, T. (1995) Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 13 (3-4), p. 253-264.

SHIMODA, K., VAN DEURSEN, J., SANGSTER, M.Y., SARAWAR, S.R., CARSON, R.T., TRIPP, R.A., CHU, C., QUELLE, F.W., NOSAKA, T., VIGNALI, D.A., DOHERTY, P.C., GROSVELD, G., PAUL, W.E. AND IHLE, J.N. (1996) Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* v.380 (6575), p. 630-633.

SHOLL-FRANCO, A.; FIGUEIREDO, K. G. A. AND ARAUJO, E. G. (2001) Interleukin- 2 and interlukin-4 increase the survival of retinal ganglion cells in culture. *Neuroreport*. v.12 (22), p. 109-112.

SHOLL-FRANCO, A., MARQUES, P.M., FERREIRA, C.M. AND ARAUJO, E.G. (2002) IL-4 increases GABAergic phenotype in rat retinal cell cultures: involvement of muscarinic receptors and protein kinase C. *J. Neuroimmunol.* v.133 (1-2), p. 20-29.

SILVA, G.M. DA (2006) IL-4 modula a resposta proliferativa induzida por FBFb em células da retina. Dissertação submetida à Universidade Federal Fluminense.

STEINKE, J.W. AND BORRISH, L. (2006) Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.117 (2 suppl mini-primer), p. 441-445.

TAKANO, Y., FUKAGAWA, K., SHIMMURA, S., TSUBOTA, K., OGUCHI, Y. AND SAITO, H. (1999) IL-4 regulates chemokine production induced by TNF-alpha in keratocytes and corneal epithelial cells. *Br. J. Ophthalmol.* v.83 (9), p. 1074-1076.

TODARO, M.M PEREZ, A.M., SCOPELLITI, A., MEDEMA, J.P. AND STASSI, G. (2008) IL-4-mediated drug resistance in colon cancer stem cells. *Cell. Cycle.* v.7 (3), p. 309-313.

TORRES, P. M. M.; & ARAUJO, E. G. (2001) Interlukin-6 increases the survival of retinal ganglion cells in vitro. *J. of Neuroimmunology.* v.117, p. 43-50.

TSAI, C.T., LAI, L.P., KUO, K.T., HWANG, J.J., HSIEH, C.S., HSU, K.L., TSENG, C.D., TSENG, Y.Z., CHIANG, F.T., AND LIN, J.L. (2008). Angiotensin II activates signal transducer and activators of transcription 3 via Rac1 in atrial myocytes and fibroblasts — implication for the therapeutic effect of statin in atrial structural remodeling. *Circulation* v.117, p. 344–355.

VAN ROON, J.A., LAFEBER, F.P. AND BIJLSMA, J.W. (2001) Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* v.44 (1), p. 3-12.

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

WEI, L.H., YANG, Y., WU, G. AND IGNARRO, L.J. (2008) IL-4 and IL-13 upregulate ornithine decarboxylase expression by PI3K and MAP kinase pathways in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* v.294 (5), p. 1198-1205.

WEISHAUPT, J. H.; ROHDE, G.; POLKING, E.; SIREN, A. L.; EHRENREICH, H. AND BÄHR, M. (2004) Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invets. Ophthalmol. Visual Sci.* v.45, p. 1514–1522.

WIRJATIJASA F.; DEGHANI, F.; BLAHETA R.A.; KORF, H.W.; HAILER, N.P. Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.* V.68, 579-587, 2002.

WUSTER, A.L.; RODGERS, V.L.; WHITE, M.F.; ROTHSTEIN, T.L.; GRUSBY M.J. (2002) Interleukin-4- mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *The Journal of Biological Chemistry*, v.277, p. 27169-27175.

XING, J., GINTY, D.D AND GREENBERG, M.E (1996) coupling of the RAS-MAPK pathways to gene activation by RSK2, a Growth factor-regulated CREB kinase. *Science*. v.273, p. 959-963.

YAGINUMA, H., SATO, N., HOMMA, S. AND OPPENHEIM, R.W. (2001) Roles of caspases in the programmed cell death of motoneurons in vivo. *Arch Histol Cytol*. v.64 (5), p. 461-474.

ZHIVOTOVSKY, B. (2004) Apoptosis, necrosis and between. *Cell Cycle*. V.3 (1), p.64-66.

ZAMORANO, J.; WANG, H.Y.; WANG, L.M.; PIERCE, J.H.; KEEGAN, A.D. (1996) IL-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway. *J.Immunol.*, v.157, p. 4926-4934.

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](#)