

MAITHE ARRUDA CARVALHO

**MODULAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO E MORTE
CELULAR POR HOP/STI1 NA RETINA EM
DESENVOLVIMENTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2007**

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Maithe Arruda Carvalho

**Modulação de Proliferação e Morte Celular
por HOP/STI1 na Retina em
Desenvolvimento**

Orientadores: Prof^a Luciana Barreto Chiarini

Prof Rafael Linden

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

Rio de Janeiro, 2007

Carvalho, Maithe Arruda

Modulação de proliferação e morte celular por HOP/ST11 na retina em desenvolvimento / Maithe Arruda Carvalho. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2007.

xii, 125 f. : il. ; 31 cm

Orientadores: Luciana Barreto Chiarini e Rafael Linden

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2007.

Referências bibliográficas: f. 109-125

1. Retina – crescimento & desenvolvimento. 2. Morte celular. 3. Proliferação de células. 4. Animais recém-nascidos. 5. Ratos. 6. Camundongos. 7. Ciências Biológicas (Biofísica) - Tese. I. Chiarini, Luciana Barreto. II. Linden, Rafael. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-

Agradecimentos

Existem certas etapas da vida que, por conseguir completar a travessia, tem-se muito a agradecer. Temo que estas palavras não sejam o suficiente para expressá-lo.

A Angela, René e Renée, por serem meu mundo e me certificarem de que meu mundo irá me acompanhar onde eu estiver; através das minhas escolhas e não apesar delas. Sem vocês eu nada teria.

À Luciana, pela preocupação e dedicação, pelo olhar singular e pelo apoio constante. Ao Gui-gui, por me emprestar sua mãe em tantas discussões em que ela poderia estar prestando atenção nele.

Ao Rafael, por ter me convidado ao seu laboratório e me dado a oportunidade de crescer tanto; por compartilhar sua visão e conhecimento comigo em todos esses anos, pela inspiração, confiança e pela enorme generosidade.

À Mariana, sempre presente, que me cedeu muito mais do que suas mãos nos meus picos de tendinite, pela amizade dentro e fora do laboratório, pela perspicácia, por ser você.

Ao Brian, por me lembrar constantemente de ter fé na bondade das pessoas, pelo sorriso otimista, por estar sempre disposto a ajudar, por todas as conversas sobre vinhos e Truffaut, e tantas outras, pela amizade.

À Tatiana, que dividiu comigo muito mais que uma bancada e uma proteína, por atravessar comigo todos os momentos difíceis, impassível, sempre me apoiando – porque quando não se tem uma saída a gente improvisa.

À Mona, por todas as conversas definitivas, por ser minha amiga e sempre me trazer à realidade sem deixar que ela me sugasse, pelo caráter e pela honestidade, pelas piadas, por estar lá.

À Talita, sempre disposta a atender apelos de mais que última hora, pela dedicação e profissionalismo, pelas risadas e companheirismo; por confiar em mim.

À Thaís, que chegou iluminando um pouco mais o laboratório e inspirando seus veteranos a acreditar mais em si mesmos.

Ao Bruno, por ser tão transparente e genuíno na sua paixão pela ciência.

Ao Nilson, Gildo e Tibúrcio, pilares silenciosos deste trabalho sem os quais nada disso teria sido possível.

A todos os membros do Laboratório de Neurogênese de hoje e de sempre: Alfred, Camila, Carol, Céulen, Ciça, Erlich, Gabi, Hilda, Juliana, Lucianne, Rachel, Rafael

Mariante, Roberta, Rodrigo, Sebastián, Tamara e Vinícius, que sem exceção contribuíram em diversos momentos e de forma fundamental a este trabalho.

Aos membros dos laboratórios de Neuroquímica e Neurobiologia da retina, onde executei quase metade do meu mestrado, muito obrigado pelas ajudas constantes e pela generosidade com a qual sempre fui recebida, vocês fazem com que eu me sinta em casa.

Aos membros do Laboratório de Agregação de Proteínas e Amiloidoses (LAPA) e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Ludwig por toda a ajuda na purificação de Hop/ST11.

RESUMO

Hop/STI1 é uma proteína de 66kDa originalmente descrita como uma co-chaperona que atua como proteína adaptadora para complexos de chaperonas Hsp70/Hsp90. Esta proteína está presente na membrana de neurônios e foi descrita como parceira da proteína príon celular na modulação de eventos de morte celular e diferenciação celular. Neste trabalho investigamos a expressão de Hop/STI1 na retina de ratos neonatos e o papel desta co-chaperona na modulação de proliferação celular na retina em desenvolvimento e de morte celular em duas subpopulações retinianas: células pós-mitóticas indiferenciadas e células ganglionares. Utilizamos como ferramentas Hop/STI1 purificada e um anticorpo dirigido a esta proteína, anti-STI1. Hop/STI1 está presente na retina de rato neonato e é mais expressa na retina durante o desenvolvimento do que no tecido adulto. Anti-STI1 tem efeito neuroprotetor independente de PrP^C na morte celular induzida por anisomicina na camada neuroblástica da retina. Este efeito não envolve as vias de AMPc/PKA, PI3K ou PKC. Hop/STI1 não tem efeito protetor na morte das células ganglionares induzida por axotomia. Anti-STI1 bloqueia a morte das células ganglionares de forma independente de PrP^C, AMPc/PKA, ERK, PI3K ou PKC. Hop/STI1 tem efeito anti-proliferativo na retina em desenvolvimento. Tratamento com anti-STI1 aumenta a proliferação no tecido retiniano. Ambos efeitos de Hop/STI1 e de anti-STI1 na modulação da proliferação celular independem de príon celular. Concluímos que Hop/STI1 tem um papel na modulação de morte celular e proliferação celular na retina, eventos cruciais no desenvolvimento do tecido, período em que Hop/STI1 tem seu pico de expressão.

ABSTRACT

Hop/STI1 is a 66kDa protein originally described as a co-chaperone adaptor protein for Hsp70/Hsp90 complexes. Hop/STI1 is found on neuronal cell surface and is a cellular prion protein (PrP^C) partner in modulating cell death and differentiation. Here, we investigated Hop/STI1 expression in neonatal rat retina and studied its role in modulating cell proliferation and cell death in the developing retina. For this purpose purified Hop/STI1 and an antibody raised against Hop/STI1 – anti-STI1 – were used. Hop/STI1 is ubiquitously expressed in neonatal rat retina. Hop/STI1 is more expressed in the developing retina than in the mature tissue. We investigated Hop/STI1 modulation of cell death of two retinal subpopulations: undifferentiated post mitotic cells in the neuroblastic layer (NBL) and ganglion cells. Anti-STI1 protects cells in the NBL from anisomycin induced cell death through a PrP^C independent mechanism. cAMP/PKA, PI3K and PKC signaling pathways were not involved in this protection. Hop/STI1 does not protect ganglion cells against axotomy induced cell death. Anti-STI1 blocks ganglion cell death in a PrP^C independent manner. cAMP/PKA, ERK, PI3K nor PKC signaling pathways were involved in this effect. Treatment with Hop/STI1 reduces proliferation in the developing retina. Anti-STI1 increases proliferation in this tissue. Neither effects involve cellular prion protein. Therefore, Hop/STI1 modulates proliferation and cell death in the developing retina. These events are crucial to development, a period in which Hop/STI1 is most expressed.

Lista de Abreviaturas:

AMPC – adenosina 3', 5' – monofosfato cíclico
ANI – anisomicina
Apaf – *Apoptosis Activating Factor*
ATP – adenosina trifosfato
BDNF – *Brain Derived Growth Factor*
BSA - *Bovine Serum Albumine*
CAD – *Caspase Activated DNase*
CED – *genes cell death abnormal*
CJD - *Creutzfeldt-Jacob Disease*
CREB - *Cyclic AMP Response Element (Cre)- Binding protein*
CTR – controle
DNA – ácido desoxirribonucléico
EGF - *Epidermal Growth Factor*
Epac – *Exchange Protein directly Activated by cAMP*
ERK - *Extracellular signal-Regulated protein Kinase*, proteína cinase regulada por sinais extracelulares
GCL – *Ganglion Cell Layer*, camada de células ganglionares
GEF - *GTP-Exchange Factor*
GPI – glicosilfosfatidilinositol
IGF1 - *Insulin-like Growth Factor 1*
HEK - *Human Embryo Kidney*, linhagem celular de rim de embrião humano
HOP - *Hsp70/Hsp90 Organizing Protein*
Hsp – *heat shock protein*, proteína de choque térmico
ICE - *Interleucin 1 β Converting Enzyme*; enzima conversora de interleucina 1 β
IL1 β - interleucina 1 β
INL – *Inner Nuclear Layer*, camada nuclear interna
IPL – *Inner Plexiform Layer*, camada plexiforme interna
JNK - *c-Jun N-Terminal Kinase*
MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*, proteína cinase ativada por mitógeno
MAPKAP-K1 - *Mapk-Activated Protein Kinase-1*
MAPKK - *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*
MAPKKK - *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase*
MCP – morte celular programada
NBL – *Neuroblastic Layer*, camada neuroblástica
NGF – *Nerve Growth Factor*, fator de crescimento de neurônios
NvCJD – *new variant of the Creutzfeld-Jacob Disease*
ONL – *Outer Nuclear Layer*, camada nuclear externa
OPL – *Outer Plexiform Layer*, camada plexiforme externa
PACAP - *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide*
PDK1 - *3'-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1*
PH - domínio *Plekstrin Homology*
PI – fosfatidilinositol
PI3K - *Phosphoinositide-3 Kinase*
PKA – *Protein Kinase A*, proteína cinase ativada por AMPC
PKB (Akt) - *Protein Kinase B*, proteína cinase B
PrP^C – proteína príon celular

PrP^{Sc} – isoforma scrapie da proteína príon celular

SNC – sistema nervoso central

ST11 - *stress-inducible protein 1*

TdT - enzima terminal desoxinucleotil transferase

TPR – *tetratricopeptide domain*

TSE – *Transmissible Spongiform Encephalopathy*, encefalopatia espongiforme transmissível

TUNEL – *Terminal dUTP-biotin nick end-labeling*

Este trabalho foi realizado com os seguintes apoios financeiros: CNPq, FAPERJ e
FAPESP.

ÍNDICE:

INTRODUÇÃO	1
1. A retina como modelo de estudo	1
2. Proliferação e diferenciação celular no tecido retiniano.....	6
3. Sinalização de vida e de morte.....	9
3.1 AMPc.....	13
3.2 PI3K e PKB.....	17
3.3 A via das MAPK.....	21
3.4 PKC	25
4. Hop/STI1	27
4.1 Funções intracelulares: Chaperonas e Hop/STI1	28
4.1 Funções extracelulares: Novos parceiros de Hop/STI1	32
OBJETIVOS.....	36
METODOLOGIA.....	37
RESULTADOS.....	47
1. Desenvolvimento e Hop/STI1.....	47
2. Hop/ STI1 e modulação da morte celular programada.....	49
2.1 Hop/ STI1 e células pós-mitóticas indiferenciadas da retina.....	49
2.1.1 Neuroproteção na camada neuroblástica.....	49
2.1.2 PrP ^C como possível parceira de anti-STI1 na NBL	53
2.1.3 Anti-STI1 e vias de sinalização na NBL	55
2. 2 Hop/ STI1 e células diferenciadas da retina.....	60
2. 2. 1 Hop/ STI1 e anti-STI1 e células ganglionares.....	60
2.2.2 PrP ^C como possível parceira de anti-STI1 na GCL	64

2.2.3 Anti-STI1 e vias de sinalização na GCL	66
3. Hop/STI1 e células proliferantes.....	72
3.1 Efeito de Hop/STI1 na modulação da proliferação celular na retina em desenvolvimento	72
3.2 PrP ^C como possível parceira de Hop/STI1 no seu efeito anti-proliferativo na retina.....	76
3.3 Anticorpo anti-STI1 e proliferação na retina de camundongos	80
DISCUSSÃO.....	82
1 Envolvimento de Hop/STI1 na modulação de morte celular programada independente de PrP ^C	83
2 Sinalização e controle da morte celular programada na NBL por Hop/STI1.....	85
3 Sinalização e Proteção de células ganglionares por anti-STI1.....	88
4 Hop/STI1 e modulação da proliferação na retina.....	92
5 Efeito de Hop/STI1 na proliferação na retina em desenvolvimento é independente de PrP ^C	95
6 Vias de Sinalização e Hop/STI1.....	96
7 Outros parceiros de Hop/STI1.....	97
8 Um anticorpo como ferramenta.....	101
9 Anti-STI1: agonista ou bloqueador?.....	104
10. Hop/STI1 na retina em desenvolvimento.....	106
CONCLUSÕES.....	108
BIBLIOGRAFIA.....	109

INTRODUÇÃO

1. A retina como modelo de estudo

A retina é uma estrutura pertencente ao sistema nervoso central (SNC). O desenvolvimento embrionário desta estrutura tem origem bilateral na parte ventrolateral da vesícula prosencefálica, de onde surgem as vesículas ópticas, visíveis em ratos a partir do 11^o dia de gestação (E11) (figura 1). As vesículas ópticas se expandem em E12 mantendo o contato com a vesícula prosencefálica através do chamado pedúnculo óptico. Ainda em E12 elas sofrem uma invaginação que forma o cálice óptico e nele duas camadas celulares, precursoras do epitélio pigmentar e da retina (Barnstable, 1987).

Os processos de invaginação da vesícula óptica e diferenciação da retina apresentam uma sobreposição temporal, visto que o primeiro neurônio pós-mitótico surge em E13 em ratos (Barnstable, 1987). A diferenciação tem seu início no cálice óptico central, progredindo para a periferia até a região que posteriormente formará a íris, como visto em aves (Prada et al, 1991).

A diferenciação das células retinianas segue uma ordem histogenética determinada em retina de camundongo (Young, 1985), que é conservada de mamíferos a vertebrados inferiores. As células ganglionares são as primeiras a se diferenciar, seguidas de fases de surgimento sobrepostas de células horizontais, fotorreceptores do tipo cone, células amácrinas, fotorreceptores do tipo bastonete, bipolares e por último as células gliais de Muller (figura 2). A retinogênese ocorre prioritariamente em uma zona proliferativa, a camada neuroblástica (Young, 1985; Marquardt e Gruss, 2002 para revisão). A organização laminar da retina, ao contrário do córtex cerebral, se forma das camadas mais superficiais para as mais

profundas, ou seja, da GCL para a camada de fotorreceptores – interno-externo (Barnstable, 1987).

Em ratos neonatos, existem duas camadas celulares, a camada de células ganglionares (*Ganglion Cell Layer*, GCL) e a camada neuroblástica (*Neuroblastic Cell Layer*, NBL), e uma camada contendo os dendritos das células ganglionares, a camada plexiforme interna (*Inner Plexiform Layer*, IPL) (Figura 2 A). Nesta idade há uma camada celular em formação, na porção interna da NBL, com células amácrinas em processo de diferenciação que irão posteriormente formar a camada nuclear interna (*Inner Nuclear Layer*, INL).

A retina adulta possui três camadas celulares bem definidas, GCL, INL e a camada nuclear externa (*Outer Nuclear Layer*, ONL), composta principalmente por fotorreceptores que surge na porção externa da NBL, mais próxima ao epitélio pigmentar (Figura 2 B). A INL é separada da ONL, em ratos, a partir do quarto ou quinto dia pós-natal (P4-P5), quando se forma a segunda camada de prolongamentos da retina adulta, a camada plexiforme externa (*Outer Plexiform Layer*, OPL).

O modelo experimental utilizado no laboratório é o de retina de ratos e camundongos. Neste trabalho utilizamos principalmente retinas de roedores neonatos no modelo de explantes de retina *in vitro*. Este modelo, por manter uma estrutura tridimensional histotípica, está mais próximo de uma situação fisiológica (Linden et al, 1999).

Dados do laboratório mostram que a axotomia das células ganglionares causada pela preparação dos explantes provoca morte celular com padrão apoptótico em dois dias em cultura (com o pico de perfis picnóticos com um dia *in*

vitro), semelhante ao resultado *in vivo* de uma secção do nervo óptico em ratos neonatos (Rehen et al, 1993), atestando a validade do modelo.

O tratamento dos explantes de retina com inibidores de síntese protéica como anisomicina e cicloheximida é capaz de bloquear a morte das células ganglionares, induzindo, no entanto, morte nas células da camada neuroblástica. Estes resultados apontam para um programa diferencial de morte celular nas duas populações. Enquanto, para morrer, as primeiras necessitam da síntese de proteínas de morte, as últimas parecem apresentar um programa latente de morte celular programada, normalmente bloqueado por proteínas repressoras (Rehen e Linden, 1994). Verificou-se que as células da NBL que morriam por efeito dos inibidores eram células pós-mitóticas indiferenciadas (Rehen et al, 1999).

Outros trabalhos do laboratório mostraram que o aumento dos níveis intracelulares de AMPc (provocado pelo ativador de adenilil ciclase forskolina) era capaz de bloquear a morte celular induzida por inibição da síntese de proteínas na NBL de ratos neonatos (Rehen et al, 1996). O quadro de morte celular induzida por axotomia das células ganglionares, neste modelo, não é alterado pela variação nos níveis de AMPc.

O modelo de explantes de retina confere componentes de diversidade de tipo celular e estágio de diferenciação ao estudo da biologia celular. A facilidade de obtenção, manipulação e reprodutibilidade dos dados experimentais neste modelo fazem dele um excelente veículo para estudo. Os trabalhos anteriores do laboratório montaram uma base fértil para o estudo da modulação da proliferação e da morte celular, ambos alvos do presente trabalho.

Figura 1:

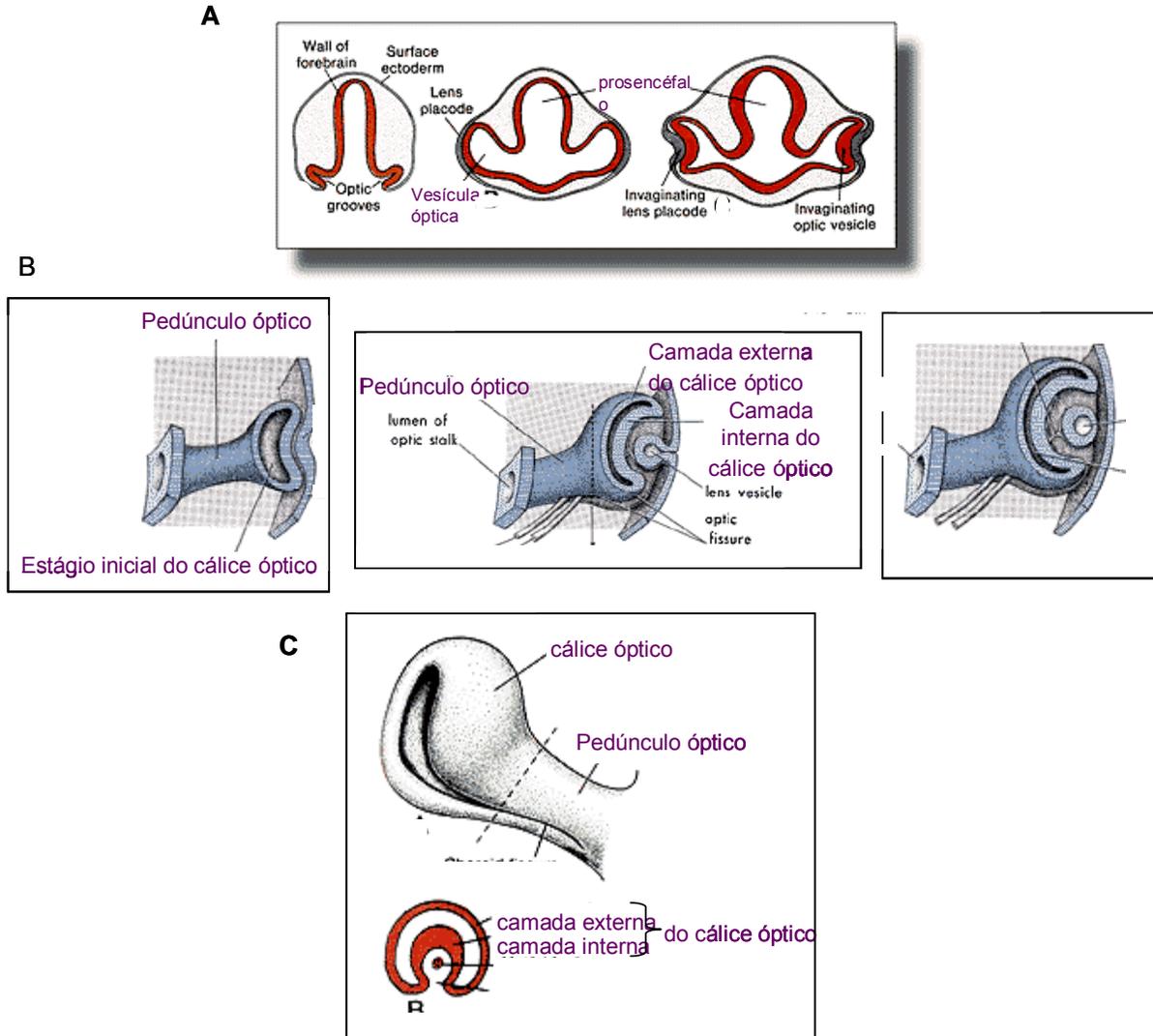


Figura 1: Esquemas ilustrativos do desenvolvimento da retina. Em **A** o surgimento das vesículas ópticas a partir da vesícula prosencefálica. Em **B** a formação do cálice óptico pela expansão da vesícula óptica. Em **C** o cálice e pedúnculo ópticos em outra representação. Figuras modificadas de <http://www.vision.ca/eye/o.cup.l.vesicle.html>

Figura 2:

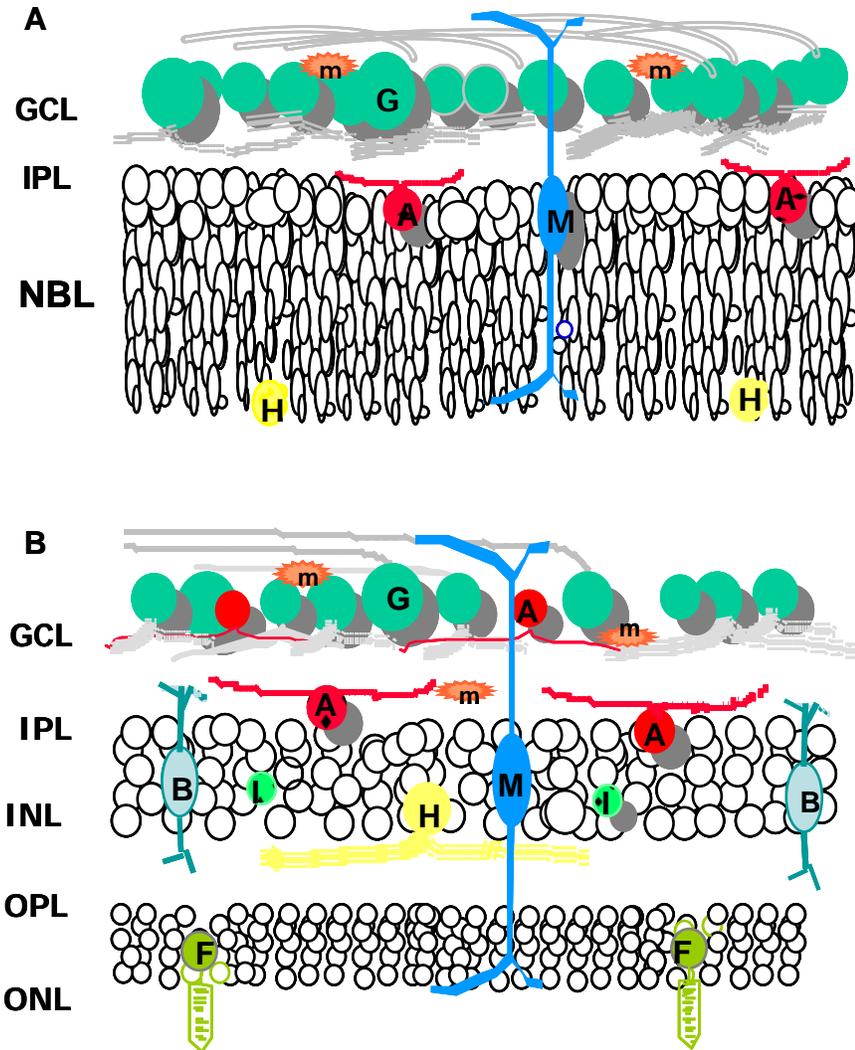


Figura 2: Esquema da retina de ratos neonatos (A) e ratos adultos (B). GCL: camada de células ganglionares, IPL: camada plexiforme interna, NBL: camada neuroblástica, INL: camada nuclear interna, OPL: camada plexiforme externa, ONL: camada nuclear externa. Os tipos celulares estão representados como G: células ganglionares, m: microglia, A: células amácricas, B: células bipolares, M: células de Muller, H: células horizontais, I: células interplexiformes, F: fotorreceptores.

2. Proliferação e diferenciação celular no tecido retiniano

Para que um tecido maduro funcional seja formado a partir de progenitores multipotentes algumas etapas são necessárias: os tipos celulares precisam ser produzidos na proporção adequada, se diferenciarem corretamente, assumirem localização correta no tecido e fazer conexões apropriadas.

Cepko e colaboradores entendem o processo de desenvolvimento – os estágios que levam ao comprometimento final de uma célula - como uma seqüência de 'estados de competência' da célula, onde esta 'competência' seria a habilidade de responder a determinados sinais do ambiente para gerar um ou alguns tipos celulares específicos (Cepko et al, 1996).

O estado de competência é determinado por um conjunto de fatores de transcrição, que produz uma coorte de receptores e elementos de transdução de sinais que tornam a célula apta para responder ao ambiente externo. A transição de um estado para outro é unidirecional, e o comprometimento é obtido quando fatores extrínsecos estabilizam a maquinaria celular a um ponto que ela não é mais dependente de sinais externos para prosseguir com a diferenciação. Esta transição pode ocorrer por pistas extrínsecas ou por um programa intrínseco (Cepko et al, 1996).

Na retina, diferentes tipos celulares são gerados na mesma janela temporal a partir de progenitores multipotentes (Donovan e Dyer, 2005). Fatores extrínsecos precisam guiar o destino de diferenciação destas células. Ao mesmo tempo, as células precisam estar em um estado competente para interpretar corretamente estes sinais, o que precisa ser regulado por fatores intrínsecos.

A transição dos estados de competência destes progenitores para gerar a proporção correta de tipos celulares retinianos ocorreria por uma variação nos seus conjuntos de fatores de transcrição (Cepko et al, 1996). Para direcionar a formação do olho em um estágio mais precoce um componente região ou tecido-específico destes fatores intrínsecos é necessário. Os genes homeobox pax6, six3, rx/Rax, chx10, optx2/six6 e prox1 provêm este componente e têm papel crítico na formação do olho e na regulação da proliferação celular de precursores retinianos (Levine e Green, 2004).

Genes homeobox como Pax6 representariam um estágio inicial do processo de diferenciação, mais relacionado a fornecer uma 'identidade retiniana' aos progenitores da retina. O passo seguinte, dependente de pax6, seria dado pela expressão diferencial de fatores de transcrição do tipo hélice-alça-hélice (bHLH), que restringiriam os destinos que a célula poderia tomar (Marquadt e Gruss, 2002). Esta sinalização ainda possui componentes extracelulares como EGF, inibição lateral por Notch-Delta e Sonic Hedgehog (Dyer e Cepko, 2001a; Marquadt e Gruss, 2002).

O ciclo celular é composto de 4 fases: G1, S, G2 e M. A transição e execução destas fases é regulada por complexos de cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e ciclinas, que têm expressão cíclica na célula de acordo com a fase do ciclo celular (Morgan, 1997; figura 3). A atividade destes complexos ciclina-CDK é regulada por síntese e proteólise de ciclinas, fosforilação e por inibidores (cyclin-dependent kinase inhibitor, CKIs) (Morgan, 1997). As CKIs possuem duas famílias: Cip/Kip (p21cip1, p27kip1, p57kip2) envolvida no controle de G1 e da transição G1/S; e Ink4 (p15Ink4a, p16Ink4b, p18Ink4c, p19Ink4d), que compete com ciclinas D pela ligação a CDKs (Vidal e Koff, 2000).

Um exemplo deste controle se dá na transição de G1. Esta é regulada pela proteína Rb. Durante G1, em um sinal dependente de mitógenos, complexos CDK4/CDK6-ciclina D fosforilam pRb, liberando o fator de transcrição E2F que transcreve genes necessários à progressão G1-S, como ciclinas E e A (Weinberg, 1995). Desta forma, o balanço dos níveis de expressão de ciclinas, CDKs e CKIs determina escolhas de entrada, continuação ou saída do ciclo celular. A regulação destes níveis, por sua vez, é função do estado de competência da célula e dos fatores extrínsecos aos quais ela será exposta.

Figura 3:

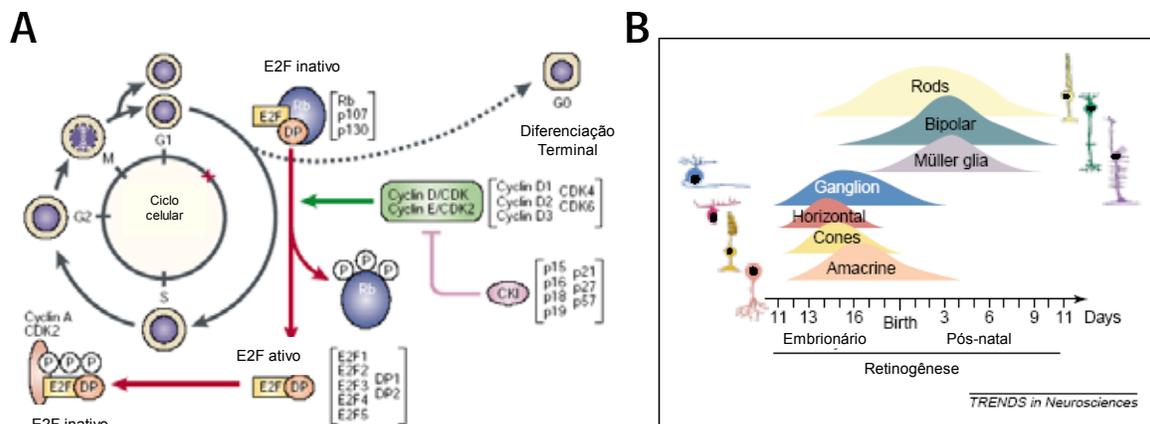


Figura 3: Ciclo celular e diferenciação celular na retina. Em A esquema ilustrativo do controle da passagem G1-S do ciclo celular. A fosforilação de pRB por complexos ciclina-CDK o inativa, liberando o fator de transcrição E2F para transcrever genes relacionados ao início da fase S. Modificado de Dyer e Cepko, 2001. Em B, esquema da ordem histogenética conservada de surgimento dos tipos celulares retinianos em camundongo. O primeiro tipo celular a se diferenciar é o das células ganglionares, seguido de horizontais, cones, células amácrinas, bastonetes, bipolares e células de Müller. Modificado de Marquadt e Gruss, 2002.

3. Sinalização de vida e de morte celular

A morte celular e os componentes da sinalização que coordenam sua execução e bloqueio são alvo de extensa investigação. Ocorre morte celular natural no desenvolvimento, sendo este um fator essencial para a homeostasia do organismo (Young, 1984).

A morte celular foi classicamente descrita como de dois tipos, necrótica e apoptótica. A morte celular do tipo necrótico é marcada por um inchaço nas organelas e aumento de permeabilidade da membrana a ponto de extravasar o citoplasma, liberando no meio extracelular enzimas lisosomais que provocam inflamação (Kerr e Harmon, 1991).

A morte celular do tipo apoptótico preserva a estrutura das organelas e não é acompanhada por inflamação. A apoptose é marcada por condensação da cromatina nos chamados núcleos picnóticos, convolução da membrana plasmática, fragmentação do DNA e condensação do citoplasma, formando corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos e degradados em lisossomos (Kerr et al, 1972).

As evidências estruturais apontavam para a apoptose como sendo uma seqüência organizada de eventos, compatível com um conceito de morte celular programada (MCP). Uma MCP consiste em uma seqüência controlada de eventos - causada por um estímulo - que leva à morte, enquanto apoptose corresponde a um modo de MCP, descrito morfológica e bioquimicamente (revisado em Lockshin e Zachery, 1991).

Os estudos com o nematódeo *Caenorhabditis elegans* tiveram importante papel na elucidação dos genes envolvidos no processo de MCP e impulsionaram

a pesquisa de correlatos em vertebrados. Os genes *ced-3* e *ced-4* são necessários à morte celular natural que ocorre no desenvolvimento destes hermafroditas, e *ced-9* a inibe (Ellis e Horvitz, 1986; Hengartner et al, 1992).

Estes dados possibilitaram a identificação da homologia estrutural entre o produto de *ced-3* de *C. elegans* com a enzima conversora de interleucina 1 β (ICE) em mamíferos (Yuan et al, 1993). Esta cisteína protease catalisa a clivagem de pro-IL1 β para a sua forma ativa, IL1 β , e induz apoptose quando superexpressa em fibroblastos (Miura et al, 1993; Thornberry e Molineaux, 1995). O papel de ICE na morte celular levou à investigação do envolvimento de enzimas semelhantes na MCP e à caracterização de uma família de cisteína proteases tida como protagonista da apoptose, as caspases (Degterev et al, 2003).

As caspases são classificadas em dois tipos: iniciadoras e efetoras de apoptose. As caspases iniciadoras fazem a comunicação entre os sinais de morte *upstream* e os passos efetores *downstream*. Estas caspases possuem um de dois tipos de motivo: domínio efector de morte (caspases 8 e 10) ou domínio de recrutamento e ativação de caspases (caspases 1,2,4,5,9,11 e 12) (Degterev et al, 2003).

As caspases efetoras (3, 6 e 7) são tipicamente ativadas por caspases iniciadoras e têm entre seus alvos de clivagem componentes estruturais do citoesqueleto e do núcleo e proteínas envolvidas em vias de sinalização, cuja modificação provoca as características apoptóticas como convoluções de membrana e fragmentação de DNA pela nuclease CAD (**C**aspase-**a**ctivated **d**eoxyribonuclease) (Earnshaw et al, 1999; Degterev et al, 2003).

As caspases permanecem sob forma de zimogênios, chamados de procaspases, sendo estes ativados por proteólise. Existem duas vias principais de morte celular programada que levam à ativação de caspases: a via extrínseca, ativada pelos chamados 'receptores de morte', e a via intrínseca ou via mitocondrial, classicamente ativada por diversas formas de estresse e dano intracelular.

A via extrínseca é ativada por hormônios e agonistas extracelulares pertencentes à superfamília do fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF). Estes ligantes reconhecem e ativam seus respectivos receptores e, através de uma série de interações proteína-proteína entre domínios de morte dos receptores (Death domains, DD) e domínios efetores de morte (Death effector domain, DED) de proteínas adaptadoras formam um complexo chamado complexo de sinalização indutor de morte (*death-inducing signaling pathway*, DISC). DISC recruta procaspase 8, e pela proximidade dos zimogênios de caspase provoca dimerização e autocatálise, culminando na ativação de caspase 8, que em seguida ativa as caspases 3 e 7 (revisado em Wolf e Green, 1999 e Jiang e Wang, 2004).

A via intrínseca ou mitocondrial é criticamente regulada por membros da família Bcl-2. Estes diferem quanto a uma função pró ou anti-apoptótica e pela composição de diferentes domínios BH (Bcl-2 Homology domains). Deste modo, os membros anti-apoptóticos da família, homólogos de ced-9 de *C. elegans*, como Bcl-2 e Bcl-x_L possuem de três a quatro domínios BH (BH1-4); membros pró-apoptóticos como Bax e Bak possuem três (BH1-3) e um pequeno subgrupo contém somente o domínio BH3, que é o caso de Bad, Bid, Noxa e Puma (Bouillet e Strasser, 2002).

Estas proteínas interagem entre si através dos domínios BH gerando um balanço que determina um sentido de morte ou sobrevivência. Por exemplo, a ativação e conseqüente translocação de Bax para a mitocôndria, por mecanismo ainda desconhecido, provoca a extrusão de citocromo c da mitocôndria. Citocromo c no citoplasma interage com Apaf-1 (***Apoptosis protease activating factor***), homólogo do ced-4 de *C. elegans*, e procaspase 9 na presença de ATP para formar o apoptossoma, um complexo que ativa as caspases 3 e 7 (Vander Heiden e Thompson, 1999; Zimmermann et al, 2001 e Jiang e Wang, 2004 para revisão). Bcl-2 é capaz de bloquear a integração e agregação de Bax/Bak à membrana mitocondrial, impedindo sua função pró-apoptótica (Bouillet e Strasser, 2002).

Outra via de morte celular que tem recentemente recebido bastante atenção é a de estresse de retículo endoplasmático. O excesso de proteínas mal enoveladas, desbalanço nos níveis intracelulares de cálcio ou alterações metabólicas geram uma cadeia de eventos chamada de resposta a proteína mal-enovelada, UPR (***unfolded protein response***). Esta UPR tem como conseqüências uma diminuição geral da tradução, aumento de transcrição de genes de chaperonas do retículo e estimulação da degradação de proteínas. Um estresse muito agudo ou prolongado pode induzir a morte das células, por uma via ainda pouco esclarecida mas que envolve caspase 12, membros da família de Bcl-2 e o fator de transcrição CHOP (Rutkowski e Kaufman, 2004).

Por muito tempo a dicotomia necrose e apoptose foi suficiente para definir os tipos de morte celular. Estudos posteriores, no entanto, observaram uma série de tons de cinza no processo de morte celular programada. Eventos de morte celular que combinam características de apoptose e necrose se mostraram mais

freqüentes na literatura, surgindo conceitos como paraptose, *apoptosis-like* e *necrosis-like* (Sperandio et al, 2000; Leist e Jäätelä, 2001). A morte celular por autofagia, independente de caspases, também tem sido muito estudada (Klionsky e Emr, 2000) e as evidências atualmente apontam para um componente organizacional na própria morte celular do tipo necrótico (Guimarães e Linden, 2004).

Apesar da definição do tipo de morte celular exigir análises de microestrutura e estar imerso em uma série de discussões, muitas das cascatas de sinalização que culminam nos eventos bioquímicos característicos destas mortes são conhecidas. O estudo desta sinalização intracelular é crucial para a compreensão do seu papel no balanço de vida e morte celular, que é objeto desta dissertação.

3.1 AMPc

Adenosina 3', 5' – monofosfato cíclico, ou AMPc, constitui um dos principais segundos mensageiros, tendo sido inicialmente descrito como mediador de respostas a ligantes extracelulares de receptores de membrana (Grahame-Smith et al, 1967).

O AMPc é produzido por enzimas chamadas adenilil ciclases, classicamente ativadas pela subunidade α da proteína G estimulatória (Gs). Sua produção é fruto da conversão de ATP (Adenosina trifosfato) em AMPc com liberação de um pirofosfato, que é degradado por uma pirofosfatase, tornando a reação irreversível (Hurley, 1999). Sua degradação é realizada por fosfodiesterases, que promovem a

hidrólise desta molécula transformando-a em adenosina 5' – monofosfato (5' – AMP).

O alvo canônico do AMPc é a proteína cinase dependente de AMPc, PKA (*Protein Kinase A*). Esta proteína é composta por um complexo de quatro subunidades, duas regulatórias (R) e duas catalíticas (C). A ligação do AMPc às subunidades R provoca a dissociação do complexo, liberando as duas subunidades C ativas que irão fosforilar proteínas-alvo específicas nos resíduos de serina/treonina (Taylor, 2004).

A variação nos níveis intracelulares de AMPc está associada a indução de morte ou proteção, dependendo do tipo celular. O aumento de AMPc induzido por prostaglandinas, toxina do cólera ou forskolina (um ativador de adenilil ciclase) é responsável pela indução de apoptose em linhagem de leucemia mielóide, linfócitos B ou células de leucemia linfocítica crônica (Lanotte et al, 1991; Lomo et al, 1995; Mentz et al, 1995).

O mesmo aumento de AMPc, no entanto, é responsável por bloquear a apoptose de osteoclastos *in vitro*, a morte de neurônios simpáticos e sensoriais induzida por privação de NGF e a morte por apoptose de células pós-mitóticas indiferenciadas na camada neuroblástica da retina (Rydel e Greene, 1988; Selander et al, 1996; Edwards et al, 1991; Rehen et al, 1996).

Alguns alvos da via de AMPc/PKA regulam a morte celular. PKA fosforila a proteína BAD. Pertencente à família de Bcl-2, BAD tem ação pró-apoptótica quando ligada a Bcl-xL, outro membro da mesma família. Quando não fosforilada, BAD se liga a Bcl-xL impedindo a ligação deste último com a proteína Bax, que fica livre para exercer seu efeito pró-apoptótico (figura 4).

BAD possui quatro sítios de fosforilação associados ao controle de apoptose: Ser112, Ser136, Ser155 e Ser170. Serina 155 é considerado o sítio mais importante, sendo, no entanto, necessária a fosforilação nas serinas 112 e 136 para que o mesmo esteja exposto. A fosforilação na serina 136 é classicamente associada à via de PKB/Akt (Datta et al, 1997), a da serina 112 a uma PKA ancorada à membrana mitocondrial e a serina 155 à PKA. A cinase que fosforila Bad na Ser170 ainda não é conhecida. Quando fosforilada, Bad se liga à proteína 14-3-3 e permite a união Bax-Bcl-xL, impedindo a apoptose (Silveira e Linden, 2006).

Outro alvo de PKA é a proteína *cyclic AMP response element (CRE)-binding protein* (CREB), um fator de transcrição que se liga ao sítio CRE no DNA e ativa a transcrição de membros pró-apoptóticos da família de Bcl-2 como Bag-1 e o próprio Bcl-2. CREB é o fator de transcrição induzido por estímulos externos melhor caracterizado na literatura, sendo essencial em processos como diferenciação, proliferação e respostas adaptativas (Shaywitz et al, 1999) (figura 4).

O AMPc também exerce efeitos de forma independente de PKA. Seus alvos incluem modulação de canais iônicos e *GTP-Exchange factors* (GEFs) que têm influências em vias de sinalização como a das MAPKs e PI3K (de Rooij et al, 1998; Dugan et al, 1999; Mei et al, 2002; Kopperud et al, 2003).

Figura 4:

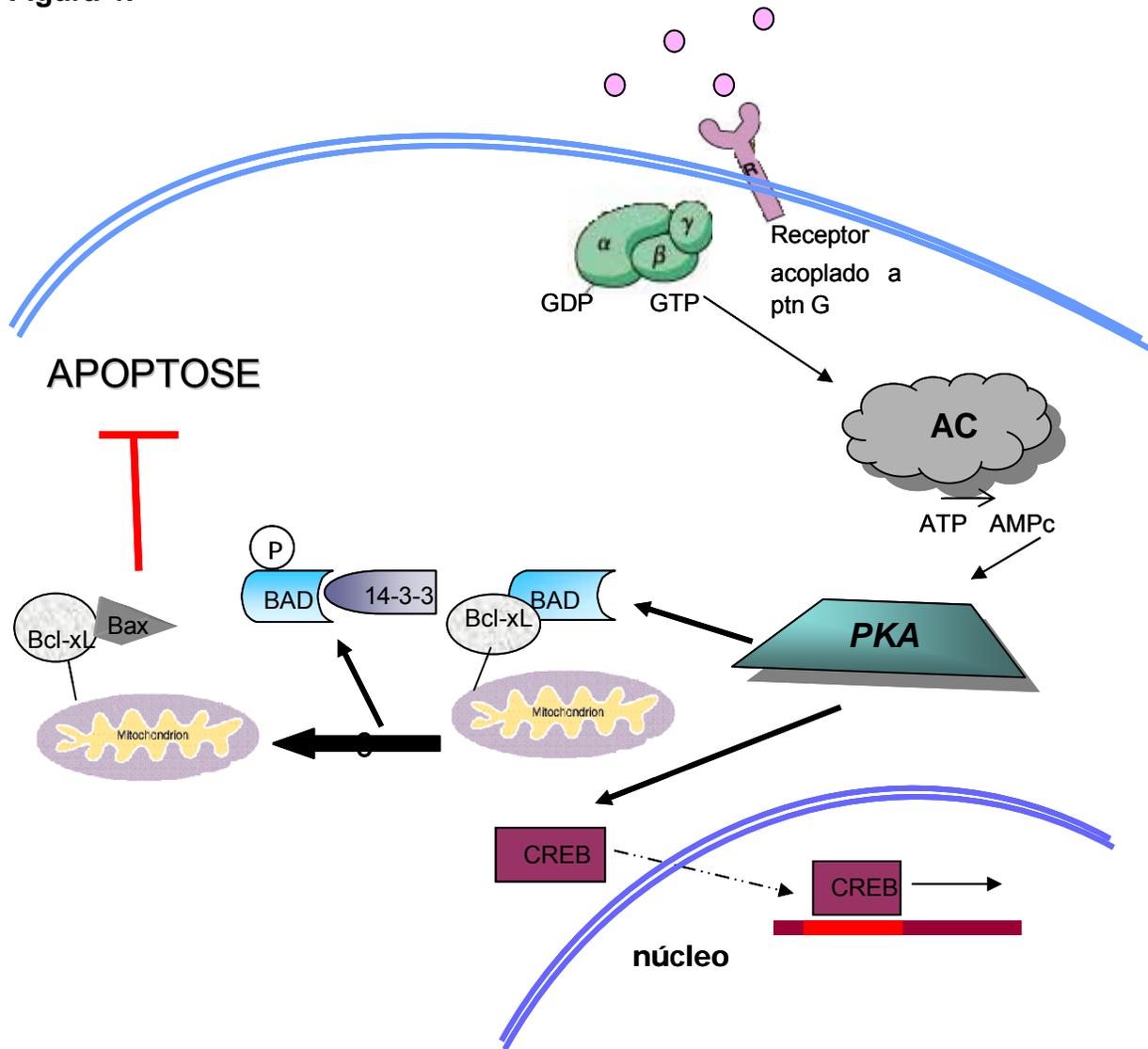


Figura 4: Esquema explicativo da via de AMPc/PKA. Esta via é classicamente ativada por receptores acoplados a proteína G. Isto gera uma ativação da enzima adenilil ciclase (AC), que aumenta os níveis de AMPc. Este aumento leva à ativação da proteína cinase A, PKA, que tem CREB e Bad como alguns de seus alvos. Acredita-se que PKA exerça papel protetor da MCP através de sua interação direta com a proteína Bad e indireta com a proteína Bax. Bax, quando em homodímero é pró-apoptótica. Bad, quando fosforilada, libera a proteína Bcl-xL para se heterodimerizar com Bax e bloquear a apoptose.

3.2 PI3K e PKB

Durante muitos anos, atribuiu-se aos lipídeos de membrana uma função meramente estrutural. A partir dos anos 50, no entanto, trabalhos demonstraram o papel de fosfatidilinositol como sinalizador intracelular, principalmente em respostas celulares reguladas por cálcio (revisado em Balla, 2001). A evolução dos trabalhos com mediadores lipídicos demonstrou seu envolvimento em vias de sinalização independentes de cálcio, como a via da fosfoinosítídeo -3- cinase, PI3K.

A via de PI3K/PKB é uma das principais vias responsáveis pela sinalização de sobrevivência em resposta a fatores tróficos em neurônios. Diversos estudos verificaram que a ativação de PI3K bloqueia morte celular (Yao e Cooper, 1995; Dudek et al, 1997; Kennedy et al, 1999), e que mutações em uma fosfatase que provocam uma sinalização constitutiva de PI3K estão presentes em alguns tipos de câncer (Maehama e Dixon, 1999), demonstrando também a importância desta via de sinalização no controle da proliferação celular.

PI3K fosforila fosfatidilinositol na posição 3 do anel de inositol. Suas subunidades catalíticas definem uma divisão destas proteínas em três classes, estando a primeira classe associada a sinais de sobrevivência. As PI3K de classe I convertem fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4 fosfato e fosfatidilinositol 4,5 bifosfato nos fosfoinosítídeos (PI) PI(3)P, PI(3,4)P₂ e PI(3,4,5)P₃, respectivamente, sendo o último substrato seu alvo mais comum (Vanhaesebroeck et al, 1997).

Os membros desta classe se subdividem em duas subclasses de acordo com a proteína adaptadora com a qual interagem. PI3K α , PI3K β e PI3K δ (classe Ia) são reguladas por uma subunidade p85, com dois domínios SH2 que interagem com resíduos de tirosina fosforilados (em uma seqüência específica de aminoácidos) presentes em receptores tirosina cinases ativados e algumas proteínas adaptadoras (Fruman et al, 1998). PI3K γ (classe Ib) é regulada pela subunidade $\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas, através de uma proteína adaptadora, p101 (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999).

As PI3K de classe Ia são recrutadas à membrana plasmática através de p85, pela dimerização de receptores tirosina cinase (Vanhaesebroeck et al, 1997). A associação de p85 à seqüência de fosfo-tirosina aumenta a atividade catalítica de PI3K e a aproxima de seus substratos e de ativadores como Ras (Fruman et al, 1998).

A produção de PI(3,4)P₂ e PI(3,4,5)P₃ pela PI3K recruta proteínas com domínio *Pleckstrin Homology* (PH) com alta afinidade para estes fosfoinosítídeos, como a cinase dependente de fosfoinosítídeos 3', PDK1 (*3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*). Esta cinase tem como um dos alvos Akt ou proteína cinase B, PKB (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999).

Akt/PKB possui um domínio PH, um domínio cinase e uma região regulatória C-terminal. Para ser completamente ativada, precisa ser fosforilada no resíduo treonina 308 (no domínio cinase) e na serina 473 (do C-terminal) (Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999). O domínio PH desta cinase faz com que ela seja recrutada para a membrana pelos produtos de PI3K, PI(3,4)P₂ e

PI(3,4,5)P₃. Na membrana ela é fosforilada por PDK1 em ambos os sítios, sendo totalmente ativada.

As ações da via de PI3K/Akt na sinalização de morte celular em neurônios ocorre de forma dependente ou independente de transcrição gênica. Akt/PKB tem como alvos proteínas da maquinaria de morte celular, como Bad e procaspase 9, e fatores de transcrição. Sua ação dependente de transcrição se dá pela inibição da transcrição de genes de morte celular ao interagir com a família *Forkhead* de classe O (FOXO) – que ativa genes de morte celular como Fas-L, Fas, TNF α e seu receptor e TRAIL - e com p53 (em mecanismo ainda desconhecido, mas p53 ativa BAX e NOXA), ou pela ativação de genes de sobrevivência, via fator nuclear κ B (NF- κ B) e I κ B cinase (Bcl-XI e IAPs) e CREB (Bcl-2 e BDNF) (Brunet et al, 2001; Vanhaesebroeck e Waterfield, 1999 e Neri et al, 2002; figura 5).

O papel de PI3K no controle de eventos de morte celular e proliferação celular durante o desenvolvimento é bem ilustrado em artigo de Pimentel e colaboradores, em que um camundongo transgênico que tem maior atividade de PI3K apresenta alterações como aumento e dobramento da retina, e desprendimento parcial do epitélio pigmentado (Pimentel et al, 2002).

Figura 5:

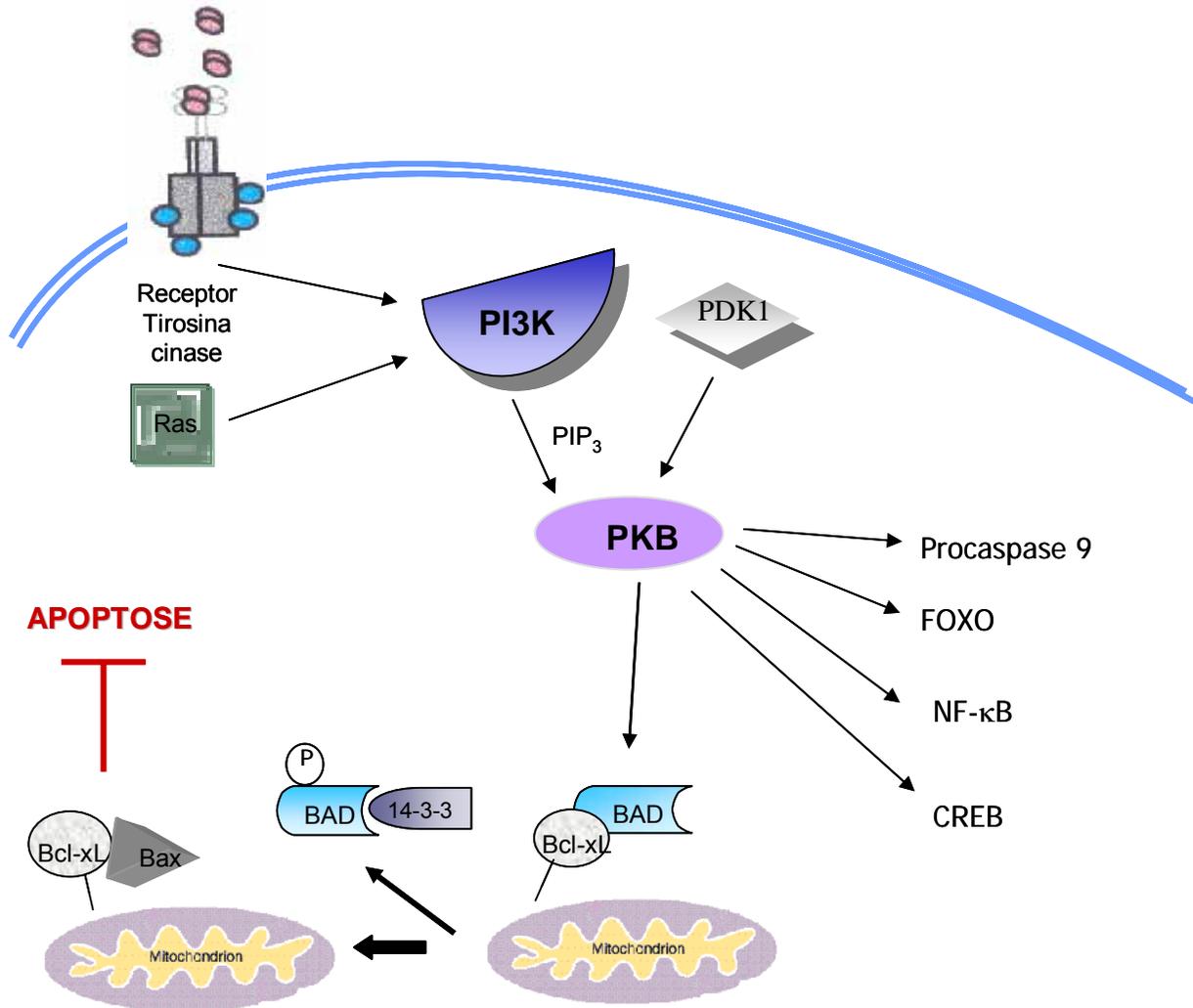


Figura 5: Esquema explicativo da via de PI3K/PKB. Esta via é classicamente ativada por receptores tirosina cinase, que levam à ativação de PI3K. Os produtos da ativação desta cinase geram o recrutamento e a ativação posterior de PKB/Akt, fosforilada por PDK1. Procaspase 9, NF- κ B, CREB, fatores de transcrição da família *Forkhead* classe O (FOXO) e Bad são alguns dos alvos de fosforilação desta cinase envolvidos na sinalização de morte. Acredita-se que uma das vias pelas quais PKB exerce papel protetor da MCP seja através de sua interação direta com a proteína Bad e indireta com a proteína Bax. Bax, quando em homodímero é pró-apoptótica. Bad, quando fosforilada, libera a proteína Bcl-xL para se heterodimerizar com Bax e bloquear a apoptose.

3.3 A via das MAPK

Os primeiros trabalhos a identificar MAP cinases foram feitos em linhagem 3T3 estimulada com insulina. As seqüências das primeiras MAP cinases ficaram disponíveis entre 1989 e 1991, em levedura e mamíferos. Os substratos geralmente utilizados para medir a atividade destas cinases eram proteína básica de mielina (MBP) e proteína associada a microtúbulos (MAP2), o que fez com que fossem primeiramente batizadas como MBP e MAP2 cinases (Pearson et al, 2001). Posteriormente o MAP foi mantido, mas com significado de *mitogen activated kinases*, para fazer menção a outra origem histórica, a de que estas proteínas haviam sido identificadas nos anos 80 como tirosina-fosfoproteínas ativadas por mitógenos (Rossomando et al, 1989).

MAP cinases são ativadas por fosforilação e isso envolve uma cascata de fosforilação em três etapas, constituídas pela ativação de três proteína cinases. A primeira delas, dita MAP cinase cinase cinase (MAPKKK), fosforila a segunda, MAP cinase cinase (MAPKK), ativando-a. Esta etapa é fundamental na amplificação do sinal, uma vez que MAPKKs, como é o caso de MEK, estão presentes em maior quantidade na célula do que sua ativadora Raf-1. As MAP cinases precisam ser fosforiladas em uma treonina e uma tirosina. No caso de ERK1/2, a fosforilação em treonina não as ativa, mas um acúmulo de proteínas com esta primeira fosforilação é necessário para que a segunda fosforilação ocorra. Desta forma, existe um limiar para a ativação destas proteínas (Pearson et al, 2001).

As MAP cinases têm uma resposta transitória e fosforilam outras proteína cinases, fosfatases e fatores de transcrição, particularmente induzindo a

transcrição de genes imediatos (*immediate early genes*), uma vez que, ativadas, podem migrar para o núcleo (revisado por Hunter, 2000).

Na superfamília das MAPKs existem três vias de sinalização que respeitam o modelo acima: a das proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares (*Extracellular signal-Regulated protein Kinases*, ERKs), as cinases c-Jun N-Terminal (JNK) e a família das proteínas cinases p38 (Johnson e Lapadat, 2002 para revisão).

ERK1 e ERK2 têm na sua cascata de ativação a MAP cinase cinase MEK e a MAPKKK c-RAF, regulada pela GTPase Ras através de receptores para fatores de crescimento e tirosina cinases. Dependendo do estímulo, ativação de ERK pode levar à ativação da transcrição da cinase p90 RSK S6, a *MAPK-activated protein kinase-1*, MAPKAP-K1, fosfolipase A2, fatores de transcrição (como os membros da família AP-1, Elk-1, m-Myc), STAT3, EGF entre outros. A ERK1 e a ERK2 estão envolvidas no controle da divisão celular, migração e sobrevivência (Cowan e Storey, 2003 para revisão) (a via está representada na figura 6).

O papel desta família na sinalização de morte celular é dúbio. Xia e colaboradores descreveram pela primeira vez uma função anti-apoptótica de ERK1 e 2 em neurônios ao demonstrar que a sinalização trófica de NGF era mediada pela via de ERK1/2 em células PC12 (revisado em Hetman e Gozdz, 2004). A ativação de ERK1/2 também é protetora mediando efeitos de BDNF (Bonni et al, 1999; Dugan et al, 1999), de PACAP via AMPc em neurônios granulares cerebelares (Villalba et al, 1997), além de BDNF e AMPc em células ganglionares da retina (Meyer-Franke et al, 1998), apesar de outros relatos

indicarem que esta não é a principal via efetora de proteção por suporte trófico (Hetman e Xia, 2000).

Além de uma função protetora 'basal', muitos estudos implicam a via de ERK1/2 em neurônios como transdutora de sinais de agentes protetores em situações de estresse como excitotoxicidade, aumento de cálcio intracelular, danos de DNA, lesões oxidativas, hipoxia ou vírus neurotóxicos (Hetman e Gozdz, 2004). Existem, no entanto, muitos relatos da via de ERK como indutora de morte celular (Chu et al, 2004), inclusive de morte celular não-apoptótica (Subramaniam e Unsicker, 2006). Como é comum em se tratando de vias de sinalização, os efeitos da via de ERK variam em função do tipo celular, duração e natureza do estímulo e localização subcelular da ERK (Cheung e Slack, 2004).

ERK1/2 modulam a sinalização de morte e sobrevivência por eventos dependentes e não dependentes de expressão gênica. Bonni e colaboradores mostraram em 1999 efeito anti-apoptótico de ERK1/2, via seu alvo p90Rsk2, através de fosforilação de Bad e ativação de CREB. Como descrito anteriormente, CREB aumenta a expressão de membros anti-apoptóticos da família de Bcl-2. Erk1/2 ainda podem fosforilar diretamente Bim40, membro pró-apoptótico da família de Bcl-2 e caspase 9 (Hetman e Gozdz, 2004)

JNK é ativada por sinais de estresse como choque térmico, irradiação por UV e citocinas pró-inflamatórias. Quando ativada, JNK se transloca para o núcleo ativando um conjunto seletivo de alvos, que engloba c-jun (levando a aumento de atividade do fator de transcrição AP-1), ATF-2, Elk-1, Myc, Smad3, p53, NFAT4, DPC4 e MADD (Cowan e Storey, 2003 para revisão). Sua ativação normalmente leva a apoptose, havendo algumas exceções.

P38 também é ativada por sinais de estresse, tendo como alvos as proteínas de choque térmico (hsps) 27, 25, a proteína ativada por MAPKs (MAPKAP)2 e os fatores de transcrição ATF-2, Stat1, Max/Myc, Elk-1 e CREB via ativação de MSK1 (Cowan e Storey, 2003 para revisão) (figura 6).

Figura 6:

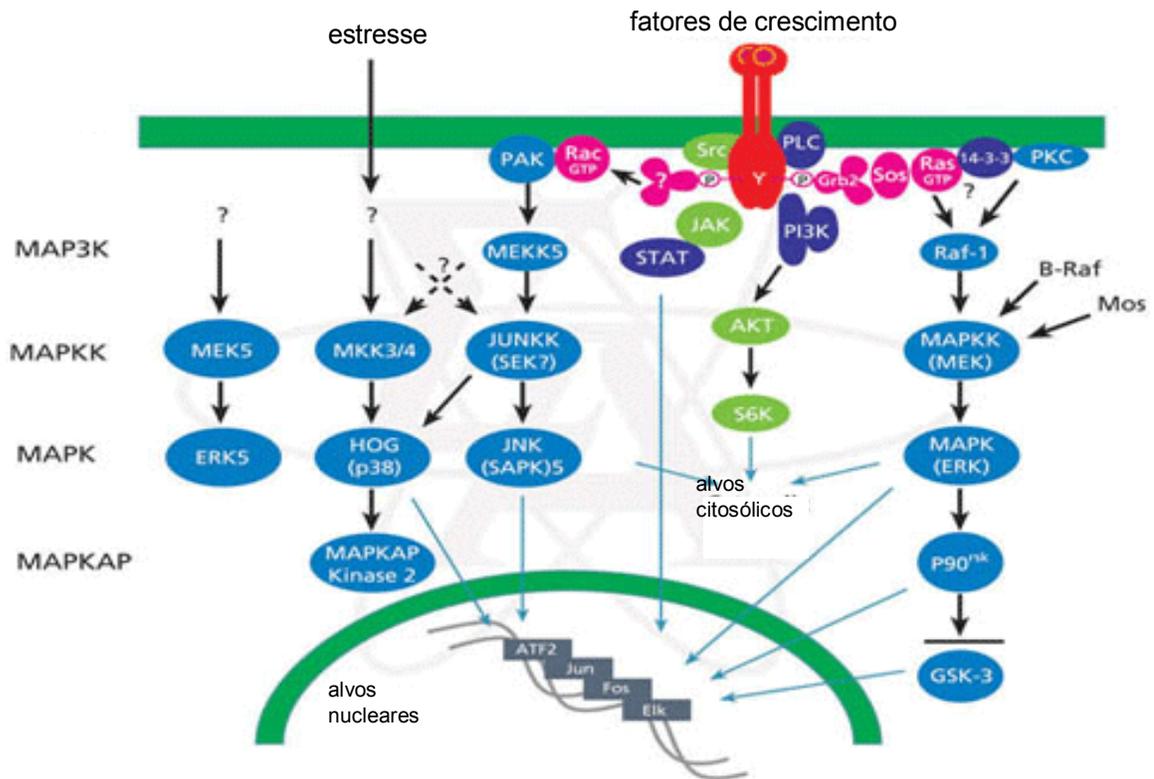


Figura 6: Esquema explicativo da via das MAPK. Estão ilustradas as proteínas pertencentes às três famílias de MAPKs: ERK, JNK e p38 cinase, a cascata de ativação em três etapas e alguns de seus alvos. Modificado de http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides_Charts/Mitogen_activated_Protein_Kinase_Cascades.html

3.4 PKC

O termo proteína cinase C (PKC) engloba um grupo de serina/treonina cinases que desempenham papel importante em processos como morte celular, diferenciação e proliferação celular. Suas primeiras descrições datam do começo dos anos 80, identificada como proteína cinase ativada por cálcio, diacilglicerol (DAG) e fosfolípidos. Estudos subsequentes revelaram um conjunto de isoenzimas que, apesar de pertencerem à mesma família, variam em estrutura, localização subcelular e no tecido, co-fator utilizado e especificidade com o substrato (Casabona, 1997).

O estudo do envolvimento de PKC no controle da morte celular foi por muito tempo sombreado por relatos contraditórios consequentes do uso de ativadores não específicos de PKC e do fato de isoformas diferentes da proteína terem atividades distintas. O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e de inibidores específicos para isoformas desta enzima permitiu esclarecer a questão (Gutcher et al, 2003).

A família de PKC pode ser dividida em três grupos baseado na sua regulação: as PKCs dependentes de cálcio e ativadas por diacilglicerol (DAG), ditas convencionais ou cPKCs (α , β I, β II e γ); as novas PKCs ou nPKCs (δ , ϵ , θ , η , μ e ν - sendo que as duas últimas são referidas também como PKDs por terem uma diferença em sua regulação), também ativadas por DAG mas insensíveis a cálcio; e as PKCs atípicas ou aPKCs (ζ e λ /I), insensíveis a DAG e cálcio (Nishizuka, 1992).

A ativação de PKCs tradicionais envolve uma série de etapas. Na sua forma inativa, PKC permanece no citosol com seu domínio catalítico oculto

por uma região da proteína chamada pseudo-substrato. Para ser ativada, PKC precisa primeiramente ser fosforilada (por PDK1) e se ligar a cálcio. Esta ligação aumenta sua afinidade por lipídeos e a leva à membrana plasmática, onde pode se ligar ao fosfolípido fosfatidilserina (PS) e DAG. Esta interação faz com que o pseudo-substrato libere o sítio catalítico e PKC esteja completamente ativa (Newton, 2001).

As novas PKCs variam muito quanto à sua afinidade por co-fatores como ácidos graxos, porém todas também são ativadas pela interação com PS e requerem um aumento nos níveis de DAG (Casabona, 1997). As PKCs atípicas têm mecanismo de ativação ainda obscuro. Após sua ativação, as PKCs se ligam a receptores para proteínas cinase C ativas (RACKs) (Mochly-Rosen et al, 1991), que determinam sua localização.

A participação de PKCs na indução ou bloqueio de apoptose é bem estabelecido na literatura (revisado em Lucas e Sánchez-Margalet, 1995). Apesar de, por muito tempo, o papel das isoformas de PKC no controle da MCP ser controverso, atualmente está mais esclarecido que diferentes isoformas de PKC exercem modulações distintas na sinalização de morte.

Como mecanismos da ação anti-apoptótica de PKCs, já foram descritos modulação da via mitocondrial (Ding et al, 2002); da fosforilação de BAD via Rsk (Bertolotto et al, 2000); interação com Bcl-2 (Ruvolo et al, 1998; Whitman et al, 1997), com a via de receptor de morte (agindo na formação de DISC - Gomez-angelats et al, 2001), e de MAPK pela fosforilação de Raf-1 (Ueda et al, 1996; Cai et al, 1997), que sabidamente fosforila e inativa BAD. O consenso é que PKCs convencionais e atípicas são predominantemente anti-

apoptóticas, enquanto PKCs novas geralmente têm uma função de supressão de tumor e são vistas como pró-apoptóticas (Gutcher et al, 2003).

4. Hop/STI1

Hop/STI1 foi primeiramente identificada em *Saccharomyces cerevisiae* em uma busca genética por fatores que induzissem trans-ativação de genes da resposta de choque térmico (Nicolet e Craig, 1989), de onde se origina seu nome, **stress-inducible protein 1**. Esta é uma proteína de 66kDa que tem homólogos descritos em humanos, rato, camundongo, levedura, insetos, plantas, parasitas e vírus (Odunuga et al, 2004).

Em função de algumas diferenças no mecanismo de ação da proteína em diferentes espécies, STI1 identifica geralmente o homólogo em levedura, enquanto o de mamíferos é referido por **Hsp70-Hsp90 organizing protein**, Hop. Como o nome indica, a principal descrição de função desta proteína é como co-chaperona que funciona como *scaffold* para a formação do complexo Hsp70-Hsp90 de chaperonas (Smith et al, 1993, Chen et al, 1996; Dittmar et al, 1996, Chen e Smith, 1998). Como em trabalhos que não estudam a função de co-chaperona desta proteína sua nomenclatura fica um pouco confusa, optamos por nos referir a ela como Hop/STI1 nesta dissertação.

O que confere a Hop/STI1 esta qualidade de *scaffold* é a presença de nove motivos tetratricopeptídeos repetidos (TPRs, que consistem de repetições em *tandem* de uma sequência consenso de 34 aminoácidos) (Blatch e Lassle, 1999) agrupados em três domínios TPR: TPR1, TPR2A e TPR2B. Estes domínios permitem a interação de Hop/STI1 com outras proteínas, além de

Hsp70 e Hsp90, muitas das quais ainda estão sendo descobertas (Odunuga et al, 2004).

Hop/STI1 já foi encontrada no núcleo, citoplasma e adsorvida à face externa da membrana plasmática, estando presente na membrana de neurônios (Odunuga et al, 2004; Zanata et al, 2002). Hop/STI1 tem sua função de co-chaperona bem descrita na literatura. Recentemente, no entanto, novas funções vêm sendo propostas para esta proteína, tanto dentro da célula como na membrana, como modulação de sinalização intracelular e neuroproteção (Odunuga et al, 2004). Esta dissertação se encaixa no contexto de elucidação das funções desta co-chaperona e propõe que ela esteja envolvida na regulação de sinalizações de morte e proliferação durante o desenvolvimento.

4.1 Funções intracelulares: Chaperonas e Hop/STI1

Chaperonas constituem uma classe muito conservada de proteínas. Suas principais funções na célula incluem prevenção de interações impróprias dentro e entre polipeptídeos não nativos, aumento da eficiência de re-enovelamento de proteínas que sofreram desenovelamento como resultado de estresse celular, transporte intracelular de proteínas, degradação de proteínas e transdução de sinal (revisado em Muchowski e Wacker, 2005).

Um evento estressante - como o aumento da temperatura - ativa um programa celular conhecido como a resposta de choque térmico, cujo traço principal é o aumento na síntese de chaperonas da família das proteínas de choque térmico (heat shock proteins, HSPs) destinadas a combater o dano protéico resultante do estresse. Estas proteínas, apesar da descrição inicial,

têm expressão constitutiva e exercem papel crucial na fisiologia da célula mesmo quando esta não está em situação de estresse.

HSP70 ajuda na estabilização e enovelamento de proteínas, estando presente na maior parte dos compartimentos celulares (Bukau e Horwich, 1998). HSP90 é uma chaperona presente no citosol que estabiliza proteínas mal-enoveladas e regula a atividade de proteínas sinalizadoras como tirosina cinases e calcineurina (Young e Hartl, 2002). HSPs pequenas (sHSPs) formam grandes oligômeros e exercem funções similares às de HSP90.

No processo de tradução, o tempo em que a cadeia não enovelada fica exposta antes do término de sua tradução, a proximidade de outras cadeias semelhantes (em complexos de polirribossomos) e a super-população do citosol induzem agregação. As chaperonas reconhecem resíduos hidrofóbicos e/ou esqueletos protéicos não estruturados (que normalmente não ficam expostos em proteínas em conformação nativa), se ligando e atuando tanto como escudo na prevenção de interações indevidas entre cadeias como evitando mal-enovelamento intramolecular (revisado em Hartl e Hayer-Hartl, 2002). As chaperonas obtêm a conformação ótima dos seus substratos através de ciclos de ligação e liberação do substrato regulados pela sua atividade ATPásica e pelo auxílio de co-chaperonas.

Em eucariotos, a maioria das cadeias de polipeptídeos pequenas se enovela sozinha após liberação do ribossomo. Cerca de 10% das cadeias longas é assistida por chaperoninas, proteínas que formam complexos cilíndricos onde as novas proteínas são enoveladas isoladas do citosol. Já 15 a 20% das cadeias atingem sua conformação nativa com assistência de hsp70 e

hsp40, sendo que uma fração destas ainda requer a participação de hsp90 (Hartl e Hayer-Hartl, 2002).

Hsp90 e 70 interagem a partir de uma seqüência precisa de eventos mediados por co-chaperonas. Neste ciclo de hsp70 e hsp90, a proteína Hop/Sti1/p60 exerce papel crucial. Inicialmente, proteínas novas ou parcialmente não-enoveladas são direcionadas a hsp70 por hsp40, formando o chamado 'complexo inicial'. Para muitas proteínas, os ciclos de interação com hsp70 são suficientes para atingir a conformação ótima.

No caso de substratos que requerem a participação de hsp90, a ponte entre as maquinarias de Hsp70 e Hsp90 é feita pela co-chaperona Hop/Sti1/p60 através de seus domínios TPR (Smith et al, 1993, Chen et al., 1996, Johnson et al, 1998; Young et al, 1998, Scheufler et al, 2000). Hop/Sti1 tem grande afinidade por hsp90 e se liga a ela em dímero pelos seus domínios TPR2A e 2B (Prodromou et al, 1999). Em condições normais, em excesso de ATP, Hop/Sti1 tem pouca afinidade por hsp70, porém a interação de hsp40 com hsp70 estimula a hidrólise de ATP por hsp70 (Bukau e Horwich, 1998), colocando-a em uma conformação em que a afinidade de Hop é maior, possibilitando a interação entre as proteínas hsp40, hsp70, hsp90 e Sti1/Hop, no dito 'complexo intermediário' (Hernández et al, 2002, Chen et al., 1996; Dittmar e Pratt, 1997; Johnson et al., 1998).

O passo seguinte do ciclo consiste na troca de Hsp70 e Hop/STI1 por uma imunofilina e p23, gerando o 'complexo maduro', que por fim leva à liberação do substrato.

A atividade *in vivo* de hsp90 depende de hidrólise de ATP (Obermann et al, 1998). Hop/STI1, além de recrutar os componentes e formar o complexo

intermediário, modula a atividade ATPásica de hsp90 (se ligando ao sítio de ligação a ATP de hsp90) (Prodromou et al, 1999). Hsp90 possui uma conformação 'aberta' mais receptiva ao substrato (Prodromou et al, 2000). Hop/STI1 impede a quebra de ATP e manteria hsp90 na sua conformação mais receptiva, aumentando a eficácia do processo. A substituição de STI1 por uma imunofilina liberaria o sítio de ligação a ATP de hsp90, permitindo a ligação e hidrólise de ATP necessárias para que o enovelamento apropriado do substrato seja atingido.

Por serem chaperonas, as proteínas de choque térmico têm papel na proteção em distúrbios de enovelamento protéico, como é o caso de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington. De fato, HSP90 e 70 têm função protetora em modelos de Alzheimer (Dou et al, 2003, Shimura et al, 2004), Huntington (Jana et al, 2000; Kobayashi e Sobue, 2001) e Parkinson (Klucken et al, 2004), neste último *in vivo* inclusive (Auluck et al, 2002). Acredita-se que a função destas proteínas seja direcionar a agregação protéica à formação de fibras inócuas, impedindo a formação de oligômeros de tamanho intermediário tóxicos à célula (Muchowski e Wacker, 2005).

Nestes e outros trabalhos, foi descrita uma função protetora indireta de hsps na morte celular por sua ação no processamento dos agentes tóxicos à célula. Estas proteínas, no entanto, também agem modulando diretamente componentes de sinalização intracelular. Desta forma, complexos de chaperonas e co-chaperonas interagem com receptores nucleares – gerando e mantendo sua conformação ótima para ligação e ativação e regulando a sua dissociação de complexos transcricionais (Young e Hartl, 2002) –; com componentes e reguladores da via de Ras/Raf-1 (Nollen e Morimoto, 2002),

JNK, PI3K; e interagem diretamente com componentes das vias intrínseca ou extrínseca de morte celular programada como caspases e NF- κ B (Beere, 2004).

Hop/STI1 também interage com outras chaperonas como Hsp104 (Abbas-Terki et al, 2001) e cdc37, uma co-chaperona envolvida em sinalização da via das MAPKs e no controle do ciclo celular (Abbas-Terki et al, 2002; Maclean e Picard, 2003).

4.2 Funções extracelulares: Novos parceiros de Hop/STI1

Chiarini e colaboradores, em 2002, estudando MCP e biologia de príon, descreveram que o tratamento com um peptídeo ligante da proteína príon celular, denominado PrR, gerava redução na morte celular induzida por anisomicina em retinas de rato e camundongo. A ligação entre PrR e PrP^C levava à ativação das vias de ERK e AMPc/PKA, porém somente esta última era necessária ao seu efeito protetor (Chiarini et al, 2002).

Um anticorpo contra o peptídeo PrR levou à identificação de STI1 como ligante de PrP^C (Zanata et al, 2002). A proteção das células pós-mitóticas indiferenciadas conferida pelo tratamento com STI1 era dependente de PrP^C (Zanata et al, 2002). O tratamento com o peptídeo que contém o domínio de STI1 que se liga a PrP^C (peptídeo 230-245) induz neuroproteção dependente da via de AMPc/PKA (LB Chiarini, dados não publicados).

A proteína príon celular (PrP^C) é uma glicoproteína ancorada à membrana plasmática por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), expressa predominantemente no sistema nervoso central (SNC) (Prussiner, 1998). PrP^C

está envolvida na patogênese de uma família de doenças neurodegenerativas, as encefalopatias espongiformes, dentre as quais as mais conhecidas em humanos são o kuru, a doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD) e a sua nova variante (nvCJD).

O quadro clínico destas doenças envolve demência, distúrbios motores e de ciclo circadiano, insônia e declínio cognitivo, sendo marcado por acentuada degeneração neuronal, que produz no cérebro o aspecto esponjoso que as qualifica (Collins et al, 2004 para revisão).

As encefalopatias espongiformes, conhecidas também como doenças por príon, compreendem um pequeno subgrupo de doenças, o das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs). Sabe-se que o agente patogênico das TSEs é uma isoforma de PrP^C, a PrP^{Sc} (chamada *scrapie*). Acredita-se que a isoforma *scrapie* seja capaz de induzir uma conversão da isoforma celular para a *scrapie*, às custas da depleção de PrP^C da membrana.

A infecção, em humanos, pode ocorrer por procedimento médico ou ingestão de material contaminado (nvCJD, kuru). No caso da nvCJD, a transmissão se dá através de ingestão de tecido de animais com encefalopatia espongiforme bovina por via oral. A isoforma *scrapie*, no entanto, induz morte celular somente no sistema nervoso central (Aguzzi et al, 2004).

Duas hipóteses cercam a discussão sobre a causa da neurotoxicidade nas doenças de príon: a do ganho de função, que responsabiliza o acúmulo dos agregados de PrP^{Sc} pela indução de morte neuronal; e a de perda de função, que prediz um papel de PrP^C na homeostasia do tecido, de modo que sua perda (pela conversão) geraria os sintomas da doença (para revisão, Hetz et al, 2003).

Os estudos de 2002 de Chiarini e Zanata e colaboradores corroboram com a hipótese da perda de função, uma vez que descrevem o envolvimento de PrP^C na via de sinalização de sobrevivência, sugerindo um papel protetor fisiológico desta proteína. Estes estudos impulsionaram a investigação dos efeitos da interação PrP^C-Hop/STI1 em outros modelos.

A ligação de Hop/STI1 a PrP^C também é neuroprotetora em culturas primárias de hipocampo (Lopes et al, 2005). O tratamento com Hop/STI1 nestas culturas protege contra a morte induzida por estaurosporina de forma dependente de PrP^C e da via de AMPc/PKA. Em culturas de linhagem de células hipocâmpais, Sakudo e colaboradores descreveram uma modulação pelo peptídeo 230-245 de STI1 da atividade superóxido dismutase de PrP^C e conseqüentemente aumento da sobrevivência das células (Sakudo et al, 2005).

A interação entre Hop/STI1 e a proteína príon celular não tem efeitos somente na modulação da morte celular. Lopes e colaboradores descreveram uma função desta co-chaperona na diferenciação celular. Hop/STI1 induz neuritogênese dependente da via de ERK em culturas primárias de hipocampo, o que levou o grupo a propor duas funções de STI1 via PrP^C: uma neuroprotetora pela ativação de PKA e uma relacionada à diferenciação celular, que recruta a via de ERK (Lopes et al, 2005).

Erlich e colaboradores verificaram recentemente que Hop/STI1 também modulava a proliferação celular em linhagem de glioma A172 (Erlich et al, 2006, submetido). O tratamento com Hop/STI1 aumentou a proliferação em até três vezes, efeito que foi revertido por co-tratamento com anti-PrP^C e que é modulado pelas vias de ERK e Pi3K (Erlich et al, 2006, submetido).

O tratamento com Hop/STI1 em culturas de astrócitos também modula a proliferação celular, mas negativamente (Erlich et al, 2006, submetido; Arantes et al, em preparação). O efeito anti-proliferativo da co-chaperona se mostrou dependente de PKC e ocorre mesmo em culturas de astrócitos de animais nocautes para príon celular (Arantes et al, em preparação), indicando que Hop/STI1 é capaz de induzir sinalização de forma independente de PrP^C.

Os estudos sobre a sinalização e o papel fisiológico de Hop/STI1 podem ser organizados em dois ramos. Primeiramente, os estudos de sua atividade de co-chaperona e possíveis papéis que suas interações com outras moléculas dentro da célula têm na modulação de diferentes vias de sinalização intracelular. O segundo ramo, muito mais recente, surgiu a partir do estudo do papel fisiológico de outra proteína, príon celular, e enfoca os efeitos do tratamento com Hop/STI1 exógena em processos de morte, proliferação e diferenciação celular.

Os resultados provenientes deste ramo superaram seu próprio ponto de partida, no sentido de que efeitos de Hop/STI1 estão sendo estudados que não envolvem a proteína príon celular, e novos parceiros de Hop/STI1 estão sendo identificados. Este estudo se coloca no contexto de elucidar os papéis desta proteína para além da maquinaria de chaperonas, tentando acrescentar mais informações ao quadro que se está montando do papel fisiológico desta co-chaperona.

Objetivos:

- Verificar a expressão de Hop/STI1 na retina
- Investigar o papel de Hop/STI1 na modulação da morte celular programada na retina em desenvolvimento:
 - Através de duas ferramentas: a proteína Hop/STI1 purificada e um anticorpo policlonal contra Hop/STI1, o anti-STI1.
 - Em duas sub-populações retinianas: células pós-mitóticas indiferenciadas e células ganglionares
- Estudar o papel de hop/STI1 na modulação da proliferação celular na retina em desenvolvimento através do tratamento com a proteína Hop/STI1 purificada ou com o anticorpo anti-STI1.

METODOLOGIA:

Animais: Foram utilizados ratos da raça *lister hooded* mantidos no biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; camundongos nocaute para PrP^C cedidos pelo Instituto Ludwig de Pesquisa de Câncer (SP), originários de uma colônia Zurich nocaute gentilmente cedidos pelos Drs Charles Weissmann (Imperial College, Londres) e Hans Kretzschmar (Universidade de Munique) e camundongos selvagens de uma linhagem mista C57BL6/J X 129 com background genético semelhante aos animais nocaute.

Tratamentos: Anisomicina (Sigma) tem seu estoque em água a 500µg/mL e foi utilizada na concentração de 1µg/mL. Forscolina (Calbiochem) é armazenada em DMSO a 10nM e utilizada a 10µM. O Rp-AMPC (Sigma e Calbiochem) foi utilizado a 100µM, o LY294002 (Calbiochem) a 20µM, U0126 (Calbiochem) a 10µM, PD98059 (Calbiochem) a 30µM e o cloreto de queleritrina (Sigma) a 1µM. Os inibidores foram pré-incubados por 30 minutos à exceção do Rp-cAMP que foi pré-incubado por 45 minutos. O anticorpo anti-STI1 foi produzido em coelho pela Bethyl (Montgomery, Texas, EUA)

Purificação de Hop/STI1: Plasmídeos pTrcHis2 contendo a seqüência de Hop/STI1 ou Hop/STI1^{Δ230-245} recombinantes que possuem uma cauda de histidina no C-terminal (gentilmente cedidos pela da Dr^a Vilma Martins do Instituto Ludwig de São Paulo) foram inseridos em *E. coli* (cepa DH5α) por meio de transformação por choque térmico.

Uma colônia isolada foi inoculada em 25 mL de LB - Luria's Broth (Invitrogen) contendo 50 µg/ml de ampicilina (para fins de seleção o plasmídeo

confere resistência a ampicilina), a 37°C, por aproximadamente 16 horas, sob agitação orbital. A suspensão de bactérias foi diluída 25 vezes em 1 litro de LB contendo 50 µg/ml de ampicilina, sendo mantida a 37°C, sob agitação orbital até que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento (DO₆₀₀ de 0,600).

Neste ponto do crescimento foi adicionado 1mM de IPTG (β -D-tiogalactopiranosídeo de isopropila) com o objetivo de induzir a expressão da proteína Hop/STI-1 recombinante, uma vez que o promotor inserido no plasmídeo é controlado pela lactose. Após 4 horas em presença de IPTG, as bactérias foram sedimentadas por meio de centrifugação a 4000 x g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet resultante foi ressuscitado em tampão de lise (50 mM de tampão fosfato pH 8, 300 mM de cloreto de sódio, 10 mM de imidazol (SIGMA), 1mM de fluoreto de fenil metil sulfonil - PMSF (SIGMA), 2 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de aprotinina, 2 µg/ml de pepstatina, 100 mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA e 1 mM de ditioneitol - DTT e este foi lisado sob alta pressão (16.000 psi), com o auxílio de uma prensa francesa (ThermoSpectronic). A fim de separar as proteínas em solução dos fragmentos celulares, o lisado foi centrifugado por 15 minutos, a 14000 rpm, a 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi incubado com a resina NTA (Amersham) carregada com níquel e previamente equilibrada com tampão de lise, sob agitação suave, a 4° C, por aproximadamente 16 horas. Para que as proteínas que não aderiram à resina fossem eliminadas, a resina foi centrifugada a 3500 rpm, por 3 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e a resina foi lavada duas vezes com o tampão de lise, e mais duas vezes com o tampão de lavagem (50mM de tampão fosfato pH 8, 300mM de cloreto de sódio e 50mM de imidazol). A seguir, a resina

foi transferida para uma coluna, e então o tampão de eluição (50mM de tampão fosfato pH 8, 300mM de cloreto de sódio, 500mM de imidazole) foi adicionado a fim de eluir da resina a proteína de interesse. Foram recolhidas 20 frações de aproximadamente 1ml cada. As frações contendo Hop/STI-1 His6 ou Hop/STI-1^{Δ230-245} His6 (detecção da proteína pelo método de Bradford) foram dosadas e então dialisadas contra TBS (20mM Tris-HCl, pH 7,5; 150mM NaCl).

Cultura de tecido: Experimentos de morte celular (partes 2 e 3 desta dissertação): Roedores neonatos foram sacrificados por decapitação, seus olhos retirados e as retinas dissecadas em meio de cultura Basal Medium of Eagle (Sigma)-Hepes 20mM, pH 7,2) com 5% de soro fetal bovino (Gibco), glutamina 2mM (Sigma) e Gentamicina 0,1mg/mL (Gibco). As retinas foram cortadas em explantes de aproximadamente 1mm² e mantidas no meio em agitação orbital a 37° C por 20h, submetidas a diferentes tratamentos. O tecido foi fixado por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato, pH 7,2, por uma hora seguido de solução de sacarose 20% no mesmo tampão. Os explantes foram orientados e congelados em *embedding medium Tissue Tek* (polietileno glicol 4,26%, polivinil álcool 10,24%) e cortadas seções de 10μm de espessura no criostato. Os protocolos experimentais de obtenção de retinas foram aprovados pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do IBCCF°.

Preparação das lâminas: Para analisar a morte celular programada coramos os cortes de tecido com a anilina básica vermelho neutro e o intercalante de DNA fluorescente *Sytox Green*. As células em processo de morte são identificadas com estes corantes por se mostrarem condensadas na microscopia óptica. A coloração

com vermelho neutro foi feita mergulhando as lâminas seqüencialmente em solução 5% de tampão acetato 0,1M, pH 3,3, por dois minutos, na solução de vermelho neutro 1% por 30 segundos e novamente na solução 5% de tampão acetato 0,1M, pH 3,3, por um minuto.

Após secagem as lâminas foram desidratadas por imersão em etanol absoluto por 30 segundos e em xilol por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram recobertas com Entellan (Merck) e lamínulas, em capela própria para materiais tóxicos.

A marcação com *Sytox Green* foi feita colocando as lâminas em PBS (CaCl₂ 0,680 mM, KCl 2,7mM, KH₂PO₄ 1,47mM, MgSO₄ 0,489mM, NaCl 136mM e Na₂HPO₄ 8mM) por 2 minutos, retirando o excesso de PBS sem deixar os cortes secarem e aplicando a solução do intercalante sobre os cortes por 10 segundos. Em seguida cada lâmina foi lavada separadamente e montada com glicerol-N-propil galato (Sigma).

A morte do tipo apoptótico foi identificada pela presença de DNA fragmentado através do ensaio de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*). Este se baseia na ligação da enzima terminal desoxinucleotil transferase (TdT) a terminações 3'OH livres do DNA levando à síntese de um polímero de desoxinucleotídeos. A enzima é utilizada para a incorporação de desoxinucleotídeos biotinilados aos sítios de quebra de DNA. A biotina é reconhecida por avidina conjugada a um composto fluorescente, tornando possível a identificação por microscopia de fluorescência (Gavrieli et al, 1992).

Para a detecção de DNA fragmentado *in situ* os cortes foram incubados com triton X-100 (Sigma) a 0,5% em PBS por 15 minutos. As lâminas foram

lavadas com PBS e pré-incubadas com tampão da enzima TdT por 20 minutos. Em seguida os cortes foram incubados por 3 a 4 horas a 37° C em solução contendo 0,5U/μL TdT (Gibco BRL), 0,2nmol/μL dATP e 0,013nmol/μL dATP biotinilado em tampão da enzima TdT. A reação foi interrompida pela adição de EDTA 20mM por 5 minutos e os cortes foram lavados com PBS. A revelação foi feita pela incubação de estreptavidina conjugada com FITC (Amersham).

Detecção de morte celular programada: A detecção de condensação da cromatina por coloração com a anilina básica vermelho neutro foi feita por contagem de perfis picnóticos, indicativos de células em processo de morte. As lâminas coradas com o intercalante de DNA *Sytox Green* e as usadas para detecção de fragmentação de DNA *in situ* (ensaio de TUNEL com o kit Apoptag® Plus da Intergen) também foram feitas por triplicatas de contagem de três campos delimitados por uma gráticula de 0,0148 mm² na camada neuroblástica, e por triplicata da porcentagem de células com perfil condensado/TUNEL positivas na camada de células ganglionares. Estudos mostraram que a porcentagem de células amácrinas deslocadas na camada ganglionar é de 5-10% em ratos neonatos (Rabacchi et al, 1994), de modo que consideramos todas as células nesta camada como ganglionares.

Imunohistoquímica: As lâminas foram inicialmente incubadas com Triton 0,5% em tampão PBS. As lavagens foram feitas com tampão PBS e as lâminas pré-incubadas com *Bovine Serum Albumine* (Sigma) 1% em PBS por 2 horas. O anticorpo primário (anti-STI1 1:500; Bethyl) foi incubado por 24 horas a 4° C. O anticorpo secundário foi do kit ABC-HRP (Vector) e a revelação realizada por DAB.

Extração de proteína: Para o *Western Blot* foram feitas extrações de proteínas totais com tampão Laemmli (Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, SDS 3%, Glicerol 10%, EDTA 10mM, pH8,0, PMSF 1mM, aprotinina 10 µg/mL, ortovanadato de sódio 1mM, fluoreto de sódio 5mM, pepstatina 10µg/mL , leupeptina 2µg/mL) ou RIPA modificado (Tris-HCl 50mM ph=7,4; NaCl 150mM; NP40 1%; Deoxicolato de Sódio 0,25%; EDTA 1mM pH 7,5; aprotinina 1µg/mL, leupeptina 1µg/mL; pepstatina 1µg/mL; PMSF 1mM; ortovanadato de sódio 1mM; fluoreto de sódio 1mM) a partir das retinas dissecadas. Estas foram lavadas por duas vezes após a dissecação (em meio BME sem soro) com PBS gelado e em seguida mantidas com o tampão de extração a 4° C por 30 minutos sendo periodicamente vortexadas.

Western Blot: As amostras de extração de proteína foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond). A membrana foi pré-incubada com solução de leite molico a 5% em tampão TBS com Tween 0,1% (TBS-T) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida foi incubada com anticorpo primário em leite 5% ao longo da noite a 4° C. Após três lavagens de 15 minutos com tampão TBS-T foi incubada com anticorpo secundário por 1 hora à temperatura ambiente. Após outras três lavagens a revelação foi feita com kit ABC-Elite. Os anticorpos utilizados para *western blot* foram: anti-STI1 (Bethyl); anti-ERK1 (Santa Cruz); anti-IgG rabbit HRP (Cell Signaling).

Ensaio de proliferação: Nos experimentos de proliferação ratos P2 ou camundongos C57/129 neonatos foram sacrificados por decapitação, seus olhos retirados e as retinas dissecadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle

Medium sem soro com glutamina 2mM (Sigma) e Gentamicina 0,1mg/mL (Gibco). As retinas foram cortadas em explantes de aproximadamente 1mm² e mantidas em placa de 24 poços a 37° C em estufa a 5% CO₂ por 6 ou 24 horas. ³H-timidina foi adicionada nas últimas duas horas de incubação na concentração final de 2uCi/uL. Após a incubação os explantes foram lavados com PBS (CaCl₂ 0,680 mM, KCl 2,7mM, KH₂PO₄ 1,47mM, MgSO₄ 0,489mM, NaCl 136mM e Na₂HPO₄ 8mM) e homogeneizados com 200uL de NaOH 0,4N no vortex. Estas amostras são processadas de duas maneiras: dosagem de proteína pelo método de Lowry e análise da radioatividade em cintilador. Para preparar as amostras para leitura no cintilador líquido 50uL de cada amostra foram recolhidos em replicata e diluídos em ácido tricloroacético (TCA) 10%. Este homogenato foi filtrado em aparelho kitassato com filtros GF/A Whattman, lavado uma vez com TCA 10% e uma vez com etanol absoluto. Os filtros foram secos em estufa a 100° C por 30 minutos e imersos em líquido de cintilação para leitura em cintilador líquido Packard modelo 1600TR. As contagens por minuto resultantes da leitura no cintilador são normalizadas para a quantidade de proteína de cada amostra, sendo a unidade de medida cpm/mg de proteína.

Dosagem de proteína pelo método de Lowry (Lowry et al, 1951): Foram preparadas uma curva padrão com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) e duplicatas das amostras. As amostras e o BSA foram diluídos com água MilliQ para um volume final de 200µL. Cada tubo foi incubado com 2mL de RCA (sulfato de cobre 0,01%; tartarato de NaK 0,02%; carbonato de sódio 0,02% em hidróxido de sódio 0,1N) por 10 minutos seguido de adição de 100µL de Folin por 30 minutos antes da leitura das amostras no espectrofotômetro. A leitura foi

feita usando o filtro de 750 nm e a densidade óptica obtida para cada amostra comparada com a curva padrão para aferir a concentração de proteínas correspondente.

Dosagem de AMPc: A dissecção foi feita em meio BME/HEPEs sem soro e a estimulação no mesmo meio acrescido de 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (marca) 100 μ M. Os explantes são pré-incubados por 10 minutos com IBMX que permanece durante o estímulo. A estimulação foi de 10 minutos com parada da reação por adição de TCA 100%. As amostras acrescidas de 20nCi de 3 H-AMPc passaram por uma coluna de troca iônica. A fração com maior recuperação de 3 H-AMPc foi utilizada para um ensaio com a enzima PKA. No ensaio é feita uma curva padrão com BSA, tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,0, 3 H-AMPc 10pmol/mL e concentrações crescentes de AMPc, substituídas por duplicatas das amostras no restante do ensaio. A reação foi feita em banho de gelo por 100 minutos e parada pela adição de tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 6,0. As amostras foram filtradas em filtros HAWP02500 e a radioatividade analisada em cintilador líquido. A concentração de AMPc é definida a partir da curva padrão (Gilman, 1970; De Mello, 1978).

Estatística: O programa estatístico utilizado foi GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California EUA. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

Tratamento estatístico dos dados de Proliferação e Morte Celular: Na preparação dos explantes de retina é feito um *pool* dos explantes de todos os animais utilizados no experimento. Como todos os animais utilizados pertencem a uma mesma ninhada, temos um desenho de experimento pareado, em que um

conjunto equivalente de explantes sofre diferentes tratamentos. Desta forma, analisamos os dados com testes t pareados ou ANOVA com medidas repetidas.

Nos experimentos de morte celular, contamos três explantes de cada tratamento. Como contagem de cada explante é considerada uma média das contagens de três locais diferentes do explante. Como controle interno foi feito um teste para ver se havia diferença estatística entre as diferentes porções dos explantes, e entre explantes do mesmo tratamento (dados não mostrados). A ausência de significância indicou que a preparação dos explantes é válida.

Os resultados de proliferação se mostraram consistentes ao longo dos experimentos. Como na técnica de timidina tritiada existe uma variabilidade muito grande no *input* entre experimentos, para facilitar a visualização dos resultados normalizamos os dados para porcentagem do controle. Por estarmos lidando com porcentagem, utilizamos um teste estatístico não paramétrico, *wilcoxon signed rank test*. Ao normalizar os dados em relação ao controle, estávamos expressando o pareamento do desenho experimental, portanto fizemos o teste em uma coluna, a do tratamento.

O *wilcoxon signed rank test* testa os nossos valores contra uma mediana estabelecida por nós, que era o 100% do controle. Ao trabalhar com a mediana, não estamos assumindo uma distribuição normal. Se o nosso conjunto de dados se afasta o suficiente da mediana de 100% podemos supor que se trata de uma outra população, e que o tratamento funciona. Por ser um teste não paramétrico, ele é menos potente, o que indica que nossos dados são robustos.

Testes não paramétricos como este não aceitam n menor do que 5, de modo que nosso dado de tratamento com Hop/ST11 em camundongos selvagens

(fig. 25) não sofreu teste estatístico. Em todas as medidas a contagem ficou do mesmo lado da mediana, de modo que muito provavelmente aumentando o n para 5 atingiremos significância estatística.

RESULTADOS

1. Desenvolvimento e Hop/STI1

Verificamos por imunohistoquímica (Fig. 7A) e por *western blot* (Fig 7B) que Hop/STI1 é expressa na retina de rato neonato. Utilizando um anticorpo policlonal anti-STI1, fizemos uma imunohistoquímica para a proteína Hop/STI1 em retina de rato P1 e comparamos por *western blot* a expressão de Hop/STI1 em retina de ratos neonatos e em ratos com 29 dias pós-natal (P29), momento em que a retina se encontra em estágio maduro (fig 7B). Verificamos que Hop/STI1 é mais expressa na retina em desenvolvimento do que no tecido adulto. O *western blot* apresenta uma única banda - que corresponde ao peso de 66 kDa - atestando a especificidade deste anti-STI1, que será utilizado em etapas posteriores do trabalho.

A partir da evidência de uma maior expressão de Hop/STI1 durante este período, exploramos o papel desta proteína na modulação de eventos de morte e proliferação celular na retina.

Figura 7:

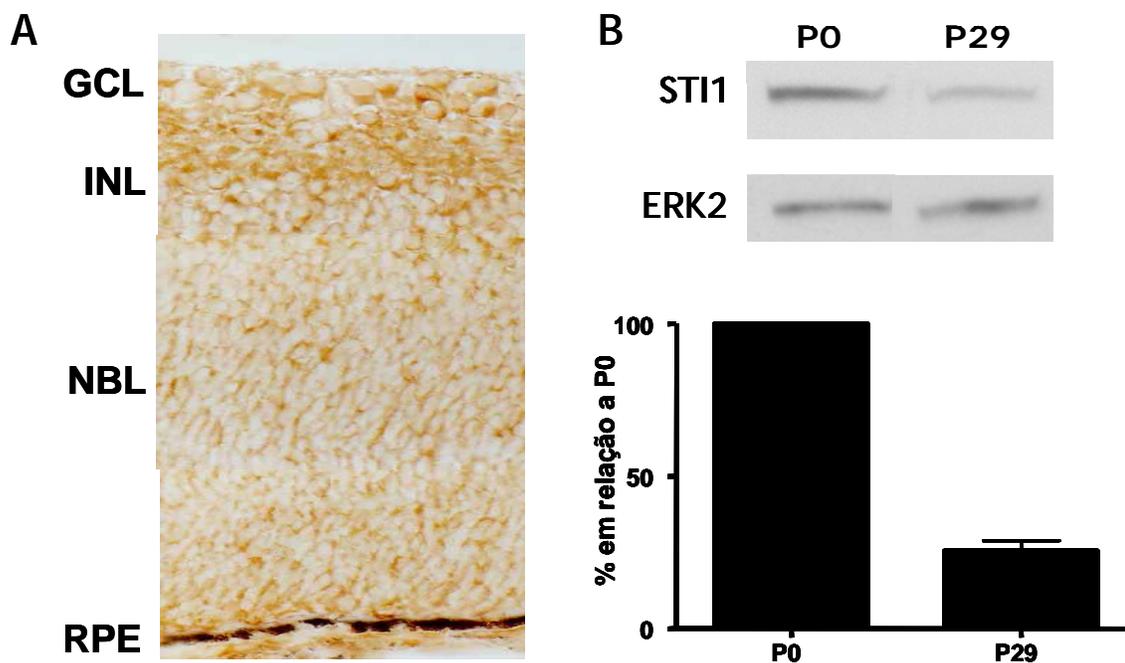


Figura 7: Expressão de Hop/STI1 na retina de rato. Em **A** imunohistoquímica para Hop/STI1 em retina de rato neonato. Em **B** *western blot* típico para a proteína Hop/STI1 com extratos de proteína total de retinas de ratos neonatos e com 29 dias após o nascimento (P0 e P29 respectivamente) e a densitometria de dois experimentos independentes. Como controle de carregamento foi utilizada marcação para a proteína constitutiva ERK2.

2. Hop/STI1 e modulação da morte celular programada

2.1 Hop/STI1 e células pós-mitóticas indiferenciadas da retina:

2.1.1 Neuroproteção na camada neuroblástica

Rehen e colaboradores demonstraram que o tratamento de explantes de retina de ratos neonatos com o inibidor de síntese protéica anisomicina induz morte celular em uma população específica de células na camada neuroblástica da retina, que haviam saído do ciclo celular mas ainda não haviam se diferenciado (Rehen et al, 1999). Trabalhos do nosso grupo demonstraram que o tratamento com Hop/STI1 era capaz de bloquear a morte celular induzida por anisomicina na NBL, e que este efeito era dependente de PrP^C (Zanata et al, 2002; Chiarini et al, 2002).

Para testar se a Hop/STI1 endógena teria um papel na modulação da morte celular programada, utilizamos um anticorpo policlonal dirigido a esta proteína (anti-STI1, Bethyl). A incidência de morte celular foi analisada pela quantificação de células com cromatina condensada após os diferentes tratamentos. O tratamento de explantes de retina de ratos neonatos com anti-STI1 por 20 horas *in vitro* não induziu morte celular na camada neuroblástica (fig. 8A-D e 9A). O anticorpo anti-STI1 se mostrou neuroprotetor contra a morte celular induzida por anisomicina na NBL (fig.8A-D e 9A). Não foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e o com anti-STI1 na presença de anisomicina.

Para confirmar o efeito de redução de morte celular pelo tratamento com anti-STI1, utilizamos outro método de detecção de morte celular programada, ensaio de fragmentação de DNA *in situ* – método de TUNEL (Fig.8E-H e 9B).Este

método permite a visualização de células com fragmentação de DNA, característica de morte celular por apoptose.

Este efeito foi específico do anticorpo para Hop/STI1, uma vez que tratamento com IgG purificada de soro não-imune não bloqueou a morte celular na NBL (Fig.9C).

Figura 8:

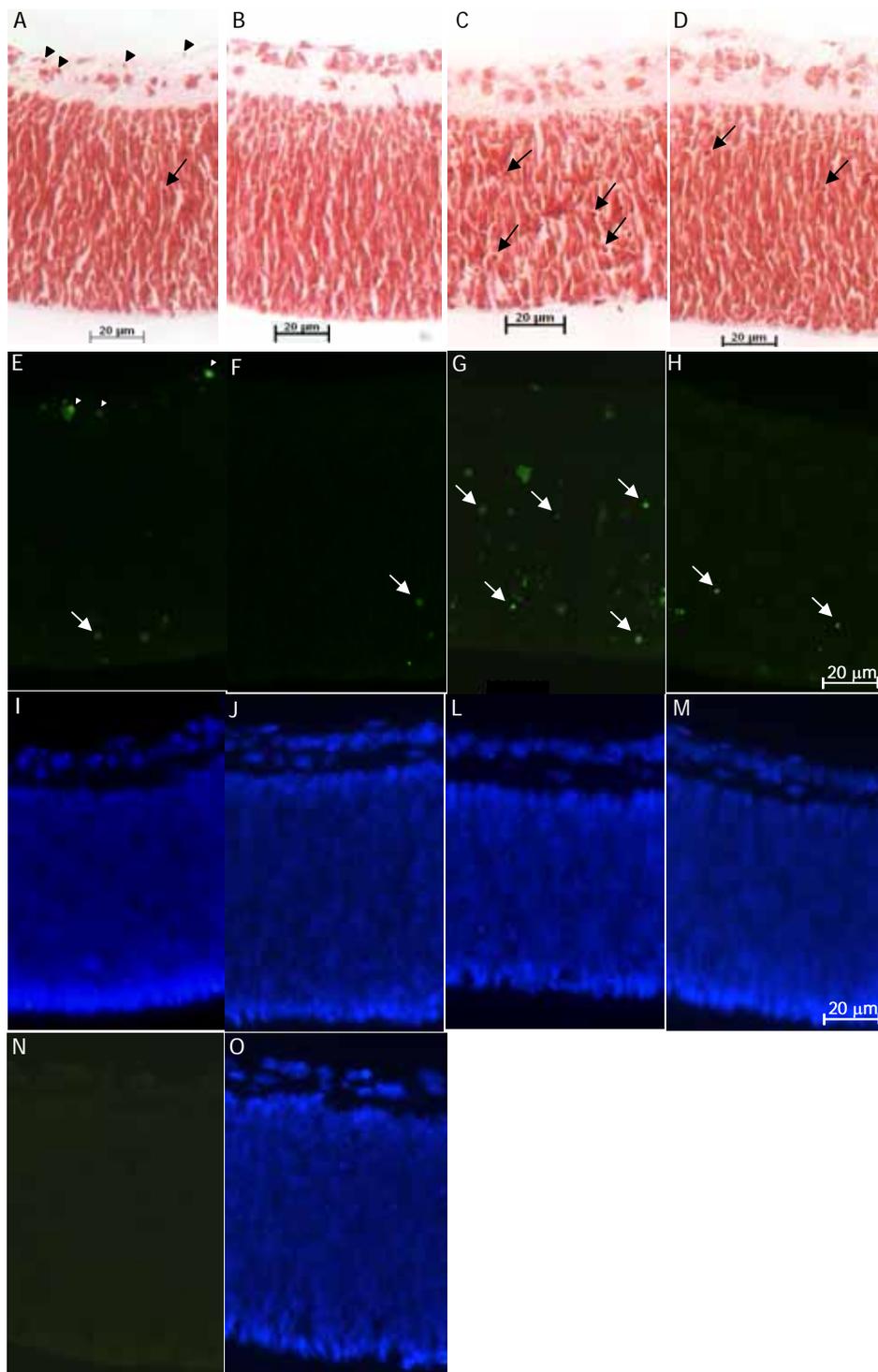


Figura 8: Anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por anisomicina na NBL. Explantes de retina de ratos neonatos foram mantidos em cultura por 20h sob diferentes tratamentos. Micrografias de cortes de explantes que sofreram coloração por vermelho neutro (A-D), reação de TUNEL (E-H e N) ou marcação com dapi (I-M e O) dos grupos controle (A, E e I), anti-STI1 (B, F e J), Anisomicina (C, G e L) e anisomicina + anti-STI1 (D, H e M). Controle negativo: N-O. Cabeças de seta pequenas e grandes indicam células em degeneração na GCL e NBL, respectivamente.

Figura 9:

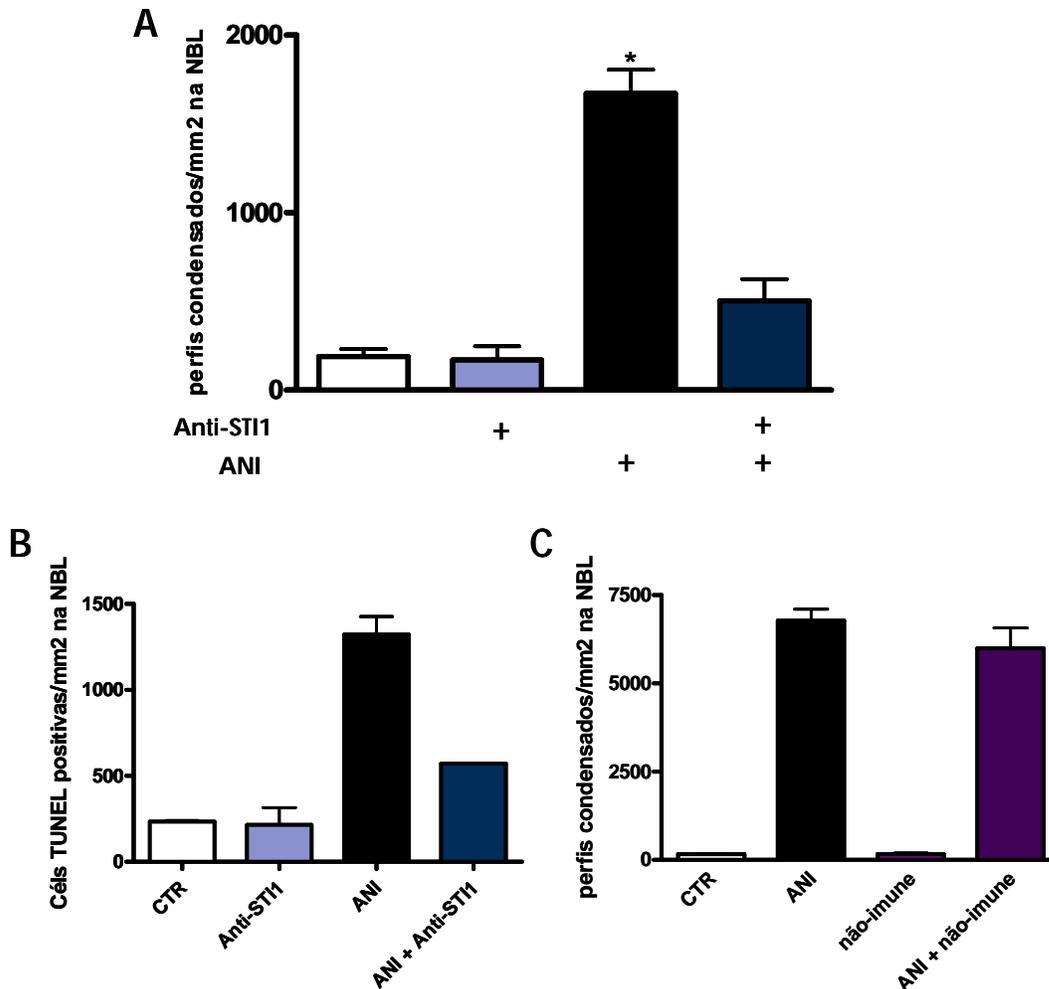


Figura 9: Anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por anisomicina na NBL. Explantes de retina de ratos neonatos foram mantidos em meio BME 5% soro por 20h sob agitação orbital na presença ou ausência de anisomicina 1ug/mL (ANI), anti-STI1 0,0044mg/mL (anti-STI1) ou IgG purificada de soro não-imune na mesma concentração (não-imune). A morte celular programada foi avaliada por coloração por vermelho neutro (A e C) ou ensaio de fragmentação de DNA *in situ*, método de TUNEL (B). O teste estatístico utilizado em A foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,001$; $n = 7$ em triplicata). ($n = 2$ em triplicata em B e $n = 1$ em triplicata em C).

2.1.2 PrP^C como possível parceira de anti-STI1 na NBL

Para testar se o efeito de anti-STI1 envolve a interação Hop/STI1-PrP^C - por uma possível otimização da ligação entre as duas proteínas - utilizamos camundongos C57/129 selvagens (wt) e nocaute para a proteína príon celular (PrP^{0/0}).

Verificamos que anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por anisomicina na NBL de camundongos (fig. 10A). Este bloqueio também ocorre em retinas de camundongos que não expressam PrP^C (fig. 10A), indicando que o efeito protetor de anti-STI1 é independente da proteína príon celular. Todos os camundongos utilizados foram genotipados por PCR, cujo produto da reação é a amplificação de uma banda de 1400pb para os camundongos nocautes e uma de 700pb para os selvagens (fig. 10B, dados não mostrados). Nestes experimentos feitos com retinas de camundongos, em função de uma menor disponibilidade de animais, foi utilizada uma maior concentração de anti-STI1 (0,0088mg/mL), porém a concentração utilizada em ratos (0,0044mg/mL) também é protetora em camundongos (dados não mostrados).

Tendo caracterizado que anti-STI1 bloqueia a morte das células da camada neuroblástica induzida por anisomicina e que o faz de forma independente de PrP^C, investigamos as vias de transdução de sinal envolvidas nesta proteção.

Figura 10:

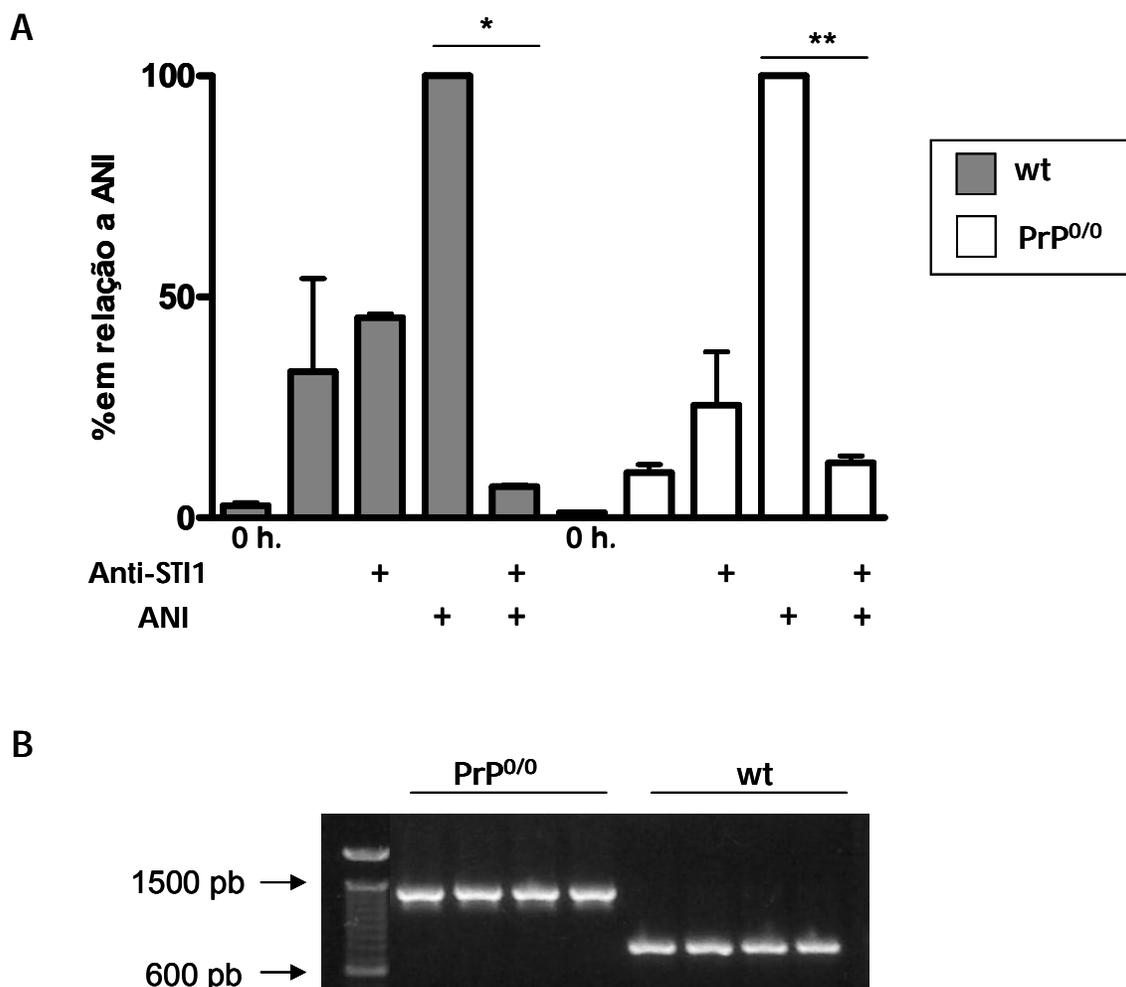


Figura 10: Anti-STI1 bloqueia a morte celular programada na NBL de forma independente de PrP^C. **A:** Explantes de retina de camundongos C57/129 selvagens (barras cinza) ou nocautes (barras brancas) para a proteína príon celular foram fixados imediatamente após axotomia (barras 0h.) ou mantidos em meio BME 5% soro por 20h sob agitação orbital na presença ou ausência de anisomicina 1ug/mL (ANI) ou anti-STI1 0,0088mg/mL (anti-STI1). A MCP foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Tukey (**p<0,01 e *p<0,05; n=2 em triplicata). **B:** PCR típico da genotipagem dos camundongos do experimento. A banda de 1400pb é correspondente à amplificação do gene do animal nocaute para PrP^C enquanto a banda de 700 pb identifica o animal selvagem. Todos os animais foram genotipados.

2.1.3 Anti-STI1 e vias de sinalização na NBL

Como a via de AMPc/PKA é protetora nesta população celular e foi descrita ativação desta via por Hop/STI1, investigamos se anti-STI1 modula a via de AMPc/PKA. O tratamento com anti-STI1 por dez minutos não aumentou os níveis intracelulares de AMPc. Por outro lado, o tratamento com ativador de adenilil ciclase, forskolina a 10 μ M, utilizado como controle positivo do experimento, aumentou os níveis intracelulares de AMPc em explantes de retina (Fig. 11A). Além disso, Anti-STI1 bloqueou a morte celular induzida por anisomicina na NBL na presença do inibidor de proteína cinase A, Rp-cAMPS, (Fig. 11B), demonstrando que esta via não é necessária ao efeito neuroprotetor de anti-STI1. Na presença de Rp-cAMPS não houve alteração no quadro de morte celular induzido por anisomicina (Fig. 11B). Experimentos realizados em paralelo no laboratório comprovaram que o inibidor estava funcionando neste período (Juliana Adão, comunicação pessoal).

Outra via de sinalização classicamente descrita como protetora no sistema nervoso é a via de PI3K/PKB. Tratamento com LY294002 a 20 μ M por 20 horas não provoca morte das células da camada neuroblástica (Cláudia Campos, comunicação pessoal; Fig.12). Apesar do inibidor não ter induzido morte em trabalhos prévios do laboratório e em três dos nossos quatro experimentos, tivemos um experimento com alta taxa de morte, o que aumentou a barra de erro. LY294002, no entanto, potencializa a morte celular causada por anisomicina (Fig. 12). Anti-STI1 é capaz de bloquear a morte celular mesmo com a via da PI3K

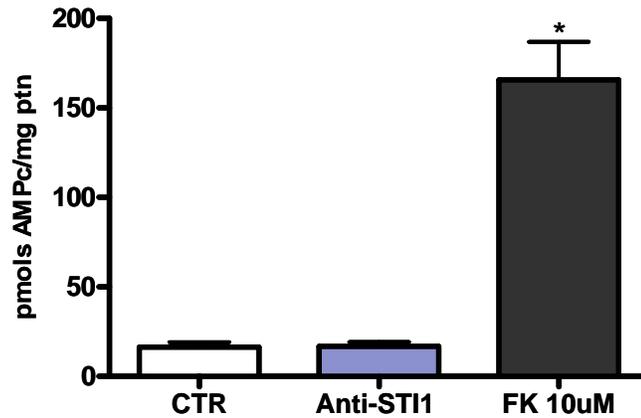
inibida (Fig. 12). Este bloqueio, no entanto, não retorna o nível de morte ao do controle, sendo parcial.

Foi descrito envolvimento da via de PKC em um efeito de Hop/STI1 (Arantes et al, em preparação). Esta via de sinalização está envolvida na modulação da sobrevivência em diversos modelos (para revisão Gutcher et al, 2003). Para testar o envolvimento da via de PKC no efeito protetor de anti-STI1 utilizamos o inibidor de PKC cloreto de queleritrina.

A inibição de PKC não alterou o quadro de morte celular induzido por anisomicina (Fig.13). O bloqueio da morte celular induzido por anti-STI1 ocorre mesmo quando a PKC está inibida (Fig.13), mostrando que esta via não está envolvida nesta sinalização. A atividade do inibidor foi confirmada por experimentos feitos em paralelo no laboratório (Juliana Adão, comunicação pessoal).

Figura 11:

A



B

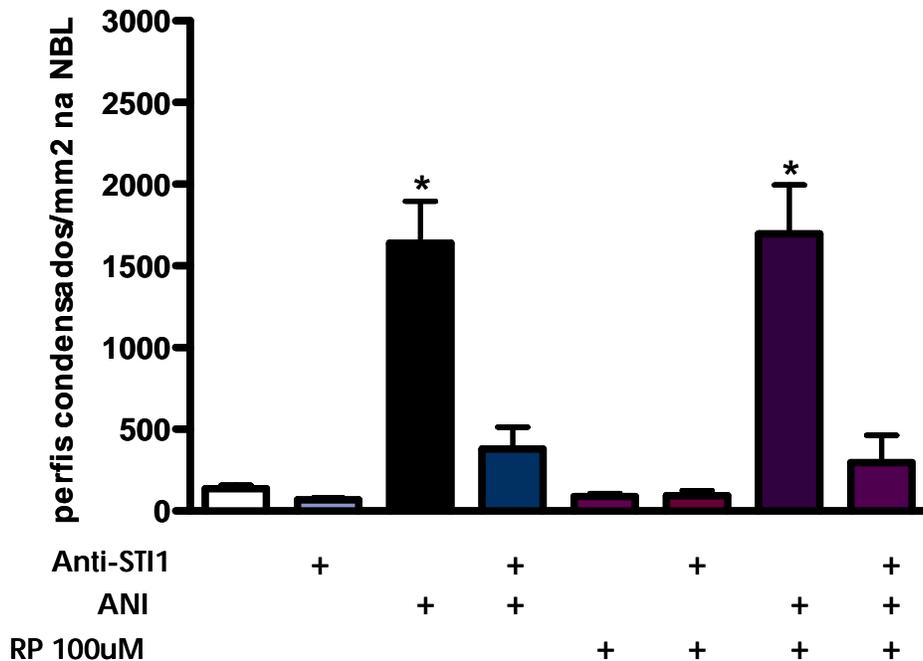


Figura 11: Anti-STI1 bloqueia a morte celular na NBL de forma independente de AMPc/PKA. A: Dosagem de AMPc. Explantes de retina de ratos neonatos foram mantidos em meio BME sem soro por 20 minutos na presença do inibidor de fosfodiesterase IBMX e tratados com anti-STI1 0,0044mg/mL ou o ativador de adenilil ciclase forskolina 10uM por dez minutos. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Dunnet (* $p < 0,01$; $n = 4$ em duplicata). B: Explantes de retina de ratos neonatos foram mantidos em meio BME 5% de soro sob agitação orbital por 20h na presença ou ausência de anisomicina 1 μ g/mL (ANI), anti-STI1 0,0044mg/mL ou do inibidor de PKA Rp-cAMP 100 μ M. A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,001$; $n = 3$ em triplicata). O inibidor foi pré-incubado por 45 minutos.

Figura 12:

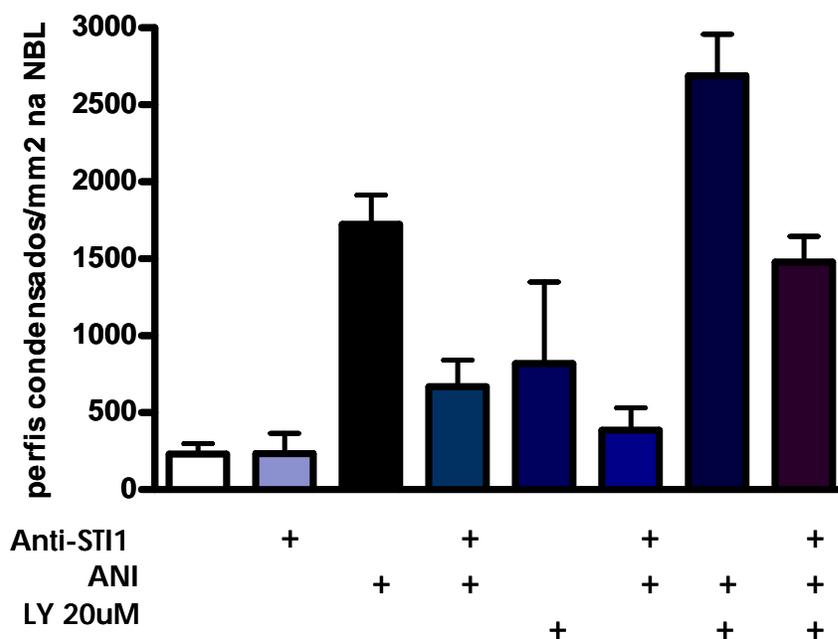


Figura 12: Anti-STI1 bloqueia a morte celular na NBL de forma independente de PI3K. Explantes de retina de ratos neonatos foram mantidos em meio BME 5% de soro sob agitação orbital por 20h na presença ou ausência de anisomicina 1 μ g/mL (ANI), anti-STI1 0,0044mg/mL ou do inibidor de PI3K LY294002 (LY) 20 μ M. A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro. (n=4 em triplicata). O inibidor foi pré-incubado por 30 minutos.

Figura 13:

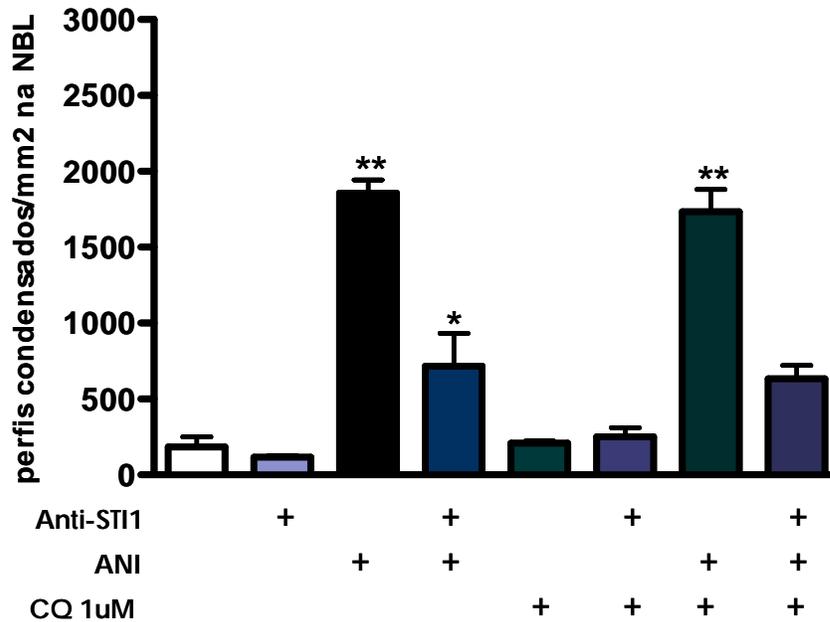


Figura 13: Anti-STI1 bloqueia a morte celular na NBL de forma independente de PKC. Explantes de retina de ratos neonatos foram mantidos em meio BME 5% de soro sob agitação orbital por 20h na presença ou ausência de anisomicina 1 μ g/mL (ANI), anti-STI1 0,0044mg/mL ou do inibidor de PKC cloreto de queleritina (CQ) 1 μ M. A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Tukey (**p<0,001 n=3 em triplicata) (*p<0,05 ctr x ani+anti-sti1). O inibidor foi pré-incubado por 30 minutos.

2.2. Hop/STI1 e células diferenciadas da retina

2.2.1 Hop/STI1 e anti-STI1 e células ganglionares

Para que a preparação dos explantes de retina seja feita, os olhos precisam ser enucleados. Quando isto acontece é feito um corte no nervo óptico, que significa uma axotomia para as células ganglionares da retina. Esta axotomia induz a morte destas células com um pico de morte atingido em 18 horas (Rehen et al. 1993; Rehen et al, 1996; Chiarini, LB, tese de doutorado).

Hop/STI1 tem efeito protetor dependente de PrP^C na camada neuroblástica da retina (Zanata et al, 2002). O peptídeo complementar, PrR, não teve efeito na morte das células ganglionares da retina (Chiarini et al, 2002). Visto que na NBL Hop/STI1 também medeia um efeito neuroprotetor independente de PrP^C testamos o efeito de Hop/STI1 e anti STI1 na modulação da sobrevivência das células ganglionares. Para tal, escolhemos a concentração de 3μM, menor concentração em que Hop/STI1 tem efeito protetor nas células pós-mitóticas indiferenciadas. O tratamento de 20 horas com Hop/STI1 3μM não bloqueou a morte das células ganglionares induzida por axotomia (Fig.14), sugerindo que esta proteína não é protetora nesta população celular. O tratamento com o peptídeo PrR ou com o peptídeo 230-245 de STI1 em diferentes concentrações também não alterou o quadro de morte destas células (LB Chiarini, dados não publicados).

Após 20 horas *in vitro*, há incidência de perfis condensados na camada de células ganglionares, indicativo de células em degeneração (Fig. 15A-B e 16A, micrografias). Verificamos, através de análise de cortes de explantes corados com *sytox green*, que o tratamento com o anticorpo contra Hop/STI1 (Anti-STI1 da

Bethyl) por 20 horas *in vitro* reduziu a incidência destes perfis condensados (Fig. 16A, micrografias). A quantificação destes experimentos mostrou que anti-STI1 bloqueou a morte das células ganglionares induzida por axotomia (Fig. 16A, gráfico). Realizamos ainda ensaio de fragmentação de DNA *in situ* (método de TUNEL) (Fig 15C-D e a quantificação em 16B) e verificamos uma menor incidência de células com fragmentação de DNA na GCL de explantes tratados com anti-STI1 em comparação ao controle. Esta neuroproteção foi específica do anti-STI1, uma vez que o tratamento com IgG purificada a partir do soro não-imune não bloqueou a degeneração das células ganglionares induzida por axotomia (Fig. 16C).

Figura 14:

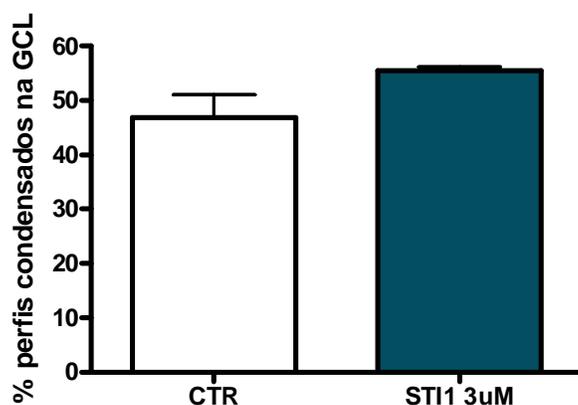


Figura 14: Hop/STI1 não bloqueia a morte celular induzida por axotomia na GCL. Explantes de retina de ratos neonatos foram tratados *in vitro* por 20h imediatamente após axotomia na presença ou ausência de Hop/STI1 3 μ M em meio BME 5% de soro sob agitação orbital. A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi teste t de Student pareado ($p > 0,05$, $n = 3$ em quintuplicata).

Figura 15:

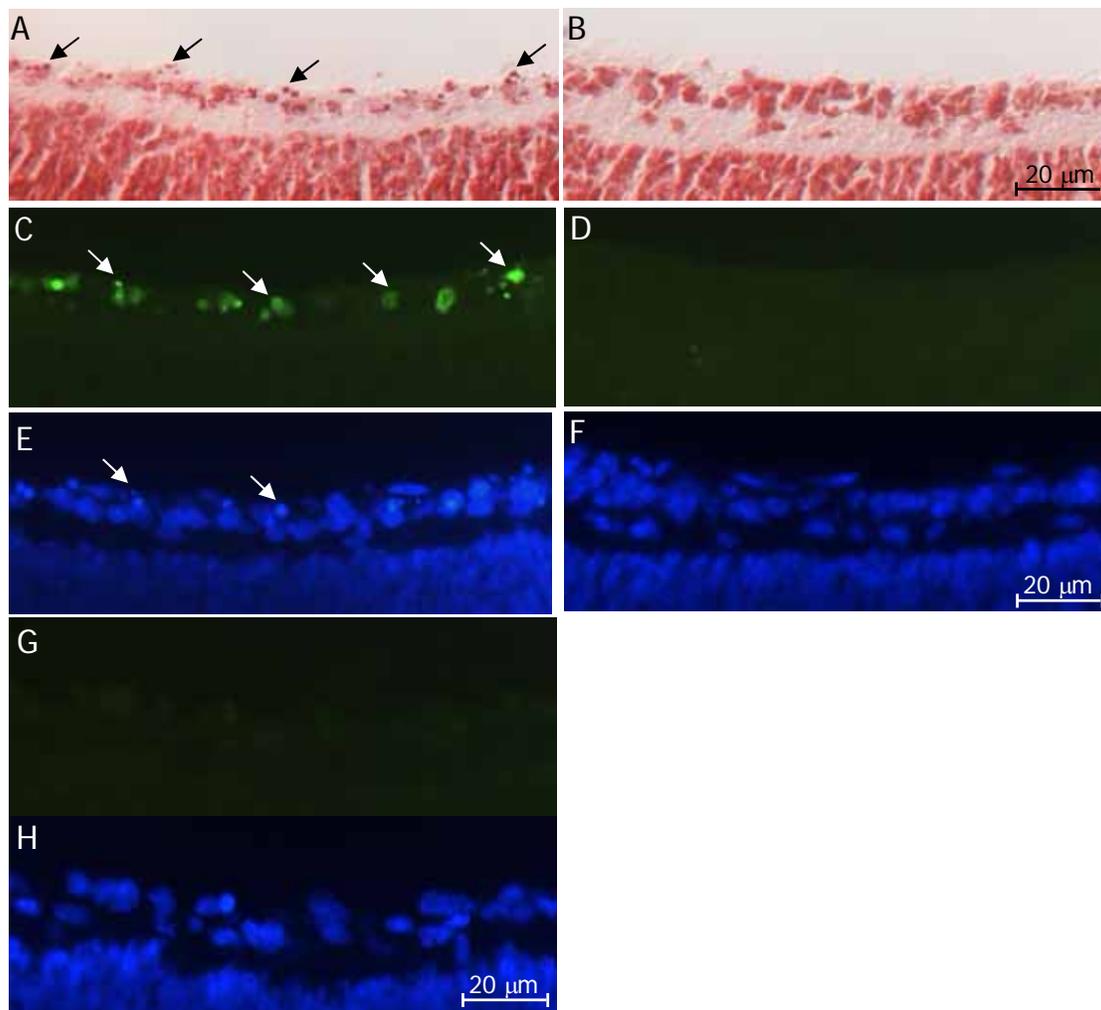


Figura 15: Anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por axotomia na GCL. Explantes de retina de ratos neonatos foram tratados *in vitro* por 20h imediatamente após axotomia na presença ou ausência de anti-STI1 0,0044mg/mL em meio BME 5% de soro sob agitação orbital. Micrografias de cortes de explantes que sofreram coloração por vermelho neutro (A-B), reação de TUNEL (C-D e G) ou marcação com dapi (E-F e H) dos grupos controle (A, C e E) e anti-STI1 (B, D e F). Controle negativo: G-H. As setas indicam células ganglionares em degeneração.

Figura 16:

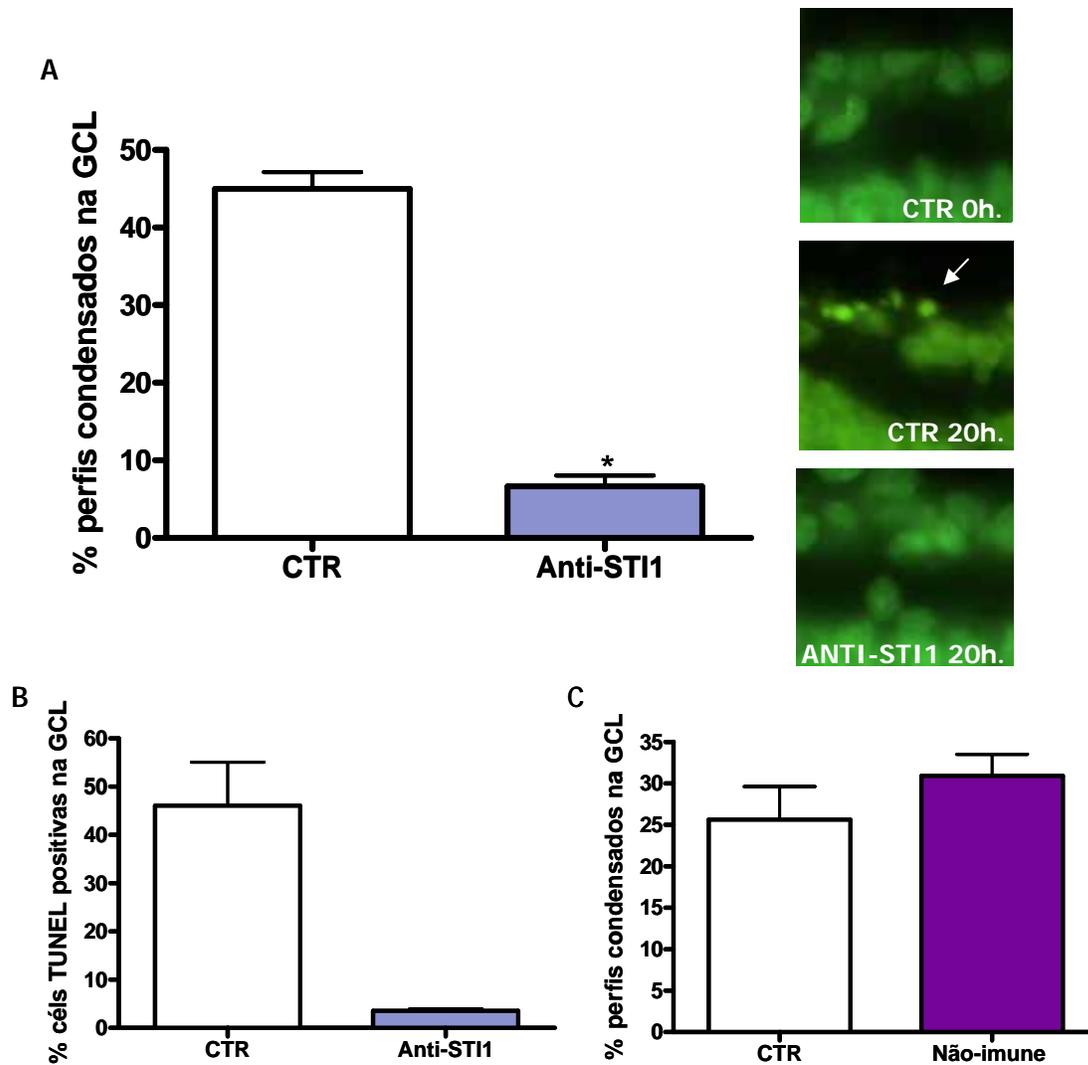


Figura 16: Anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por axotomia na GCL. Explantes de retina de ratos neonatos foram tratados *in vitro* por 20h imediatamente após axotomia na presença ou ausência de anti-STI1 0,0044mg/mL (A e B) ou IgG purificada de soro não-imune na mesma concentração (C) em meio BME 5% de soro sob agitação orbital. A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro ou Sytox Green (A e C) ou por ensaio de fragmentação de DNA *in situ*, método de TUNEL (B). O teste estatístico utilizado em A foi teste t de Student pareado ($p < 0,0001$, $n = 11$ em triplicata). ($n = 3$ em triplicata em B e $n = 1$ em triplicata em C). Micrografias: camada de células ganglionares marcada com Sytox Green 0h. e 20 horas após axotomia nas condições controle (CTR), e com anti-STI1. As setas indicam células com cromatina condensada.

2.2.2 PrP^C como possível parceira de Hop/STI1 na GCL

Testamos se o bloqueio da morte das células ganglionares por anti-STI1 envolve PrP^C. Para tal utilizamos camundongos C57/129 selvagens e nocautes para PrP^C.

Verificamos que o tratamento com anti-STI1 bloqueou a morte das células ganglionares induzida por axotomia nos camundongos de ambos genótipos (Fig. 17), indicando que PrP^C não está envolvida neste efeito protetor. Nestes experimentos utilizamos uma concentração maior de anti-STI1 (0,0088mg/mL), porém a concentração utilizada em ratos (0,0044mg/mL) também é protetora em camundongos na GCL (dados não mostrados). Todos os animais utilizados nestes experimentos tiveram seu genótipo confirmado por PCR (dados não mostrados).

Figura 17:

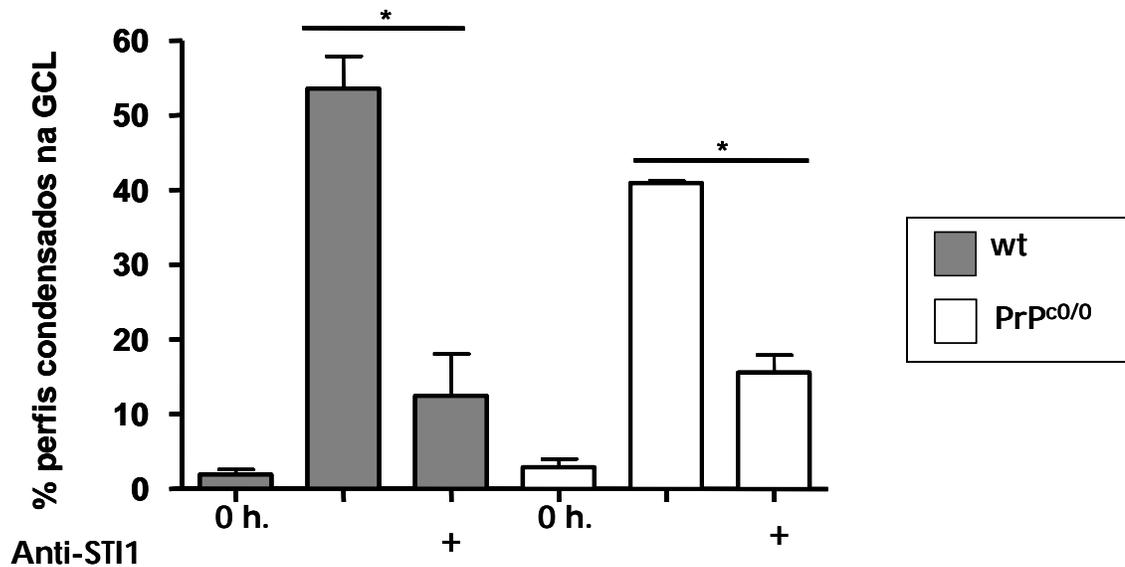


Figura 17: Anti-STI1 bloqueia a morte celular programada na GCL de forma independente de PrP^C. Explantes de retina de camundongos c57/129 selvagens (barras cinza) ou nocautes (barras brancas) para a proteína príon celular foram mantidos *in vitro* por 20h imediatamente após axotomia na presença ou ausência de anti-STI1 0,0088 mg/mL em meio BME 5% de soro sob agitação orbital. A MCP foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Dunnet vs controle (*p<0,01; n=3 em triplicata).

2.2.3 Anti-STI1 e vias de sinalização na GCL

Testamos se o bloqueio da via de AMPc/PKA seria capaz de impedir o efeito protetor do anticorpo. Para isso utilizamos o inibidor de PKA, Rp-cAMPS, na concentração de 100 μ M, que bloqueia o efeito protetor do peptídeo 1 de Hop/STI1 contra a morte celular induzida por anisomicina na NBL (Chiarini et al, 2002) e o de Hop/STI1 contra estaurosporina em culturas primárias de neurônios hipocâmpais (Lopes et al, 2005). A inibição de PKA não induziu mais morte nas células ganglionares (Fig. 18). O anticorpo anti-STI1 bloqueou a degeneração na GCL mesmo na presença do inibidor de PKA Rp-cAMPS (Fig. 18).

A via de PI3K é a principal via de sobrevivência descrita para neurônios. Utilizamos o inibidor de PI3K, LY294002, para analisar se esta via estaria envolvida no efeito de anti-STI1. O tratamento de 20 horas com LY294002, não agrava o quadro de morte das células (Fig.19). O bloqueio da morte celular induzido por anti-STI1 permaneceu, mesmo quando a PI3K estava inibida, indicando que esta via não é necessária para o efeito do anticorpo.

Para testar o envolvimento de MAPKs na sinalização de anti-STI1 utilizamos dois inibidores de MEK, proteína que ativa ERK 1 e 2, U0126 e PD98059. Ambos são inibidores não-competitivos de MEK 1 e 2, sendo que U0126 apresenta maior afinidade pela enzima (Favata et al, 1998). Nas faixas de concentração utilizadas estes inibidores não interferem com a atividade de outras cinases como PKC, JNK ou Raf (Favata et al, 1998).

Verificamos que o bloqueio da ativação de ERK, no modelo de explante de retina, não protege da morte celular causada pelo axotomia das células ganglionares (Fig. 20). Anti-STI1 não tem seu efeito protetor perturbado pela inibição da via de ERK (Fig. 20), mostrando sua independência desta via. Estes inibidores atenuaram a morte celular induzida por anisomicina na NBL (dados não mostrados), o que demonstra que estavam funcionando. Sua atividade também foi confirmada em experimentos em paralelo no laboratório (ML Leal-Ferreira, comunicação pessoal).

Por fim, fomos testar a via da PKC, também descrita como responsável por mediar efeitos de Hop/STI1. Na literatura esta via está envolvida em sinalização protetora para estas células (dos Santos e de Araújo, 2000). Verificamos que o bloqueio da via da PKC, no modelo de explante de retina, não é protetor (Fig. 21), e que o efeito de anti-STI1 persistiu com a PKC inibida (Fig. 21).

Figura 18:

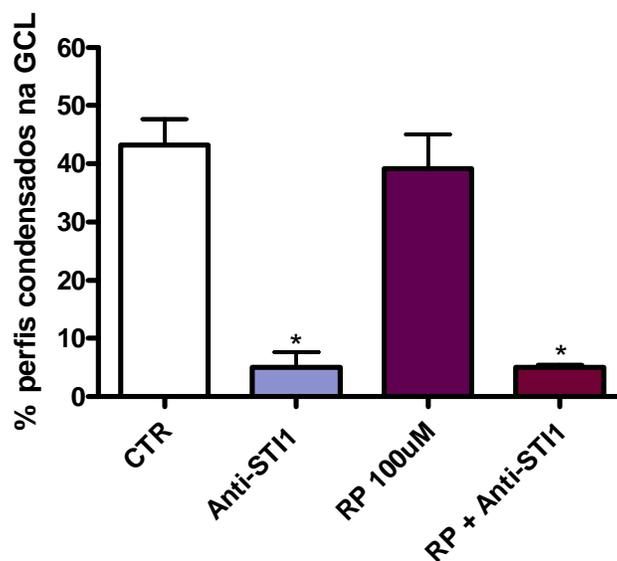


Figura 18: Anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por axotomia na GCL de forma independente de AMPc/PKA. Explantes de retina de ratos neonatos imediatamente após axotomia foram mantidos em meio BME 5% de soro sob agitação orbital por 20h na presença ou ausência de anti-STI1 0,0044mg/mL ou do inibidor de PKA Rp-cAMP 100µM. A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,001$; $n = 4$ em triplicata). O inibidor foi pré-incubado por 45 minutos.

Figura 19:

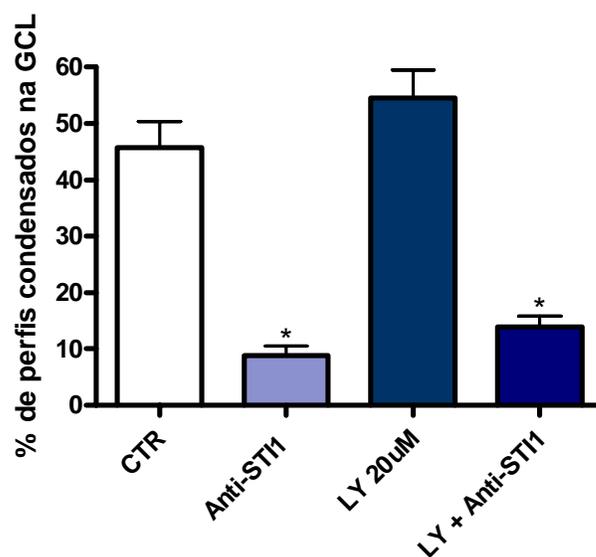


Figura 19: Anti-ST11 bloqueia a morte celular induzida por axotomia na GCL de forma independente da via de PI3K/PKB. Explantes de retina de ratos neonatos imediatamente após axotomia foram mantidos em meio BME 5% de soro sob agitação orbital por 20h na presença ou ausência de anti-ST11 0,0044mg/mL ou do inibidor de PI3K, LY294002 20µM (LY). A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,001$; $n = 5$ em triplicata). O inibidor foi pré-incubado por 30 minutos.

Figura 20:

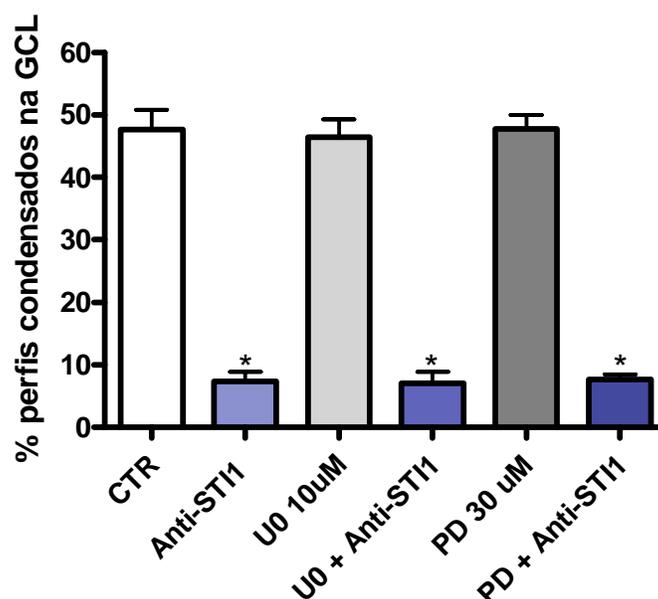


Figura 20: Anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por axotomia na GCL de forma independente da via de MAPK. Explantes de retina de ratos neonatos imediatamente após axotomia foram mantidos em meio BME 5% de soro sob agitação orbital por 20h na presença ou ausência de anti-STI1 0,0044mg/mL ou dos inibidores de MEK, U0126 10 μ M (U0) e PD98059 30 μ M (PD). A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,001$; $n = 5$ em triplicata). Os inibidores foram pré-incubados por 30 minutos.

Figura 21:

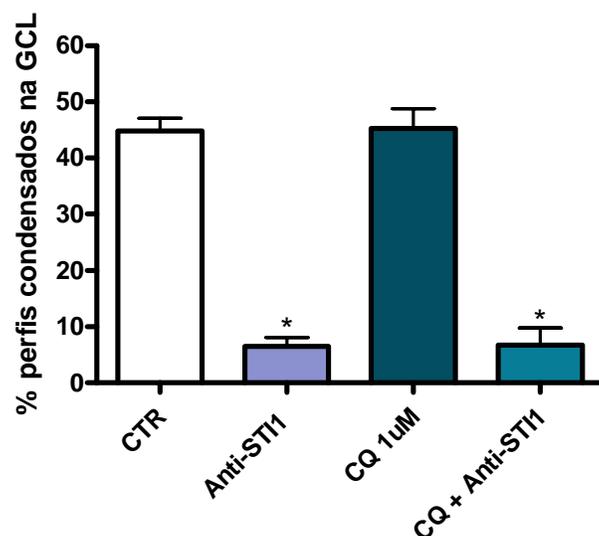


Figura 21: Anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por axotomia na GCL de forma independente da via de PKC. Explantes de retina de ratos neonatos imediatamente após axotomia foram mantidos em meio BME 5% de soro sob agitação orbital por 20h na presença ou ausência de anti-STI1 0,0044mg/mL ou do inibidor de PKC, cloreto de queleritrina 1µM (CQ). A morte celular programada foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada, seguido por comparações planejadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,001$; $n = 4$ em triplicata). O inibidor foi pré-incubado por 30 minutos.

3. Hop/STI1 e células proliferantes

3.1 Efeito de Hop/STI1 na modulação da proliferação celular na retina em desenvolvimento

Njaine e Silveira estabeleceram no laboratório um protocolo de ensaio de incorporação de timidina tritiada em explantes de retina (Njaine, B., tese de mestrado). Utilizando uma versão modificada deste protocolo, investigamos se Hop/STI1 seria capaz de modular a proliferação celular no tecido retiniano.

Fizemos uma curva dose-resposta para Hop/STI1 com 6 ou 24 horas de tratamento em retinas de rato P2 (fig. 22A e B). Verificamos que o tratamento com Hop/STI1 por 24 horas tem efeito anti-proliferativo na retina de rato. Como a concentração de 200nM já havia atingido o efeito máximo na curva, escolhemos esta concentração e o tempo de 24 horas para utilizar nos demais ensaios.

Verificamos que o tratamento de 200nM de Hop/STI1 por 24 horas reduz a incorporação de timidina tritiada em explantes de retina de ratos P2, e que este efeito é estatisticamente significativo (fig. 23). Esta redução poderia ser resultado de uma indução de morte celular nas células proliferantes, o que reduziria seu número e, por consequência, a quantidade de timidina incorporada. Para excluir a hipótese de um efeito tóxico de Hop/STI1 e reforçar a idéia de que a redução na incorporação de timidina seria reflexo de uma diminuição na proliferação, fizemos uma análise da morte celular no tecido.

A contagem de perfis condensados em cortes de explantes corados com a anilina básica vermelho neutro demonstrou baixa taxa de morte celular resultante deste protocolo (fig. 24). Não houve diferença significativa no número de células em degeneração entre a condição controle e a tratada com 200nM de Hop/STI1

(fig. 24), indicando que Hop/STI1 está modulando a proliferação celular neste modelo.

Figura 22:

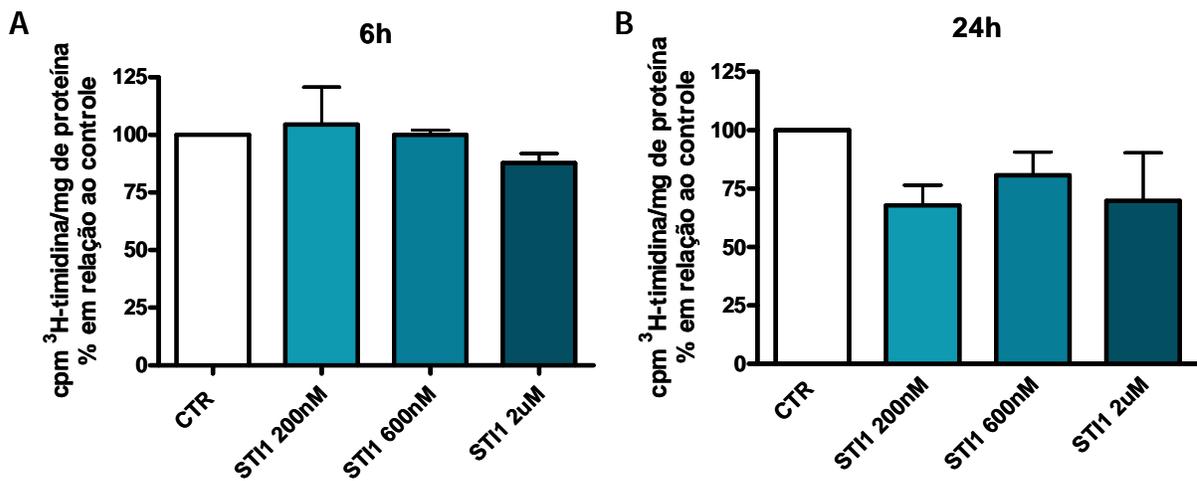


Figura 22: Curva dose resposta de Hop/STI1 em 6 e 24 horas de tratamento. Explantes de retina de ratos P2 foram mantidos em cultura em meio DMEM sem soro em placa de 24 poços por 6 (A) ou 24 horas (B) na presença ou ausência de Hop/STI1 em diferentes concentrações e submetidos a ensaio de incorporação de timidina tritiada. (n=3 em triplicata).

Figura 23:

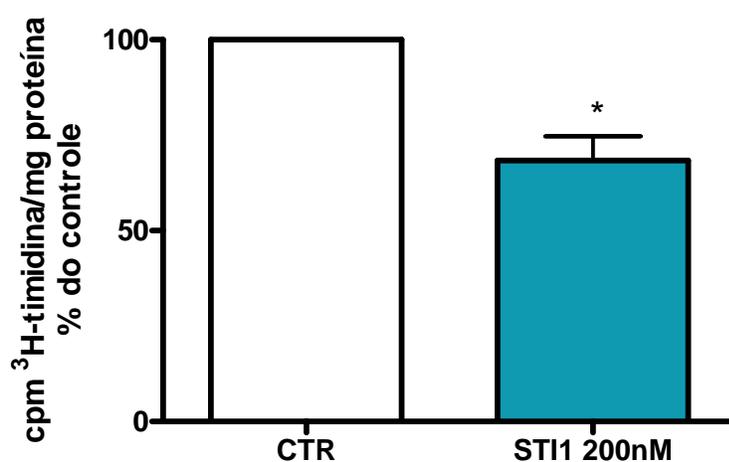


Figura 23: STI1 tem efeito anti-proliferativo na retina em desenvolvimento. Explantes de retina de ratos P2 foram mantidos em cultura em meio DMEM sem soro em placa de 24 poços por 24 horas na presença ou ausência de Hop/STI1 200nM e submetidos a ensaio de incorporação de timidina tritiada. O teste estatístico utilizado foi *Wilcoxon Signed Rank test* para uma amostra ($p < 0,05$; $n = 5$ em triplicata).

Figura 24:

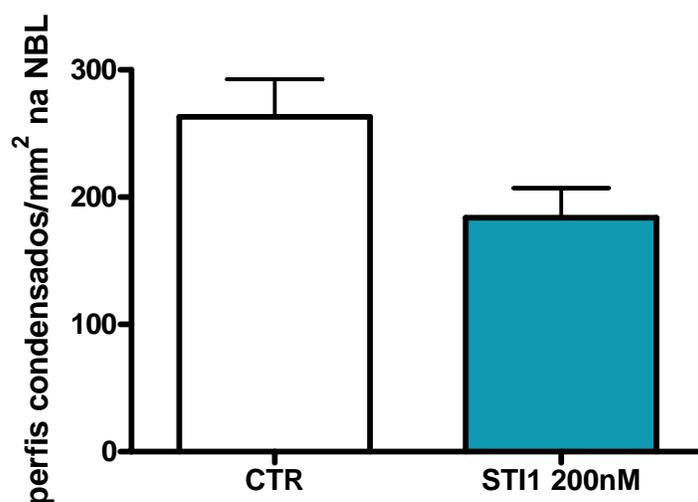


Figura 24: Hop/STI1 não induz morte celular com 24 horas de tratamento. Explantes de retina de ratos P2 foram mantidos em cultura em meio DMEM sem soro em placa de 24 poços por 24 horas na presença ou ausência de Hop/STI1 200nM. Em **A** micrografias de cortes de explantes corados com vermelho neutro. Em **B** a quantificação dos perfis condensado na NBL. O teste estatístico utilizado foi teste t de Student pareado ($p > 0,05$; $n = 5$ em triplicata).

3.2 PrP^C como possível parceira de Hop/STI1 no seu efeito anti-proliferativo na retina

Para testar o envolvimento da proteína Prion Celular no efeito anti-proliferativo de Hop/STI1 na retina utilizamos duas estratégias. A primeira foi a produção de uma versão alterada de Hop/STI1 que não possui o sítio de ligação a PrP^C, denominada Hop/STI1^{Δ230-245}. A segunda foi a utilização de camundongos C57/129 selvagens (wt) e nocautes para a proteína prion celular (PrP^{0/0}).

Verificamos que o tratamento com Hop/STI1^{Δ230-245} reduziu a incorporação de ³H-timidina de forma idêntica a Hop/STI1 (fig. 25), sendo este domínio desnecessário ao efeito anti-proliferativo da proteína. O tratamento com a proteína deletada não alterou o nível basal de morte celular no tecido (fig. 26).

O tratamento com 200nM de Hop/STI1 em retinas de camundongos C57/129 selvagens reduziu a incorporação de ³H-timidina (Fig. 27A), o que demonstra que Hop/STI1 tem efeito anti-proliferativo na retina de rato e de camundongo. Hop/STI1 reduziu a proliferação em retinas de camundongos nocaute para PrP^C (Fig. 27B), o que reforça a observação de que a proteína prion celular não está atuando como parceira de Hop/STI1 neste efeito. Todos os animais tiveram seu genótipo confirmado por PCR (dados não mostrados).

Análise de morte celular não mostrou diferença entre o grupo tratado ou não com Hop/STI1 em retinas de camundongos C57/129 wt ou PrP^{0/0} (Fig. 28A e B), confirmando o efeito anti-proliferativo de Hop/STI1 na ausência de PrP^C.

Figura 25:

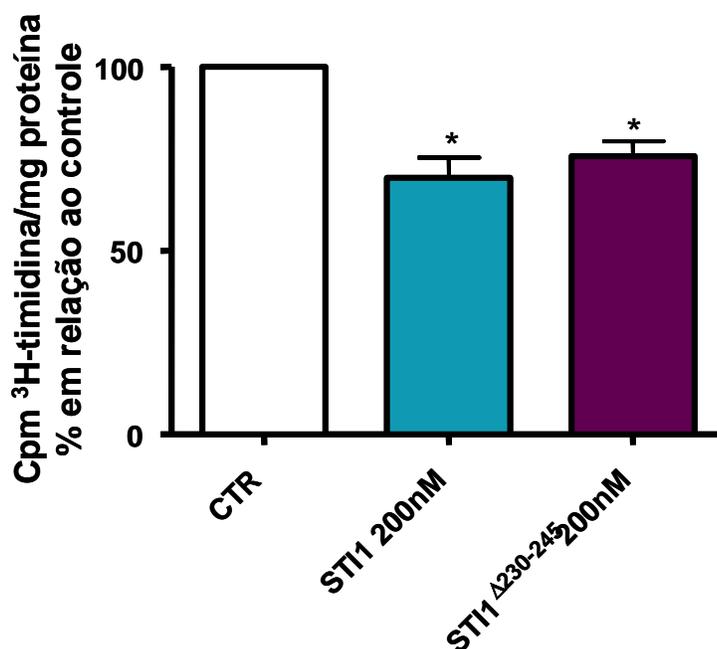


Figura 25: O domínio de ligação a PrP^C não é necessário ao efeito anti-proliferativo de Hop/STI1. Explantes de retina de ratos P2 foram mantidos em cultura em meio DMEM sem soro em placa de 24 poços por 24 horas na presença ou ausência de Hop/STI1 200nM ou Hop/STI1 deletada para o domínio de ligação a PrP^C (STI1 Δ 230-245) 200nM e submetidos a ensaio de incorporação de timidina tritiada. O teste estatístico utilizado foi teste t de Student não pareado ($p > 0,05$ entre STI1 e STI1 Δ 230-245, $n=6$ em triplicata).

Figura 26:

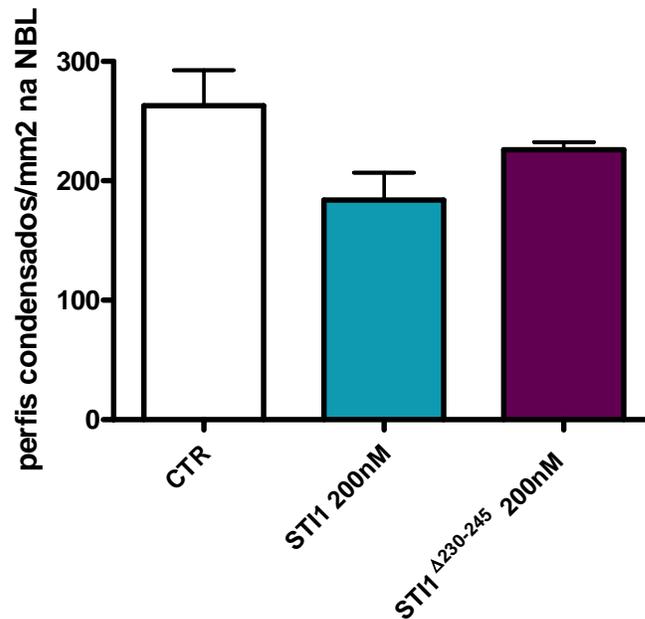


Figura 26: Tratamento com Hop/STI1 Δ 230-245 não induz morte celular com 24 horas de tratamento. Explantes de retina de ratos P2 foram mantidos em cultura em meio DMEM sem soro em placa de 24 poços por 24 horas na presença ou ausência de Hop/STI1 200nM ou Hop/STI1 deletada para o domínio de ligação a PrP^C (STI1 Δ 230-245) 200nM. A MCP foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi Análise de variância univariada ($p > 0,05$; $n = 5$ em triplicata para controle e STI1 e $n = 2$ em triplicata para STI1 Δ 230-245).

Figura 27:

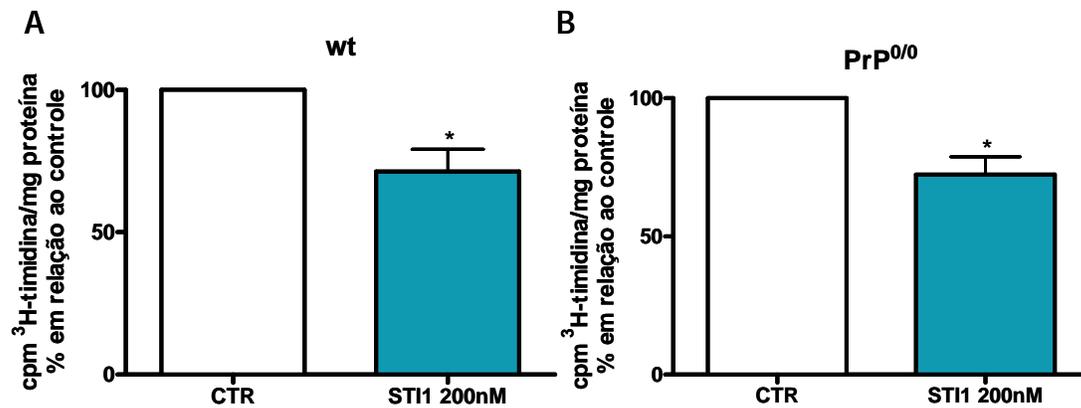


Figura 27: Hop/STI1 tem efeito anti-proliferativo independente de PrP^C. **A e B:** Explantes de retina de camundongos c57/129 selvagens (**A**) ou nocautes (**B**) para a proteína príon celular foram mantidos em cultura em meio DMEM sem soro em placa de 24 poços por 24 horas na presença ou ausência de Hop/STI1 200nM e submetidos a ensaio de incorporação de timidina tritiada. O teste estatístico utilizado foi Wilcoxon Signed Rank Test para uma amostra (n=4 em A e p<0,05, n=5 em B).

Figura 28:

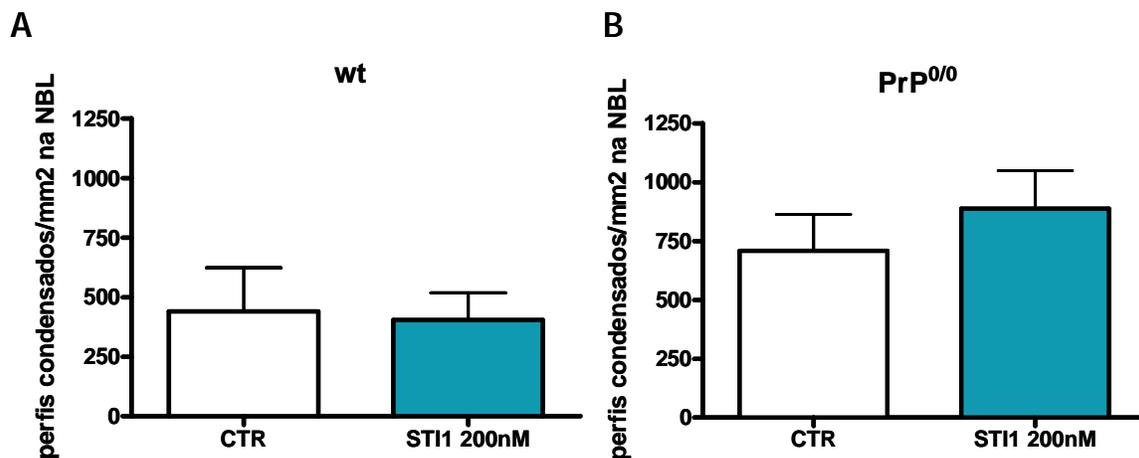


Figura 28: Tratamento por 24 horas com Hop/STI1 não induz morte celular em retinas de camundongos c57/129. Explantes de retina de camundongos c57/129 selvagens (**A**) ou nocautes (**B**) para a proteína príon celular foram mantidos em cultura em meio DMEM sem soro em placa de 24 poços por 24 horas na presença ou ausência de Hop/STI1 200nM. A MCP foi avaliada por coloração com vermelho neutro. O teste estatístico utilizado foi teste t de Student pareado (p>0,05; n=3 em triplicata para A e B).

3.3 Anticorpo anti-STI1 e proliferação na retina de camundongos

Descrevemos que Hop/STI1 é mais expressa na retina em desenvolvimento do que no tecido adulto, e que tem um papel na modulação de eventos de morte celular e de proliferação celular. Para testar se Hop/STI1 teria um efeito fisiológico na modulação da proliferação na retina em desenvolvimento utilizamos o anticorpo policlonal anti-STI1 (Bethyl). Como nosso efeito era independente de PrP^C, testamos se o anticorpo bloquearia a ação basal de Hop/STI1 em camundongos C57/129 selvagens e nocautes para PrP^C.

Verificamos que o tratamento com anti-STI1 aumentou a incorporação de ³H-timidina em camundongos wt e PrP^{0/0} (fig. 29). Este dado sugere que anti-STI1 esteja bloqueando uma sinalização endógena de Hop/STI1. Observamos um efeito maior de anti-STI1 nos camundongos nocautes do que nos selvagens. Um maior número de experimentos é necessário para verificar se esta diferença é verdadeira.

Figura 29:

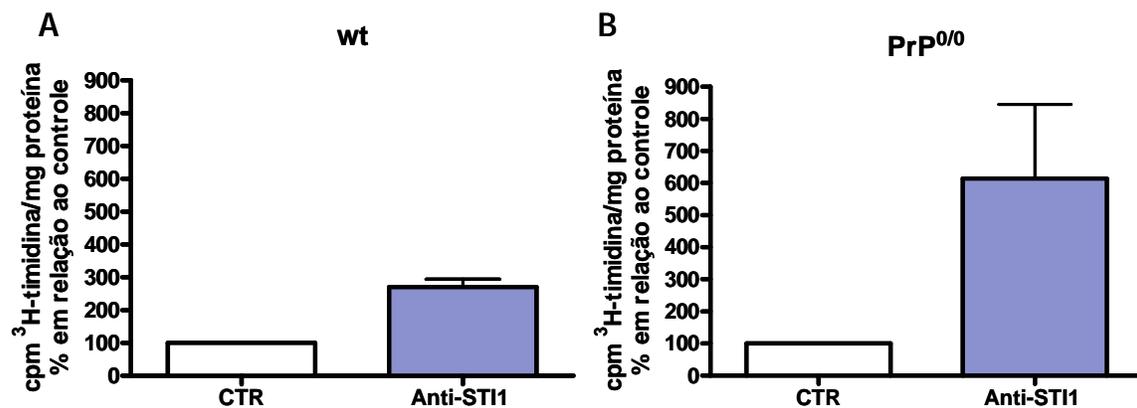


Figura 29: Anti-ST11 aumenta a proliferação celular de forma independente de PrP^C. **A e B:** Explantes de retina de camundongos c57/129 selvagens (**A**) ou nocautes (**B**) para a proteína príon celular foram mantidos em cultura em meio DMEM sem soro em placa de 24 poços por 24 horas na presença ou ausência de anti-ST11 0,022mg/mL e submetidos a ensaio de incorporação de timidina tritiada. (n=2 em A e em B).

DISCUSSÃO

Neste trabalho, verificamos que a proteína Hop/STI1 está presente na retina de ratos neonatos e é mais expressa na retina em desenvolvimento do que no tecido adulto. Verificamos que a morte celular programada nas camadas neuroblástica e de células ganglionares pode ser modulada pelo anticorpo para Hop/STI1. Este efeito neuroprotetor ocorre de forma independente da proteína prion celular (PrP^C) e das vias de AMPc/PKA, PI3K ou PKC. Verificamos também que Hop/STI1 tem efeito anti-proliferativo, enquanto o anti-STI1 aumenta a proliferação na retina em desenvolvimento. Além disso, descrevemos que os efeitos de Hop/STI1 e de anti-STI1 na proliferação celular são independentes da proteína prion celular. Portanto, Hop/STI1, expressa na retina em desenvolvimento, pode estar modulando tanto a morte celular programada quanto a proliferação que ocorre neste período.

A evidência de uma maior expressão de Hop/STI1 na retina neonatal sugere uma função para esta proteína na modulação de eventos no desenvolvimento retiniano, como proliferação e morte celular. Para investigar o papel de Hop/STI1 nestes eventos, utilizamos retinas de roedores (camundongos e ratos) neonatos no modelo de explantes de retina *in vitro*. Este modelo permite uma investigação de biologia celular mais coerente e próxima do fisiológico, visto que os explantes de retina *in vitro* mantêm sua estrutura histotípica e se desenvolvem de maneira semelhante a *in vivo*, porém submetidos a um meio controlado (Rehen et al, 1996; Linden et al, 1999).

1. Envolvimento de Hop/STI1 na modulação de morte celular programada independente de PrP^C

A literatura que aborda uma função extracelular de Hop/STI1 é muito recente. Como explicado na introdução, esta função extracelular desta co-chaperona foi identificada pela sua interação com a proteína príon celular na retina em 2002 (Chiarini et al, 2002; Zanata et al, 2002).

Rehen e colaboradores estabeleceram em 1999 que o tratamento de explantes de retina com o inibidor de síntese protéica anisomicina induz a morte seletiva de uma subpopulação retiniana, de células pós-mitóticas indiferenciadas. Estudos do nosso grupo haviam identificado que o tratamento com Hop/STI1 diminui a morte destas células e que este efeito protetor de Hop/STI1 ocorre de forma dependente da proteína príon celular (Zanata et al, 2002). Corroborando estes dados, Lopes e colaboradores em 2005 verificaram que Hop/STI1 protege neurônios hipocâmpais em cultura da morte celular induzida por estaurosporina e que este efeito protetor é dependente de PrP^C (Lopes et al, 2005). Além disso, Flávia Lima descreveu que Hop/STI1 protege culturas de astrócitos da morte celular induzida por estaurosporina (Lima F, comunicação pessoal).

Em trabalho de 2005, Sakudo e colaboradores vêm em linhagem neuronal nula para PrP^C que o tratamento com o peptídeo 230-245 de STI1 ou o 113-128 de PrP^C reduz a atividade superóxido dismutase da célula e induz morte celular de forma dependente da proteína príon celular. Os dados deste trabalho são de difícil interpretação, sendo o efeito dos peptídeos na atividade superóxido dismutase muito pequeno e a metodologia de análise de viabilidade celular utilizada no trabalho pouco clara. Eles mostram, no entanto, que PrP^C imunoprecipita com

STI1 nesta linhagem celular e que a privação de soro gera um aumento na fração citoplasmática de STI1. Em função destas colocações e do fato do efeito da proteína Hop/STI1 não ter sido testado neste sistema, temos dificuldade de encaixar os dados deste trabalho no quadro geral do que sabemos sobre as funções extracelulares de Hop/STI1.

A partir dos trabalhos de Chiarini e de Zanata e colaboradores de 2002, seguimos estudando a função de Hop/STI1 na modulação da morte celular induzida por anisomicina na NBL através de um anticorpo policlonal contra esta proteína. Verificamos que o tratamento com anti-STI1 teve efeito protetor nesta subpopulação retiniana, e que este efeito era independente de PrP^C.

Estudamos também o papel de Hop/STI1 na modulação da morte celular programada em outra população retiniana: de células ganglionares. O corte do nervo óptico na preparação dos explantes significa uma axotomia para as células ganglionares, que morrem por falta de suporte trófico. Este modelo de indução de morte das células ganglionares se aproxima muito de um modelo de morte celular natural que ocorre no desenvolvimento, pois na retina de roedor P1 esta população celular está morrendo, por perda de uma sinalização trófica (Linden e Reese, 2006).

Vimos que o tratamento com Hop/STI1 não bloqueia a morte das células ganglionares induzida por axotomia. Tratamento com anti-STI1, no entanto, tem efeito protetor sobre a morte destas células. Esta é a primeira indicação de uma modulação por Hop/STI1 de um evento celular de células ganglionares da retina. Verificamos que este efeito neuroprotetor de anti-STI1 é independente de PrP^C.

Nossos dados de morte celular de células pós-mitóticas indiferenciadas e de células ganglionares constituem o único relato de uma modulação da morte celular programada envolvendo Hop/STI1 que não é dependente da proteína príon celular.

2. Sinalização e controle da morte celular programada na NBL por Hop/STI1

Nosso grupo havia descrito que a interação entre PrR e PrP^C ativa as vias de AMPc/PKA e ERK na camada neuroblástica da retina (Chiarini et al, 2002). Vimos que anti-STI1 tem efeito protetor sobre as mesmas células da retina. No entanto, o efeito protetor de Anti-STI1 ocorre de forma independente de PrP^C e não envolve a via de AMPc/PKA.

O tratamento com o inibidor de PKA, Rp-cAMPS, na concentração que inibe o efeito protetor de PrR (100 μ M), não alterou a neuroproteção induzida por anti-STI1. Em experimento em paralelo foi visto que o Rp-cAMPS bloqueou o efeito protetor de IL-4 em explantes de rato P6 (Juliana Adão, comunicação pessoal), indicando que o inibidor estava funcionando.

O AMPc também exerce efeitos independentes de PKA. Ele se liga e modula canais de membrana acoplados a nucleotídeos cíclicos, canais catiônicos que, por modular o fluxo de Ca²⁺, Na⁺ e K⁺, influencia no equilíbrio iônico e sinalizações de morte celular (revisado por Kopperud et al, 2003). AMPc modula diretamente um *GTP-Exchange factor* (GEF) para a GTPase Rap1, a proteína Epac (de Rooij et al, 1998). Evidências apontam para efeitos desta modulação em vias de sobrevivência e morte. Rap1 aumenta a fosforilação de MAPK em neurônios (Dugan et al, 1999) e a superexpressão de Epac em HEK293 induz ativação de PKB mediada por PI3K dependente de Rap1 (Mei et al, 2002).

Embora o AMPc possa exercer efeitos independentes de PKA, não verificamos aumento nos níveis intracelulares de AMPc na retina após o tratamento com anti-STI1. Realizamos dosagens dos níveis intracelulares de AMPc pelo método de Gilman (Gilman, 1970) modificado por De Mello. Este não é o mesmo método utilizado nas dosagens feitas com PrR, que utilizaram um kit não radioativo não mais disponível no mercado. O método utilizado por nós, no entanto, é muito sensível e foi utilizado em diversos trabalhos do grupo do professor Fernando de Mello e pelo nosso (Kubrusly et al, 2005, Silveira et al, 2002). Nós ainda realizamos um experimento com o inibidor de adenilil ciclase SQ22536 (Sigma), que também não bloqueou o efeito de anti-STI1 (dados não mostrados), reforçando a idéia que o efeito de anti-STI1 na NBL não depende de AMPc.

A via de PI3K/PKB é uma das vias protetoras no sistema nervoso mais bem descritas na literatura, por ser a principal via ativada por neurotrofinas. Na retina, Campos e colaboradores descreveram que esta via - e particularmente a fosforilação de PKB - está envolvida na proteção de células da camada neuroblástica da morte celular programada (Campos et al, 2003). Nós utilizamos o inibidor de PI3K, LY294002, para testar o envolvimento da via de PI3K na sinalização de anti-STI1. LY294002 é um inibidor competitivo do sítio de ligação a ATP da PI3K (Walker et al, 2000) e na concentração utilizada não inibe outras cinases como PKA, PKC ou PI4K (Vlahos et al, 1994).

No tempo de 20 horas, LY a 20 μ M tem bloqueio considerável de fosforilação de PKB mas não induz morte celular na camada neuroblástica (CBL Campos, tese de doutorado; fig. 12).

O tratamento com LY294002 potencializa a morte celular induzida por anisomicina na camada neuroblástica da retina. Este dado confirma que o inibidor estava funcionando quando os experimentos foram realizados. Anti-STI1 reduz a morte celular induzida por anisomicina mesmo na presença do inibidor de PI3K. Não podemos afirmar ao certo quais células anti-STI1 está protegendo, se as que estavam morrendo pelo tratamento com anisomicina ou as células que, na presença de anisomicina, sucumbem pela inibição de PI3K. De qualquer forma, observamos que anti-STI1 é capaz de promover proteção na presença do inibidor, o que indica que a via de PI3K não é necessária à neuroproteção induzida por anti-STI1.

Em trabalho feito em paralelo ao nosso, Camila Arantes e Flávia Lima descreveram um efeito de Hop/STI1 dependente de PKC em cultura de astrócitos. A via de PKC está envolvida na sinalização de morte celular, mas seu papel na morte celular induzida por anisomicina na camada neuroblástica não é conhecido. Utilizamos o inibidor de PKC cloreto de queleritina para testar o envolvimento da via de PKC na sinalização de anti-STI1. Em experimento feito com o mesmo lote de cloreto de queleritina, esta concentração de CQ bloqueou a morte celular induzida por ácido ocadaico em retinas P6 (Juliana Adão, comunicação pessoal). O tratamento com 1 μ M de CQ não alterou o quadro de morte induzido pelo tratamento com anisomicina. Ele também não interferiu no bloqueio da morte celular causado por anti-STI1.

Verificamos que anti-STI1 tem efeito protetor para as células pós-mitóticas indiferenciadas da retina, e que este feito não envolve as vias de AMPc/PKA, PI3K ou PKC. Visto que testamos as vias já descritas como mediadoras da sinalização

de Hop/STI1, nossos dados mostram que anti-STI1 está protegendo as células da camada neuroblástica por uma via ainda não descrita na literatura.

A via de ERK é pró-apoptótica nas células pós-mitóticas indiferenciadas da retina. Anti-STI1 poderia estar exercendo neuroproteção pelo bloqueio desta via na camada neuroblástica. Pretendemos testar esta possibilidade fazendo *western blots* para as formas fosforiladas de ERK1 e 2 na ausência ou presença de anti-STI1.

Campos e colaboradores demonstraram que o bloqueio da MAPK p38 é protetor contra a morte celular induzida por anisomicina na camada neuroblástica (Campos et al, 2006). Pretendemos testar se anti-STI1 estaria induzindo um bloqueio indireto de p38 para proteger esta população celular.

3. Sinalização e Proteção de células ganglionares por anti-STI1

Diferentemente das células pós-mitóticas indiferenciadas da NBL, o tratamento com Hop/STI1 não bloqueia a morte das células ganglionares. A população de células ganglionares, além de estar em estágio de diferenciação distinto das pós-mitóticas indiferenciadas, e possuir outros limiares de sensibilidade à morte celular, ainda está em um microambiente diverso do da NBL. Um exemplo desta diferença é a presença de laminina.

PrP^C se liga a laminina (Graner et al, 2000). Laminina está presente na retina, particularmente na sua membrana limitante interna, em contato com a camada de células ganglionares (Linden et al, 1999). Desconhecemos se a interação de PrP^C e laminina poderia interferir na interação de PrP^C com Hop/STI1, impedindo-a ou modificando a sinalização de Hop/STI1 com outros ligantes pelo 'seqüestro' de PrP^C.

Na retina, a ligação STI1-PrP^C induz ativação das vias de PKA e ERK. Mesmo que PrP^C esteja conseguindo se ligar a Hop/STI1 na GCL e que esta interação esteja induzindo as mesmas cascatas, não necessariamente isto significaria proteção para as células ganglionares.

Em modelo de culturas purificadas de células ganglionares, Mayer-Franke e colaboradores demonstraram um aumento na sobrevivência induzido pela combinação de fatores tróficos (BDNF, CTNF, IGF1) e aumento dos níveis intracelulares de AMPc por tratamento com forskolina (Mayer-Franke et al, 1995). No modelo de explantes de retina, entretanto, o aumento dos níveis de AMPc não é capaz de reverter o quadro de morte induzido por axotomia (Rehen et al, 1996).

A via de ERK neste modelo também não é protetora, uma vez que o tratamento com os inibidores U0126 e PD98059 sozinhos não agravou o quadro de morte. Sendo assim, é possível que a interação STI1-PrP^C esteja ocorrendo e transduzindo sinal, mas que não vejamos um efeito porque esta sinalização não é protetora para estas células.

O tratamento com anti-STI1 bloqueou a morte induzida por axotomia das células ganglionares. Fizemos análise de morte celular por dois métodos: análise de condensação da cromatina (pela coloração com a anilina básica vermelho neutro ou com o intercalante de DNA *sytox green*) e ensaio de fragmentação de DNA *in situ* (método de TUNEL), indicando que anti-STI1 bloqueia a MCP.

Consistente com as descrições da literatura de que a via de AMPc/PKA não é protetora para as células ganglionares, a inibição de PKA com Rp-cAMPS não alterou o efeito neuroprotetor de anti-STI1 nestas células.

A via de ERK1/2 favorece a morte celular induzida por anisomicina na NBL (Chiarini et al, 2002). Nas células ganglionares, muito estudos descrevem a via de ERK como protetora. Em culturas purificadas de células ganglionares, o tratamento com o inibidor PD98059 reduz o efeito de sobrevivência induzido por BDNF e forskolina (Meyer-Franke et al, 1998). Em ratos adultos, experimentos *in vivo* por axotomia por lesão do nervo óptico demonstraram que BDNF tem efeito protetor mediado pela via de MAPK (Nakazawa et al, 2002). A proteção destas células conferida por tratamento com estrogênio também é dependente de ERK (Nakazawa et al, 2006).

Em estudo *in vivo* com camundongos transgênicos adultos foi verificado que o aumento constitutivo da expressão de VEGF (fator de crescimento vasoendotelial) gera uma leve proteção das células ganglionares da morte por axotomia, dependente de ERK e PI3K - já que PD98059 e LY294002 a bloqueiam (Kilic et al, 2006). Em modelo de glaucoma (por dano ocular hipertensivo), a transfecção por AAV de células ganglionares com gene para uma forma constitutivamente ativa de MEK1 aumentou a sobrevivência destas células (Zhou et al, 2005). No nosso modelo de explantes de retina, entretanto, a inibição da via de ERK1/2 com os inibidores U0126 ou PD98059 não aumentou a morte destas células (Fig.20). Anti-STI1 bloqueou a morte induzida por axotomia das células ganglionares mesmo com a via da ERK inibida.

Havia sido verificada a dependência da via de PKC para o efeito anti-proliferativo de Hop/STI1 em culturas de astrócitos (Arantes e Lima, em preparação). Na retina, a ativação de PKC protege as células ganglionares da morte celular em culturas de retina de rato P1 (dos Santos e de Araújo, 2000). Esta proteção é bloqueada pelo inibidor de PKC cloreto de queleritrina (dos

Santos e de Araújo, 2000). O efeito protetor de anti-STI1 nas células ganglionares, entretanto, não está ocorrendo por ativação de PKC, uma vez que ele ocorre na presença de cloreto de queleritrina.

Em experimentos de lesão do nervo óptico de ratos adultos, foi verificado que o bloqueio da via de PI3K pelo inibidor LY294002 reduzia parcialmente o efeito protetor de BDNF sobre as células ganglionares, demonstrando que esta via é protetora nestas células (Nakazawa et al, 2002). O estudo *in vivo* de Kilic e colaboradores também havia descrito uma proteção das células ganglionares dependente de PI3K (Kilic et al, 2006).

Cheung e colaboradores mostraram, em hamsters adultos, que no período de tempo entre a lesão no nervo óptico e a morte das células ganglionares ocorria uma ativação de Akt, e que a diminuição desta ativação tinha correlação com a ativação de caspases 3 e 9 e com a morte destas células. De fato, a inibição da via de PI3K por injeção com *Wortmanin* ou LY294002 antecipou a ativação de caspases 3 e 9 e acelerou a morte das células ganglionares (Cheung et al, 2004).

No nosso modelo de explantes de retina de ratos P1 o tratamento com LY294002 não agrava o quadro de morte induzido por axotomia. Vimos que o efeito protetor de anti-STI1 na GCL não depende da via de PI3K.

O tratamento de explantes de retina com inibidores de caspase bloqueia a morte das células ganglionares induzida por axotomia (LB Chiarini, comunicação pessoal). Demonstramos que anti-STI1 reduziu o número de células com fragmentação de DNA, de modo que a sinalização por anti-STI1 deve envolver o recrutamento de caspases.

Trabalhos do laboratório abordaram alguns outros componentes da sinalização de morte na GCL. Petrs-Silva e colaboradores demonstraram uma correlação entre a morte de células ganglionares e a exclusão nuclear do fator de transcrição Max (Petrs-Silva et al, 2004). A indução de expressão de Max (por injeção de adenovírus associado) resgatou as células da morte induzida por axotomia (Petrs-Silva et al, 2005).

Correlação semelhante foi verificada com o fator redox/endonuclease REF-1, cuja degradação precede os indícios de apoptose em células ganglionares axotomizadas (Chiarini et al, 2000) e com o fator de transcrição ATF-2 (Vinícius Ribas, monografia). ATF-2 é regulado pela via de JNK. O bloqueio de ativação de JNK protege as células ganglionares da morte celular por axotomia no nosso modelo. Pretendemos testar se anti-STI1 estaria bloqueando a morte celular na GCL pela inibição de JNK. Para isso, analisaremos se o tratamento com anti-STI1 altera a fosforilação de ATF-2, indicador da atividade de JNK. Também pretendemos acompanhar a presença e localização de REF-1, ATF-2 e Max durante este bloqueio da degeneração das células ganglionares.

4. Hop/STI1 e modulação da proliferação na retina

Investigamos o papel de Hop/STI1 na modulação da proliferação celular na retina em desenvolvimento. Vimos que Hop/STI1 tem efeito anti-proliferativo na retina de ratos P2. Nesta idade a retina ainda possui altos níveis de proliferação (Alexiades e Cepko, 1996).

Tratamento de 24h com Hop/STI1 não induz morte celular no tecido e reduz a proliferação de forma independente da proteína príon celular. Anti-STI1, por sua

vez, aumenta a proliferação na retina de camundongos P1, também de forma independente de PrP^C, sugerindo que o anticorpo bloqueie uma função anti-proliferativa da Hop/STI1 endógena.

Martins e colaboradores verificaram que o tratamento com glutamato tem efeito anti-proliferativo na retina de rato neonato via receptor AMPA/kainato (Martins et al, 2006). Neste trabalho, os autores verificaram que o glutamato induzia uma saída precoce do ciclo celular dos progenitores retinianos. Pelos nossos dados não podemos concluir que Hop/STI1 esteja fazendo o mesmo. Para esclarecer isso, pretendemos fazer um experimento usando BrdU e timidina tritiada com tempos diferentes de incubação para ver se Hop/STI1 induz uma redução no número de células duplamente marcadas, indicativo de células que entraram novamente no ciclo celular.

O arresto ou uma saída do ciclo celular podem ser obtidos por muitas vias. O controle da saída do ciclo é regulado principalmente por complexos ciclina-CDKs e seus inibidores, CKIs. Alterações nos níveis de expressão de CDKs e de CKIs são mecanismos freqüentes de controle do ciclo. Martins e colaboradores detectaram uma redução na fosforilação de cdk2 induzida por glutamato, propondo um mecanismo pelo qual este neurotransmissor estaria induzindo a saída precoce do ciclo pelos precursores retinianos (Martins et al, 2006).

Na retina, a CKI p57^{kip2} tem importante papel no controle da proliferação celular. Uma parcela dos progenitores no período embrionário expressa p57^{kip2} quando da saída do ciclo, no final de G1 ou em G0. Em idade pós-natal algumas células voltam a apresentar imunorreatividade para p57^{kip2}, e esta marcação corresponde a células que irão se diferenciar em uma subpopulação de células amácrinas, indicando um papel de p57^{kip2} no controle de proliferação e

diferenciação da célula, em estágios diferentes do desenvolvimento (Dyer e Cepko, 2000).

A CKI p27^{kip1} também é um importante regulador da saída do ciclo celular na retina. Dyer e Cepko verificaram que esta CKI tem sua expressão aumentada no final de G2 ou começo de G1 em grande parte das células que estão saindo do ciclo (Dyer e Cepko, 2001b). As células que expressam p57^{kip2} não são as mesmas que expressam p27^{kip1}, de modo que a escolha entre uma CKI ou outra pode influenciar no destino final da célula ou já representar um comprometimento com um caminho de diferenciação específico (Dyer e Cepko, 2000; Dyer e Cepko 2001b).

Dyer e Cepko sugerem que a saída do ciclo celular na retina envolveria duas etapas: uma diminuição da expressão da principal ciclina D da retina durante o desenvolvimento, ciclina D1, e o aumento da expressão de uma CKI, p27^{kip1} ou p57^{kip2} (Dyer e Cepko, 2001a).

Estabelecendo a metodologia que utilizamos neste trabalho, Brian Njaine descreveu um efeito anti-proliferativo do neuropeptídeo ativador de adenilil ciclase da pituitária (PACAP) na retina em desenvolvimento (B. Njaine, dissertação de mestrado). Resultados preliminares indicam uma redução de ciclina D1 e aumento nos níveis de p27 induzidos pelo peptídeo (B. Njaine, comunicação pessoal). Pretendemos investigar o mecanismo pelo qual Hop/STI1 está exercendo seu efeito anti-proliferativo na retina analisando os níveis de ciclina D1, p27 e p57 por *western blot*.

Flávia Lima e Camila Arantes descreveram um efeito anti-proliferativo de Hop/STI1 dependente de PKC em culturas de astrócitos (Arantes et al, em preparação). A ativação de PKC tem efeito anti-proliferativo em culturas de retina

de rato neonato (dos Santos et al, 2003). PKC regula o ciclo celular em diversos modelos e por interação com diversos componentes do ciclo, incluindo indução de aumento de expressão de p27^{kip1} e redução dos níveis de ciclina D1 e de atividade de cdk2 (Black, 2000). Iremos testar se esta via de sinalização seria responsável por mediar o efeito anti-proliferativo de Hop/STI1 na retina em desenvolvimento.

O fato de Hop/STI1 ter efeito na diferenciação celular em culturas de hipocampo (Lopes et al, 2005) levanta a hipótese desta proteína também estar atuando induzindo a diferenciação celular na retina em desenvolvimento. Na idade em que fizemos os experimentos, a gênese de fotorreceptores seria a candidata para sofrer esta modulação. Pretendemos verificar se Hop/STI1 estaria modulando a diferenciação de fotorreceptores alterando a proporção de tipos celulares na retina.

5. Efeito de Hop/STI1 na proliferação na retina em desenvolvimento é independente de PrP^C

Em artigo submetido em 2006, Erlich e colaboradores verificaram que o tratamento com Hop/STI1 em linhagem de glioma A172 aumentava a proliferação celular e que este efeito era mediado pelas vias de MAPK e PI3K. Este aumento na proliferação não foi mimetizado pelo peptídeo 230-245, porém o tratamento com Hop/STI1^{Δ230-245} também não foi capaz de induzir aumento na incorporação de ³H-timidina.

Este dado pode ser interpretado de duas formas. Na primeira, PrP^C estaria envolvida no sistema de sinalização - uma vez que uma Hop/STI1 que não consegue se ligar a PrP^C é incapaz de transduzir o sinal - mas não seria a única

proteína necessária à transdução deste sinal, já que a ligação das duas proteínas feita pelo peptídeo é ineficaz. Em uma segunda interpretação se conclui que não é a PrP^C que é necessária ao sistema, mas sim uma Hop/STI1 com estrutura tridimensional intacta, uma vez que uma deleção como a da seqüência 230-245 pode alterar a conformação da proteína de modo a perturbar sua ligação com quaisquer outros parceiros. Deste modo, o envolvimento da proteína príon celular neste efeito ainda não está esclarecido.

Em trabalho feito em paralelo ao nosso, Flávia Lima e Camila Arantes descreveram um efeito anti-proliferativo do tratamento de Hop/STI1 em culturas de astrócitos (F. Lima e C. Arantes, comunicação pessoal). Este efeito era dependente de PKC e persistia em culturas de astrócitos nocautes para PrP^C. O trabalho de Lima e Arantes reforça, em conjunto com o nosso, a tese que Hop/STI1 estaria modulando a proliferação celular nestes modelos de forma independente de PrP^C, através de um outro parceiro.

Outra informação importante é que a faixa de concentração de Hop/STI1 na modulação de proliferação celular é nanomolar nos três modelos, de glioma, cultura de astrócitos e retina. A via de PKC, no entanto, não foi testada no trabalho de Erlich.

6. Vias de Sinalização e Hop/STI1

O programa da morte das células pós-mitóticas indiferenciadas e das células ganglionares é distinto em aspectos fundamentais, como dependência de síntese protéica e envolvimento da via de AMPc/PKA. Nossos resultados sugerem que uma mesma proteína esteja regulando a morte celular destas duas populações. É a primeira vez no laboratório que encontramos uma ferramenta que

module estes dois tipos de morte celular. Nossos dados ainda indicam que Hop/STI1 modula a proliferação de outra subpopulação retiniana, mostrando que uma mesma proteína está envolvida na regulação de eventos em três populações celulares distintas.

A menos que Hop/STI1 esteja modulando uma mesma cascata de sinalização – ainda não descrita - que seja protetora para ambas populações celulares e que promova um efeito na proliferação celular, nossa melhor hipótese é que sinalizações diferentes estejam sendo mediadas por ligantes distintos de Hop/STI1. Desconhecemos os possíveis ‘receptores’ de Hop/STI1. Desta forma, ligações distintas poderiam ser ocasionadas pela diferença de microambiente ao qual as populações celulares estão expostas, que camuflaria ou disponibilizaria conjuntos específicos de ligantes. Sob outro ponto de vista, é possível que a maquinaria celular é que esteja variando e não os ligantes disponíveis. Outra alternativa é que o próprio estágio de desenvolvimento em que as células se encontram determine o tipo de ligante que será expresso, e portanto que vias de transdução distintas sejam ativadas pela mesma Hop/STI1.

7. Outros parceiros de Hop/STI1

Com relatos de efeitos de Hop/STI1 independentes de PrP^C emergindo, buscamos na literatura possíveis ‘receptores’ para esta proteína. As principais proteínas descritas como parceiras de Hop/STI1 na literatura são as chaperonas Hsp90 e Hsp70. Existem alguns relatos de função de chaperonas na modulação da morte celular na retina, principalmente quanto às células ganglionares.

A indução de expressão de Hsp27 por injeção de simvastatina em olhos de rato submetidos a lesão do nervo óptico aumenta a sobrevivência de células ganglionares (Kretz et al, 2006). Pacientes com glaucoma apresentam uma elevação na expressão de Hsp60 e Hsp27, e o tratamento de retinas de rato com anticorpos contra Hsp27 ou outras Hsps (α A ou α B-Cristalline) induz apoptose das células ganglionares (Tezel et al, 2004 para revisão). Mesmo um pouco contraditórios, estes trabalhos mostram envolvimento de chaperonas intracelulares na modulação da morte na GCL. Estes trabalhos, apesar de relevantes, não oferecem uma explicação para o fenômeno que observamos, uma vez que a Hsp/STI1 que estamos colocando no sistema está no espaço extracelular.

Existem descrições de funções extracelulares para chaperonas. Inicialmente se achava que a presença de chaperonas no espaço extracelular era resultado de necrose de células nas imediações. Posteriormente, no entanto, foi verificada presença destas chaperonas em situações em que não havia doença. Estresse por choque térmico induz aumento da secreção de Hsp72 em culturas de célula, e estresse psicológico e exercício físico aumentam os níveis fisiológicos de Hsp72 circulante (Lancaster e Febraio, 2005). Evidências apontam para que essa secreção se dê por meio de exossomos (Lancaster e Febraio, 2005).

O tratamento com Hsp70 extracelular induz morte celular na linhagem neuronal PC12 por um mecanismo que envolve fosfatidilserina (Arispe et al, 2004). Curiosamente, co-tratamento de Hsp70 com ADP potencializa a toxicidade desta chaperona, enquanto co-tratamento com ATP a atenua. A troca de ATP por ADP modula a afinidade com que Hsp70 se liga a Hsp (Bukau e Horwich, 1998), sendo que Hsp70-ADP tem maior afinidade. Este dado sugere que a diferença nos

estados ATP ou ADP ligado seja um *switch* de parceiros de Hsp70 extracelular no controle de uma sinalização de morte, que pode até envolver Hop/STI1.

Hsp70 tem efeito imunoestimulatório sobre células NK através de interação com o receptor CD94. Vários tratamentos anti-tumorais (como irradiação gama e inibidores de COX1 e 2) induzem um aumento na presença de Hsp70 na superfície de células cancerosas, aumentando a sensibilidade dos tumores à lise por células NK (Radons e Multhoff, 2005).

Guzhova e colaboradores verificaram que a diferenciação induzida por tratamento com PMA em linhagem de neuroblastoma LA -N-5 reduz a 10% a expressão de Hsp70, e as células diferenciadas são mais sensíveis à morte celular por estresse de choque térmico (Guzhova et al, 2001). Esta consiste na primeira descrição de regulação de expressão de Hsp70 com a diferenciação. Mesmo se tratando de uma linhagem, é interessante reparar o paralelo entre regulação de expressão de uma chaperona e mudança de sensibilidade à morte. Seria interessante testarmos se há variação de Hsp90 e 70 na retina no desenvolvimento em relação ao tecido adulto.

Neste trabalho, os autores conferem resistência a estresse por choque térmico e à morte celular induzida por estaurosporina à linhagem pela adição de Hsp70 exógena (Guzhova et al, 2001). Cerca de 40% da Hsp70 adicionada é endocitada, e os autores acreditam que a mudança na resistência a estresse seja produto da incorporação desta Hsp70 exógena ao *pool* citoplasmático desta chaperona.

No nosso laboratório, Tatiana Americo verificou o envolvimento de endocitose na sinalização de ERK mediada por Hop/STI1 em linhagem A172. Mesmo supondo que nossa sinalização seja modulada por endocitose, isso não

elucida o parceiro nem a via pela qual Hop/STI1 está agindo para promover os efeitos na morte ou na proliferação celular descritos por nós.

Células vasculares de músculo liso secretam Hsp90 α , e o tratamento com Hsp90 α exógena nestas células induz ativação de ERK (Liao et al, 2000), demonstrando que não só esta proteína está presente no espaço extracelular como é capaz de transduzir sinal.

Hsp90 extracelular regula a invasividade de tumores, o processamento de plasminogênio e processo de coagulação (Eustace e Jay, 2004), faz parte de um complexo receptor para resposta a LPS (Triantafilou e Triantafilou, 2002) e tem um importante papel na apresentação de antígenos, particularmente em relação à imunogenicidade de tumores (Basu e Srivastava, 2000).

Binder e colaboradores identificaram em 2000 um receptor para Hsp90 extracelular, CD91. Este receptor está presente na membrana de células apresentadoras de antígenos, onde se liga a hsp90 (e ao peptídeo que ela apresenta), é endocitado e a célula reapresenta o antígeno ligado a Hsp90 através de MHC classe I levando à ativação de linfócitos T CD8 (Binder et al, 2000). Supomos que a sinalização mediada por Hop/STI1 envolva um receptor de membrana, que pode ou não se ligar a Hsp90, proteína pela qual Hop/STI1 tem alta afinidade.

Anticorpos contra Hsps circulantes são encontrados em situações fisiológicas normais em humanos. Estes anticorpos têm seu título aumentado em situações de doenças autoimunes, cardiovasculares e infecções, estresses ambientais, perda de audição e rejeição de órgãos transplantados (Wu e Tanguay, 2006). O significado da presença destes anticorpos - se estão contribuindo ou

agravando as doenças nas quais estão presentes, se funcionam como indicadores para diagnóstico - ainda permanece obscuro. Estas observações reforçam a idéia de que as funções extracelulares de chaperonas ainda são muito mal compreendidas, e que elas podem fazer parte de sistemas muito mais complexos de regulação da resposta imune e do controle de eventos celulares.

Já foi detectada a presença de Hop/STI1 em meio condicionado de glioma (Erich, tese de doutorado), de astrócitos (Martins, VR, dados não publicados) e de linhagem de fibrosarcoma (Eustace e Jay, 2004). Assim como para Hsp90 e Hsp70, Hop não possui sinal para ser secretada, e a via e a regulação desta secreção permanecem desconhecidas. Investigar a presença de Hop/STI1 em meio condicionado de retina é um passo futuro essencial para este trabalho.

Um grande esforço está sendo empreendido para desvendar as funções extracelulares de Hop/STI1, que vão do desenvolvimento de um nocaute condicional para Hop/STI1 (que deve ficar pronto nos próximos anos) a uma vasta busca por parceiros desta proteína por apresentação por bacteriófagos.

A partir desta busca, que está sendo conduzida por Magdesian e colaboradores, foram produzidos peptídeos que estão sendo testados em efeitos já descritos de Hop/STI1 como ferramenta para identificar o parceiro em questão. Apesar destes resultados serem preliminares, oferecem uma perspectiva promissora para a identificação destes parceiros.

8. Um anticorpo como ferramenta

A utilização do anticorpo anti-STI1 como ferramenta de estudo oferece algumas limitações inerentes. Em primeiro lugar, é preciso saber se anti-STI1 está promovendo seus efeitos pela ligação à proteína Hop/STI1. Nisso surgem duas

perguntas: se este efeito é específico da imunoglobulina que reconhece Hop/STI1, e não fruto de uma contaminação com outra IgG; e se esta imunoglobulina contra STI1 realmente se liga a Hop/STI1, e não a outra proteína qualquer.

Para responder à primeira pergunta foi feito o experimento com IgG purificada de soro não-imune. A falta de efeito de bloqueio de morte celular por este tratamento sugere que os efeitos de anti-STI1 sejam específicos. Durante a redação desta dissertação pudemos ter acesso a um lote com o soro pré-imune do coelho utilizado para fazer este anti-STI1. Uma vez que este soro contém todas as outras IgGs à exceção da de anti-STI1 ele representa um controle mais completo. Pretendemos purificar a IgG e fazer este experimento o mais breve possível.

Para responder a segunda pergunta, sobre a especificidade do anticorpo, poderiam ser utilizadas estratégias experimentais para bloquear a expressão de Hop/STI1 (Rhodes e Trimmer, 2006). Até o momento não existe descrição na literatura de utilização de siRNA ou de animais nocaute para Hop/STI1, talvez por esta proteína ter funções fundamentais na fisiologia celular. No entanto, temos alguns dados que apontam na direção de uma ação específica de anti-STI1. *Western blot* com este anticorpo apresenta uma banda única específica, sem marcação difusa. Foi descrito por Lopes e colaboradores que Hop/STI1 induz neuritogênese de neurônios hipocâmpais em cultura (Lopes et al, 2005). O pré-tratamento com anti-STI1 bloqueia o efeito neuritogênico de Hop/STI1 nestas culturas de neurônios hipocâmpais (MH Lopes, comunicação pessoal). Nosso dado de um efeito de anti-STI1 aumentando a proliferação celular enquanto o tratamento com Hop/STI1 tem efeito anti-proliferativo também favorece esta idéia.

Apesar destes dados, ainda não podemos excluir a hipótese de que o anticorpo esteja agindo por *cross-linking*. Suas cadeias de imunoglobulina

poderiam estar permitindo interações cruzadas transdutoras de sinais neuroprotetores ou proliferativos. Tratamentos com anticorpos monoclonais contra a proteína príon celular provocam, por *cross-linking*, o recrutamento da tirosina cinase Fyn em linhagem neuronal (Mouillet-Richard et al, 2000) ou a morte celular em hipocampo e cerebelo de camundongos (Solforosi et al, 2004). Estes experimentos demonstram que PrP^C é capaz de transduzir estes sinais, mas através de uma interação que não mimetiza uma situação fisiológica.

Nestes dois trabalhos o tratamento com os fragmentos Fab dos anticorpos não replicou os dados com os anticorpos inteiros. Pretendemos repetir nossos experimentos utilizando fragmento Fab de anti-STI1 para determinar se nosso efeito se dá pela ligação aos domínios de hop/STI1 ou a interações não específicas com a porção imunoglobulina do anticorpo.

Este anti-STI1 é policlonal, de modo que não é possível definir a qual epítipo de Hop/STI1 o anticorpo está se ligando nem garantir que é o mesmo epítipo para todas as populações celulares que estudamos. É possível que nossos diferentes efeitos sejam fruto da ação de diferentes frações do anti-STI1 em cada sub-população retiniana.

Apesar destas colocações, o fato de anti-STI1 ter efeito oposto ao de Hop/STI1 na proliferação celular na retina em desenvolvimento, o de antagonizar o efeito de Hop/STI1 em culturas de hipocampo e deste anticorpo ter uma marcação específica no *western blot* sugerem que ele seja uma ferramenta válida para estudar a modulação de eventos celulares por Hop/STI1.

9. Anti-STI1: agonista ou bloqueador?

Restam algumas hipóteses quanto a como anti-STI1 estaria interferindo na sinalização mediada por Hop/STI1 na retina em desenvolvimento. Como hipóteses gerais, ele poderia ter um efeito agonista ou bloqueador.

A ligação de anti-STI1 a domínios específicos de Hop/STI1 poderia ter ação agonista ao direcionar a ligação de Hop/STI1 a ligantes específicos. Uma otimização de determinadas ligações pode ser obtida se domínios de ligantes competidores forem encobertos. Pensando por este prisma, a sinalização mediada por Hop/STI1 seria um somatório dos sinais transduzidos por diferentes parceiros, e o anti-STI1 estaria canalizando a sinalização para uma via, ou ao menos priorizando um sinal a ponto dele se tornar expressivo no balanço da célula. Alternativamente, como já discutido, interações com novos ligantes podem surgir a partir de *cross linking*.

Anti-STI1 poderia ter ação bloqueadora, privando Hop/STI1 de seus ligantes por se ligar a seus domínios de interação. A presença de anti-STI1 geraria uma diminuição na quantidade de Hop/STI1 disponível para seus parceiros, causando uma redução na concentração extracelular de Hop/STI1. Esta ação teria algumas conseqüências na NBL, nas células ganglionares e nas células proliferantes discutidas abaixo.

Na camada neuroblástica, as células em situação de estresse (pelo tratamento com anisomicina) responderiam a Hop/STI1 de duas maneiras, dependendo da concentração desta proteína. Em altas concentrações (como é o caso do tratamento com STI1 exógena), STI1 se ligaria preferencialmente a PrP^C, bloqueando a morte celular. Em concentrações abaixo da fisiológica

(conseqüência do tratamento com anti-STI1, que estaria 'sequestrando' os domínios de interação de STI1 ao se ligar a ela), STI1 não seria capaz de se ligar a PrP^C de forma a transduzir sinal, mas a ligação com outro ligante (X) de maior afinidade estaria sinalizando para proteger as células, por outra via. Em faixas de concentração intermediárias a estequiometria das maquinarias ativadas por PrP^C e X ou a interferência de sinais induzidos por outros ligantes de STI1 estariam impedindo uma efetiva sinalização protetora.

Na GCL, a diminuição da concentração de STI1 disponível (pelo tratamento com o anticorpo) bloqueia a morte celular, o que gera a hipótese de que nesta situação de axotomia STI1 estaria sinalizando para induzir morte celular. Apesar de termos verificado uma tendência à indução de morte no tratamento com Hop/STI1, esta foi muito pequena. O tempo de 20 horas de tratamento está muito próximo do pico de morte das células ganglionares induzida por axotomia, o que dificulta a observação de fenômenos que aumentem a morte destas células. Pretendemos fazer experimentos em tempos de incubação menores para verificar se uma maior concentração de Hop/STI1 estaria aumentando a taxa de morte destas células.

Nas células proliferantes, o tratamento com Hop/STI1 teve efeito anti-proliferativo, enquanto anti-STI1 induziu proliferação. Este antagonismo sugere que Hop/STI1 endógena possuiria uma sinalização anti-proliferativa basal, e anti-STI1, ao reduzir a quantidade de Hop/STI1 extracelular, estaria reduzindo este 'freio' gerando mais proliferação. Esta interpretação também contempla o fato do efeito do tratamento com Hop/STI1 não ser muito expressivo, e de alcançar um plateau com uma concentração baixa - de 200nM -; sugerindo que a sinalização

anti-proliferativa de Hop/STI1 nos níveis fisiológicos estaria quase saturada, e um tratamento com Hop/STI1 exógena por consequência, seria pouco eficaz.

10. Hop/STI1 na retina em desenvolvimento

Dentre os dois paradigmas de indução de morte celular que utilizamos, o da GCL é o que mais se aproxima da morte que ocorre no desenvolvimento, uma vez que estas células morrem durante este período pela perda de suporte trófico. Ao analisarmos em conjunto os dados da morte das células ganglionares e de proliferação celular, podemos sugerir uma hipótese interessante (Figura 30). Hop/STI1 em alta concentração tem efeito anti-proliferativo e tende a facilitar a morte celular. Em baixa concentração, no entanto, tem efeito de bloqueio da morte celular e indução de proliferação. Estes efeitos são coerentes com os sinais necessários a células em dois estágios diferentes de desenvolvimento: células que estão saindo do ciclo – que vão se diferenciar e têm alta probabilidade de morrer - e neuroblastos que precisam continuar proliferando. Um gradiente de Hop/STI1, portanto, poderia ser um dos controladores do *switch* entre estes dois estágios.

A variação na quantidade de Hop/STI1 extracelular poderia ser resultante de uma regulação na secreção de Hop/STI1 por células da retina e da formação de gradientes desta proteína. Ou ainda, a variação na disponibilidade de Hop/STI1 extracelular poderia ser reflexo de uma interação com ligantes distintos e ser definida pela expressão diferencial de ligantes na membrana da célula.

Supondo uma situação fisiológica em que tivéssemos uma concentração estável de Hop/STI1 no tecido, células que expressem diferentes conjuntos de ligantes ‘enxergarão’ a concentração extracelular de Hop/STI1 de maneiras distintas. Estes diferentes conjuntos de ligantes poderiam ser determinados pelo

estágio de desenvolvimento da célula. Isto forneceria um modelo de como Hop/STI1 poderia estar regulando processos de morte e proliferação celular em diferentes populações celulares de acordo com seu estágio do desenvolvimento.

Nesta dissertação estudamos o papel da co-chaperona Hop/STI1 na modulação de dois eventos celulares: morte celular programada e proliferação celular. O estudo dos fatores intrínsecos e extrínsecos que regulam os eventos de morte, diferenciação e morte celular no desenvolvimento é crucial para a compreensão de como um tecido funcional é formado e para entender e potencialmente tratar distúrbios de desenvolvimento. Vimos que Hop/STI1 modula morte celular e proliferação, eventos que ocorrem naturalmente durante o desenvolvimento, época em que esta co-chaperona atinge seu pico de expressão.

Figura 30:

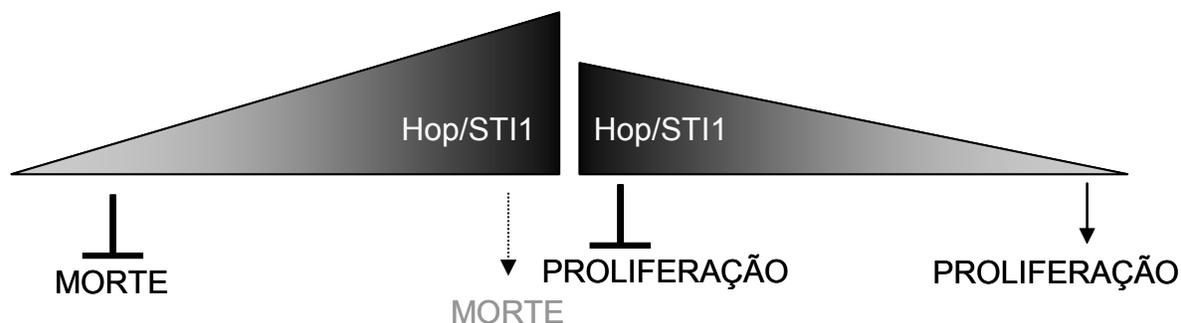


Figura 30: Hipótese de como Hop/STI1 estaria agindo na retina em desenvolvimento. Uma diferença na concentração de Hop/STI1 extracelular definiria o parceiro e a sinalização modulada pela proteína. Estágios diferentes de comprometimento poderiam implicar diferentes sensibilidades das células aos sinais extracelulares. Desta forma, variações na quantidade de ligante de STI disponível ou do acoplamento funcional desta sinalização em diferentes populações celulares definiriam a responsividade a Hop/STI1. Este seria um modelo para explicar a regulação diferencial por Hop/STI1 destes eventos celulares em populações celulares diferentes.

CONCLUSÕES:

- Hop/STI1 está presente na retina de ratos neonatos e é mais expressa na retina em desenvolvimento do que no tecido adulto.
- Anti-STI1 bloqueia a morte celular induzida por anisomicina na camada neuroblástica da retina. Este bloqueio é independente da proteína príon celular e não envolve as vias de AMPc/PKA, PI3K ou PKC.
- Hop/STI1 não bloqueia a morte das células ganglionares induzida por axotomia.
- Anti-STI1 tem efeito protetor sobre a morte das células ganglionares da retina. Este efeito é independente de PrP^C e das vias de AMPc/PKA, ERK, PKC e PI3K.
- Hop/STI1 tem efeito anti-proliferativo na retina em desenvolvimento. Tratamento com anti-STI1 aumenta a proliferação na retina. Os efeitos de Hop/STI1 e de anti-STI1 na proliferação celular são independentes de príon celular.

Nosso modelo, diferentemente dos demais estudos sobre funções extracelulares de Hop/STI1, se aproxima mais de elucidação de uma função fisiológica de Hop/STI1 por lidar com eventos celulares que ocorrem naturalmente durante o desenvolvimento. Desta forma, a proteína Hop/STI1 se apresenta como potencial fator extrínseco de regulação de morte celular e proliferação na retina em desenvolvimento, cuja regulação e mecanismo de ação precisam ser mais estudados.

BIBLIOGRAFIA:

ABBAS-TERKI T, DONZE O, BRIAND PA, PICARD D. Hsp104 interacts with Hsp90 cochaperones in respiring yeast. **Mol Cell Biol**, v. 21. n. 22, p. 7569-75, 2001

ABBAS-TERKI T, BRIAND PA, DONZE O, PICARD D. The Hsp90 co-chaperones Cdc37 and Sti1 interact physically and genetically. **Biol Chem**, v. 383. n. 9, p. 1335-42, 2002.

AGUZZI A, HEIKENWALDER M, MIELE G. Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases. **The J Clin. Invest**, v. 114. n. 2, p. 153-60, 2004.

ALEXIADES MR, CEPKO CL. Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. **Dev Dyn**, v. 205. n. 3, p. 293-307, 1996.

ARISPE N, DOH M, SIMAKOVA O, KURGANOV B, DE MAIO A. Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. **FASEB J**, v. 18. n. 14, p. 1636-45, 2004.

AULUCK PK, CHAN HY, TROJANOWSKI JQ, LEE VM, BONINI NM. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. **Science**, v. 295. n. 5556, p. 865-8, 2002.

BALLA T. Pharmacology of phosphoinositides, regulators of multiple cellular functions. **Curr Pharm Des**, v. 7. n. 6, p. 475-507, 2001.

BARNSTABLE CJ. A molecular view of vertebrate retinal development. **Mol Neurobiol**, v. 1. n. 1-2, p. 9-46, 1987.

BASU S, SRIVASTAVA PK. Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses. **Cell Stress Chaperones**, v. 5. n. 5, p. 443-51, 2000.

BEERE HM. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. **J Cell Sci**, v. 117. n. 13, p. 2641-51, 2004.

BERTOLOTTO C, MAULON L, FILIPPA N, BAIER G, AUBERGER P. Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. **J Biol Chem**, v. 275. n. 47, p. 37246-50, 2000.

- BINDER RJ, HAN DK, SRIVASTAVA PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. **Nat Immunol**, v. 1. n. 2, p. 151-5, 2000.
- BLACK JD. Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. **Front Biosci**, v. 5, p. 406-23, 2000.
- BLATCH GL, LASSLE M. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. **Bioessays**, v. 21. n. 11, p. 932-9, 1999.
- BONNI A, BRUNET A, WEST AE, DATTA SR, TAKASU MA, GREENBERG ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. **Science**, v. 286. n. 5443, p. 1358-62, 1999.
- BOUILLET P, STRASSER A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. **J Cell Sci**, v. 115. n. 8, p. 1567-74, 2002.
- BUKAU B, HORWICH AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92. n. 3, p. 351-66, 1998.
- BRUNET A, DATTA SR, GREENBERG ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11. n. 3, p. 297-305, 2001.
- CAI H, SMOLA U, WIXLER V, EISENMANN-TAPPE I, DIAZ-MECO MT, MOSCAT J, RAPP U, COOPER GM. Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. **Mol Cell Biol**, v. 17. n. 2, p. 732-41, 1997.
- CAMPOS CB. Transdução de sinais de apoptose na retina em desenvolvimento: manipulação farmacológica de vias que envolvem a MAP cinase. Tese (Doutorado em Biofísica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- CAMPOS CB, BEDARD PA, LINDEN R. Selective involvement of the PI3K/PKB/bad pathway in retinal cell death. **J Neurobiol**, v. 56. n. 2, p. 171-7, 2003.
- CAMPOS CB, BEDARD PA, LINDEN R. Requirement of p38 stress-activated MAP kinase for cell death in the developing retina depends on the stage of cell differentiation. **Neurochem Int**, v. 49. n. 5, p. 494-9, 2006.

- CASABONA G. Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 21. n. 3, p. 407-25, 1997.
- CEPKO CL, AUSTIN CP, YANG X, ALEXIADES M, EZZEDDINE D. Cell fate determination in the vertebrate retina. **PNAS**, v. 93. n. 2, p. 589-95, 1996.
- CHEN S, PRAPAPANICH V, RIMERMAN RA, HONORE B, SMITH DF. Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with heat shock proteins hsp90 and hsp70. **Mol Endocrinol**, v. 10. n. 6, p. 682-93, 1996.
- CHEN S, SMITH DF. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. **J Biol Chem**, v. 273. n. 52, p. 35194-200, 1998.
- CHEUNG EC, SLACK RS. Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. **Sci STKE**, v. 2004. n. 251, 2004.
- CHEUNG ZH, CHAN YM, SIU FK, YIP HK, WU W, LEUNG MC, SO KF. Regulation of caspase activation in axotomized retinal ganglion cells. **Mol Cell Neurosci**, v. 25. n. 3, p. 383-93, 2004.
- CHIARINI LB. Proteínas associadas à apoptose e à diferenciação celular na retina em desenvolvimento. 1999. Tese (Doutorado em Biofísica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- CHIARINI LB, FREITAS FG, PETRS-SILVA H, LINDEN R. Evidence that the bifunctional redox factor / AP endonuclease Ref-1 is an anti-apoptotic protein associated with differentiation in the developing retina. **Cell Death Differ**, v. 7. n. 3, p. 272-81, 2000.
- CHIARINI, LB; FREITAS, A.R.O; ZANATA, S.M.; MARTINS, V.R.; BRENTANI, R.R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J.**, v.21. n. 13, p. 3317-3326, 2002.
- CHU CT, LEVINTHAL DJ, KULICH SM, CHALOVICH EM, DEFRANCO DB. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. **Eur J Biochem**, v. 271. n. 11, p. 2060-6, 2004.
- COLLINS SJ, LAWSON VA, MASTERS CL. Transmissible spongiform encephalopathies. **Lancet**, v. 363. n. 9402, p. 51-61, 2004.

- COWAN KJ, STOREY KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **J Exp Biol**, v. 206. n. 7, p. 1107-15, 2003.
- DATTA SR, DUDEK H, TAO X, MASTERS S, FU H, GOTOH Y, GREENBERG ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, v. 91. n. 2, p. 231-41, 1997.
- DEGTEREV A, BOYCE M, YUAN J. A decade of caspases. **Oncogene**, v. 22. n. 53, p. 8543-67, 2003.
- DE MELLO FG. The ontogeny of dopamine-dependent increase of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the chick retina. **J Neurochem**, v. 31. n. 4, p. 1049-53, 1978.
- DE ROOIJ J, ZWARTKRUIS FJ, VERHEIJEN MH, COOL RH, NIJMAN SM, WITTINGHOFER A, BOS JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. **Nature**, v. 396. n. 6710, p. 474-7, 1998.
- DING L, WANG H, LANG W, XIAO L. Protein kinase C-epsilon promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. **J Biol Chem**, v. 277. n. 38, p. 35305-13, 2002.
- DITTMAR KD, HUTCHISON KA, OWENS-GRILLO JK, PRATT WB. Reconstitution of the steroid receptor.hsp90 heterocomplex assembly system of rabbit reticulocyte lysate. **J Biol Chem**, v. 271. n. 22, p. 12833-9, 1996.
- DITTMAR KD, PRATT WB. Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. **J Biol Chem**, v. 272. n. 20, p. 13047-54, 1997.
- DONOVAN SL, DYER MA. Regulation of proliferation during central nervous system development. **Semin Cell Dev Biol.**, v. 16. n. 3, p. 407-21, 2005.
- DOS SANTOS AA, DE ARAUJO EG. The effect of PKC activation on the survival of rat retinal ganglion cells in culture. **Brain Res**, v. 853. n. 2, p. 338-43, 2000.

- DOS SANTOS AA, MEDINA SV, SHOLL-FRANCO A, DE ARAUJO EG. PMA decreases the proliferation of retinal cells in vitro: the involvement of acetylcholine and BDNF. **Neurochem Int**, v. 42. n. 1, p. 73-80, 2003.
- DOU F, NETZER WJ, TANEMURA K, LI F, HARTL FU, TAKASHIMA A, GOURAS GK, GREENGARD P, XU H. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. **PNAS**, v. 100, p. 721-726, 2003.
- DUDEK H, DATTA SR, FRANKE TF, BIRNBAUM MJ, YAO R, COOPER GM, SEGAL RA, KAPLAN DR, GREENBERG ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. **Science**, v. 275. n. 5300, p. 661-5, 1997.
- DUGAN LL, KIM JS, ZHANG Y, BART RD, SUN Y, HOLTZMAN DM, GUTMANN DH. Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. **J Biol Chem**, v. 274. n. 36, p. 25842-8, 1999.
- DYER MA, CEPKO CL. p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. **Development**, v. 127. n. 16, p. 3593-605, 2000.
- DYER MA, CEPKO CL. Regulating proliferation during retinal development. **Nat Rev Neurosci**, v. 2. n. 5, p. 333-42, 2001a.
- DYER MA, CEPKO CL. p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. **J Neurosci**, v. 21. n. 12, p. 4259-71, 2001b.
- EARNSHAW WC, MARTINS LM, KAUFMANN SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annual reviews of Biochemistry**, v. 68, p. 383-424, 1999.
- EDWARDS SN, BUCKMASTER AE, TOLKOVSKY AM. The death programme in cultured sympathetic neurones can be suppressed at the posttranslational level by nerve growth factor, cyclic AMP, and depolarization. **J Neurochem**, v. 57. n. 6, p. 2140-3, 1991.
- ELLIS HM, HORVITZ HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**, v. 44. n. 6, p. 817-29, 1986.
- ERLICH, RB. ST11, prion celular e a proliferação de gliomas. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- ERLICH, RB, KAHN AS, LIMA FRS, MURAS AG, MARTINS RAP, LINDEN R, CHIARINI LB, MARTINS VR, NETO VM. STI1 promotes glioma proliferation through mapk and pi3k pathways. Submetido, 2006.
- EUSTACE BK, JAY DG. Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. **Cell Cycle**, v. 3. n. 9, p. 1098-100, 2004.
- FAVATA MF, HORIUCHI KY, MANOS EJ, DAULERIO AJ, STRADLEY DA, FEESER WS, VAN DYK DE, PITTS WJ, EARL RA, HOBBS F, COPELAND RA, MAGOLDA RL, SCHERLE PA, TRZASKOS JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. **J Biol Chem**, v. 273. n. 29, p. 18623-32, 1998.
- FRUMAN DA, MEYERS RE, CANTLEY LC. Phosphoinositide kinases. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 481-507, 1998.
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol**, v. 119. n. 3, p. 493-501, 1992.
- GILMAN, AG. Protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 67. n. 1, p. 305-12, 1970.
- GOMEZ-ANGELATS M, CIDLOWSKI JA. Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v. 276. n. 48, p. 44944-52, 2001.
- GUIMARAES, CA, LINDEN, R. Programmed cell deaths: Apoptosis and alternative death styles. **Eur. J. Biochem**, v. 271, p. 1638-1650, 2004.
- GUTCHER I, WEBB PR, ANDERSON NG. The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. **Cell Mol Life Sci**, v. 60. n. 6, p. 1061-70, 2003.
- GUZHOVA I, KISLYAKOVA K, MOSKALIOVA O, FRIDLANSKAYA I, TYTELL M, CHEETHAM M, MARGULIS B. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. **Brain Res**, v. 914. n. 1-2, p. 66-73, 2001.
- GRAHAME-SMITH DG, BUTCHER RW, NEY RL, SUTHERLAND EW. Adenosine 3',5'-monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotrophic hormone on the adrenal cortex. **J Biol Chem**, vol. 242. n. 23, p. 5535-41, 1967.

- GRANER E, MERCADANTE AF, ZANATA SM, FORLENZA OV, CABRAL AL, VEIGA SS, JULIANO MA, ROESLER R, WALZ R, MINETTI A, IZQUIERDO I, MARTINS VR, BRENTANI RR. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 76. n. 1, p. 85-92, 2000.
- HARTL FU, HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, v. 295. n. 5561, p. 1852-8, 2002.
- HENGARTNER MO, ELLIS RE, HORVITZ HR. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. **Nature**, v. 356. n. 6369, p. 494-9, 1992.
- HERNANDEZ MP, SULLIVAN WP, TOFT DO. The assembly and intermolecular properties of the hsp70-Hop-hsp90 molecular chaperone complex. **J Biol Chem**, v. 277. n. 41, p. 38294-304, 2002.
- HETMAN M, GOZDZ A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. **Eur J Biochem**, v. 271. n. 11, p. 2050-5, 2004.
- HETMAN M, XIA Z. Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 60. n. 4, p. 531-45, 2000.
- HETZ C, MAUNDRELL K, SOTO C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? **Trends Mol Med**, v. 9. n. 6, p. 237-43, 2003.
- HUNTER T. Signaling--2000 and beyond. **Cell**, v. 100. n. 1, p. 113-27, 2000.
- HURLEY JH. Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. **J Biol Chem**, v. 274. n. 12, p. 7599-602, 1999.
- JANA NR, TANAKA M, WANG G, NUKINA N. Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. **Hum Mol Genet**, v. 9. n. 13, p. 2009-18, 2000.
- JIANG X, WANG X. Cytochrome C-mediated apoptosis. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 87-106, 2004.
- JOHNSON, B. D., SCHUMACHER, R. J., ROSS, E. D., AND TOFT, D. O. Hop modulates hsp70/hsp90 interactions in protein folding. **J Biol Chem**, v. 273, p. 3679-3686, 1998.

- JOHNSON GL, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298. n. 5600, p.1911-2, 2002.
- KENNEDY SG, KANDEL ES, CROSS TK, HAY N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. **Mol Cell Biol**, v. 19. n. 8, p. 5800-10, 1999.
- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26. n. 4, p. 239-57, 1972.
- KERR JFR e HARMON BV. Definitions and incidence of apoptosis: An Historical Perspective. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.
- KILIC U, KILIC E, JARVE A, GUO Z, SPUDICH A, BIEBER K, BARZENA U, BASSETTI CL, MARTI HH, HERMANN DM. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. **J Neurosci**, v. 26. n. 48, p. 12439-46, 2006.
- KLIONSKY DJ, EMR SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290. n. 5497, p. 1717-21, 2000.
- KLUCKEN J, SHIN Y, MASLIAH E, HYMAN BT, MCLEAN PJ. Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. **J Biol Chem**, v. 279. n. 24, p. 25497-502, 2004.
- KOBAYASHI Y, SOBUE G. Protective effect of chaperones on polyglutamine diseases. **Brain Res Bull**, v. 56. n. 3-4, p. 165-8, 2001.
- KOPPERUD R, KRAKSTAD C, SELHEIM F, DOSKELAND SO. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. **FEBS Letters**, v. 546. n. 1, p. 121-6, 2003.
- KRETZ A, SCHMEER C, TAUSCH S, ISENMANN S. Simvastatin promotes heat shock protein 27 expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells in vivo. **Neurobiol Dis**, v. 21. n. 2, p. 421-30, 2006.
- KUBRUSLY RC, DA CUNHA MC, REIS RA, SOARES H, VENTURA AL, KURTENBACH E, DE MELLO MC, DE MELLO FG. Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Muller cells. **Brain Res**, v. 1038. n. 2, p. 141-9, 2005.

- LANCASTER GI, FEBBRAIO MA. Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. **Exerc Immunol Rev**, v. 11, p. 46-52, 2005.
- LANOTTE M, RIVIERE JB, HERMOUET S, HOUGE G, VINTERMYR OK, GJERTSEN BT, DOSKELAND SO. Programmed cell death (apoptosis) is induced rapidly and with positive cooperativity by activation of cyclic adenosine monophosphate-kinase I in a myeloid leukemia cell line. **J Cell Physiol.**, v. 146. n. 1, p. 73-80, 1991.
- LEIST M, JAATTELA M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2. n. 8, p. 589-98, 2001.
- LEVINE EM, GREEN ES. Cell-intrinsic regulators of proliferation in vertebrate retinal progenitors. **Semin Cell Dev Biol**, v. 15. n. 1, p. 63-74, 2004.
- LIAO DF, JIN ZG, BAAS AS, DAUM G, GYGI SP, AEBERSOLD R, BERK BC. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem**, v. 275. n. 1, p. 189-96, 2000.
- LINDEN R, REHEN, SK, CHIARINI LB Apoptosis in developing retinal tissue. **Progr. Retinal Eye Res.** v. 18. p. 133-165, 1999.
- LINDEN R, REESE BE. Programmed cell death. In: Eglen, S., Sernagor, E., Wong, R. (Eds.), Mechanisms of retinal development. Cambridge University Press, pp. 208–241, 2006.
- LOCKSHIN, RA, ZAKERI Z. Programmed cell death and Apoptosis, in Apoptosis: the molecular basis of cell death, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1991.
- LOMO J, BLOMHOFF HK, BEISKE K, STOKKE T, SMELAND EB. TGF- β 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. **J Immunology**, v. 154. n. 4, p. 1634-43, 1995.
- LOPES MH, HAJJ GN, MURAS AG, MANCINI GL, CASTRO RM, RIBEIRO KC, BRENTANI RR, LINDEN R, MARTINS VR. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci**, v. 25. n. 49, p. 11330-9, 2005.

- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193. n. 1, p. 265-75, 1951.
- LUCAS M, SANCHEZ-MARGALET V. Protein kinase C involvement in apoptosis. **Gen Pharmacol**, v. 26. n. 5, p. 881-7, 1995.
- MACLEAN M, PICARD D. Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases. **Cell Stress Chaperones**, v. 8. n. 2, p. 114-9, 2003.
- MAEHAMA T, DIXON JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. **Trends Cell Biol**, v. 9. n. 4, p. 125-8, 1999.
- MARQUARDT T, GRUSS P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. **Trends Neurosci**, v. 25. n. 1, p. 32-8, 2002.
- MARTINS RA, LINDEN R, DYER MA. Glutamate regulates retinal progenitors cells proliferation during development. **Eur J Neurosci**, v. 24. n. 4, p. 969-80, 2006.
- MEI FC, QIAO J, TSYGANKOVA OM, MEINKOTH JL, QUILLIAM LA, CHENG X. Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. **J Biol Chem**, v. 277. n. 13, p. 11497-504, 2002.
- MENTZ F, MERLE-BERAL H, OUAZ F, BINET JL. Theophylline, a new inducer of apoptosis in B-CLL: role of cyclic nucleotides. **Br J Haematol**, v. 90. n. 4, p. 957-9, 1995.
- MEYER-FRANKE A, KAPLAN MR, PFRIEGER FW, BARRES BA. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. **Neuron**, v. 15. n. 4, p. 805-19, 1995.
- MEYER-FRANKE A, WILKINSON GA, KRUTTGEN A, HU M, MUNRO E, HANSON MG JR, REICHARDT LF, BARRES BA. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. **Neuron**, v. 21. n. 4, p. 681-93, 1998.
- MIURA M, ZHU H, ROTELLO R, HARTWIEG EA, YUAN J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. **Cell**, v. 75. n. 4, p. 653-60, 1993.

- MOCHLY-ROSEN D, KHANER H, LOPEZ J. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. **PNAS**, v. 88. n. 9, p. 3997-4000, 1991.
- MORGAN DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 13, p. 261-291, 1997.
- MOUILLET-RICHARD S, ERMONVAL M, CHEBASSIER C, LAPLANCHE JL, LEHMANN S, LAUNAY JM, KELLERMANN O. Signal transduction through prion protein. **Science**, v. 289. n. 5486, p. 1925-8, 2000.
- MUCHOWSKI PJ, WACKER JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. **Nat Rev Neurosci**, v. 6. n. 1, p. 11-22, 2005.
- NAKAZAWA T, TAMAI M, MORI N. Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. **IOVS**, v. 43. n. 10, p. 3319-26, 2002.
- NAKAZAWA T, TAKAHASHI H, SHIMURA M. Estrogen has a neuroprotective effect on axotomized RGCs through ERK signal transduction pathway. **Brain Res**, v. 1093. n. 1, p. 141-9, 2006.
- NERI LM, BORGATTI P, CAPITANI S, MARTELLI AM. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1584. n. 2-3, p. 73-80, 2002.
- NEWTON AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. **Chem Ver**, v. 101. n. 8, p. 2353-64, 2001.
- NICOLET CM, CRAIG EA. Isolation and characterization of ST11, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, v. 9. n. 9, p. 3638-46, 1989.
- NISHIZUKA Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science**, v. 258. n. 5082, p. 607-14, 1992.
- NJAINE, B. Papel do peptídeo ativador de adenilil ciclase na pituitária (PACAP) na proliferação celular na retina em desenvolvimento. 2005. Dissertação (Mestrado em Biofísica) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- NOLLEN EA, MORIMOTO RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. **J Cell Sci**. v. 115. n. 14, p. 2809-16, 2002.
- OBERMANN, W. M. J., SONDERMANN, H., RUSSO, A. A., PAVLETICH, N. P., AND HARTL, F. U. In vivo function of hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. **J Cell Biol**, v. 143, p. 901-910, 1998.
- ODUNUGA OO, LONGSHAW VM, BLATCH GL. Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein. **Bioessays**, v. 26. n. 10, p. 1058-68, 2004.
- PEARSON G, ROBINSON F, BEERS GIBSON T, XU BE, KARANDIKAR M, BERMAN K, COBB MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr Rev**, v. 22. n. 2, p. 153-83, 2001.
- PETRS-SILVA H, DE FREITAS FG, LINDEN R, CHIARINI LB. Early nuclear exclusion of the transcription factor max is associated with retinal ganglion cell death independent of caspase activity. **J Cell Physiol**, v. 198. n. 2, p. 179-87, 2004.
- PETRS-SILVA H, CHIODO V, CHIARINI LB, HAUSWIRTH WW, LINDEN R. Modulation of the expression of the transcription factor Max in rat retinal ganglion cells by a recombinant adeno-associated viral vector. **Braz J Med Biol Res**, v. 38. n. 3, p. 375-9, 2005.
- PIMENTEL B, RODRIGUEZ-BORLADO L, HERNANDEZ C, CARRERA AC. A Role for phosphoinositide 3-kinase in the control of cell division and survival during retinal development. **Dev Biol**, v. 247. n. 2, p. 295-306, 2002.
- PRADA C, PUGA J, PEREZ-MENDEZ L, LOPEZ R, RAMIREZ G. Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. **Eur J Neurosci**, v. 3. n. 6, p. 559-569, 1991.
- PRODROMOU C, SILIGARDI G, O'BRIEN R, WOOLFSON DN, REGAN L, PANARETOU B, LADBURY JE, PIPER PW, PEARL LH. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. **EMBO J**, v. 18. n. 3, p. 754-62, 1999.
- PRODROMOU C, PANARETOU B, CHOCHAN S, SILIGARDI G, O'BRIEN R, LADBURY JE, ROE SM, PIPER PW, PEARL LH. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. **EMBO J**, v. 19. n. 16, p. 4383-92, 2000.

- PRUSINER SB. Prions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95. n. 23, p. 13363-83, 1998.
- RABACCHI SA, BONFANTI L, LIU XH, MAFFEI L. Apoptotic cell death induced by optic nerve lesion in the neonatal rat. **J Neurosci**, v. 14. n. 9, p. 5292-301, 1994.
- RADONS J, MULTHOFF G. Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. **Exerc Immunol Rev**, v. 11, p. 17-33, 2005.
- REHEN SK, ARY-PIRES R, LINDEN R. Intraretinal neurotrophic activity prevents the degeneration of ganglion cells in retinal explants. **Braz J Med Biol Res**, v. 26. n. 9, p. 955-9, 1993.
- REHEN SK, LINDEN R. Apoptosis in the developing retina: paradoxical effects of protein synthesis inhibition. **Braz J Med Biol Res**, v. 27. n. 7, p.1647-51, 1994.
- REHEN SK, VARELLA MH, FREITAS FG, MORAES MO, LINDEN R. Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cyclic AMP on apoptosis in the developing retina. **Development**, v. 122. n. 5, p. 1439-48, 1996.
- REHEN SK, NEVES DD, FRAGEL-MADEIRA L, BRITTO LR, LINDEN R. Selective sensitivity of early postmitotic retinal cells to apoptosis induced by inhibition of protein synthesis. **Eur J Neurosci**, v. 11. n. 12, p. 4349-56, 1999.
- RHODES KJ, TRIMMER JS. Antibodies as valuable neuroscience research tools versus reagents of mass distraction. **J Neurosci**, v. 26. n. 31, p. 8017-20, 2006.
- RIBAS, V. O papel do fator de transcrição ATF-2 na degeneração retrógrada de células ganglionares da retina. 2004. Monografia - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- ROSSOMANDO AJ, PAYNE DM, WEBER MJ, STURGILL TW. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. **PNAS**, v. 86, p. 6940-6943, 1989.
- RUTKOWSKI DT, KAUFMAN RJ. A trip to the ER: coping with stress. **Trends Cell Biol**, v. 14. n. 1, p. 20-8, 2004.

- RUVOLO PP, DENG X, CARR BK, MAY WS. A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. **J Biol Chem**, v. 273. n. 39, p. 25436-42, 1998.
- RYDEL RE, GREENE LA. cAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85. n. 4, p. 1257-61, 1988.
- SAKUDO A, LEE DC, LI S, NAKAMURA T, MATSUMOTO Y, SAEKI K, ITOHARA S, IKUTA K, ONODERA T. PrP cooperates with STI1 to regulate SOD activity in PrP-deficient neuronal cell line. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 328. n. 1, p. 14-9, 2005.
- SCHEUFLER C, BRINKER A, BOURENKOV G, PEGORARO S, MORODER L, BARTUNIK H, HARTL FU, MOAREFI I. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell**, v. 101. n. 2, p. 199-210, 2000.
- SELANDER KS, HARKONEN PL, VALVE E, MONKKONEN J, HANNUNIEMI R, VAANANEN HK. Calcitonin promotes osteoclast survival in vitro. **Mol Cell Endocrinol**, v. 122. n. 2, p. 119-29, 1996.
- SHAYWITZ, AJ E GREENBERG, ME. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 68, 1999.
- SHIMURA H, SCHWARTZ D, GYGI SP, KOSIK KS. CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. **J Biol Chem**, v. 279. n. 6, p. 4869-76, 2004.
- SILVEIRA MS, COSTA MR, BOZZA M, LINDEN R. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem**, v. 277. n. 18, p. 16075-80, 2002.
- SILVEIRA MS, LINDEN R. Neuroprotection by cAMP: Another brick in the wall. **Adv Exp Med Biol**, v. 557, p.164-76, 2006.
- SMITH, D. F., SULLIVAN, W. P., MARION, T. N., ZAITSU, K., MADDEN, B., MCCORMICK, D. J., AND TOFT, D. O. Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. **Mol Cell Biol**, v. 13, p. 869-876, 1993.

SOLFOROSI L, CRIADO JR, MCGAVERN DB, WIRZ S, SANCHEZ-ALAVEZ M, SUGAMA S, DEGIORGIO LA, VOLPE BT, WISEMAN E, ABALOS G, MASLIAH E, GILDEN D, OLDSTONE MB, CONTI B, WILLIAMSON RA. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. **Science**, v. 303. n. 5663, p. 1514-6, 2004.

SPERANDIO S, DE BELLE I, BREDESEN DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **PNAS**, v 97. n. 26, p. 14376-81, 2000.

SUBRAMANIAM S, UNSICKER K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. **Neuroscience**, v. 138. n. 4, p. 1055-65, 2006.

TAYLOR SS, YANG J, WU J, HASTE NM, RADZIO-ANDZELM E, ANAND G. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. **Biochim Biophys Acta**, v. 1697. n. 1-2, p. 259-69, 2004.

TEZEL G, YANG J, WAX MB. Heat shock proteins, immunity and glaucoma. **Brain Res. Bul**, v. 62, p. 473-480, 2004.

THORNBERRY NA, MOLINEAUX SM. Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death. **Protein Sci**, v. 4. n. 1, p. 3-12, 1995.

TRIANTAFILOU M, TRIANTAFILOU K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends Immunol**, v. 23. n. 6, p. 301-4, 2002.

UEDA Y, HIRAI S, OSADA S, SUZUKI A, MIZUNO K, OHNO S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. **J Biol Chem**, v. 271. n. 38, p. 23512-9, 1996.

VANDER HEIDEN AG, THOMPSON CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 209-216, 1999.

VANHAESEBROECK B, LEEVERS SJ, PANAYOTOU G, WATERFIELD MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. **Trends Biochem Sci**, v. 22. n. 7, p. 267-72, 1997.

- VANHAESEBROECK B, WATERFIELD MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. **Exp Cell Res**, v. 253. n. 1, p. 239-54, 1999.
- VIDAL A, KOFF A. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. **Gene**, v. 247, p. 1-15, 2000.
- VLAHOS CJ, MATTER WF, HUI KY, BROWN RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). **J Biol Chem**, v. 269. n. 7, p. 5241-8, 1994.
- VILLALBA M, BOCKAERT J, JOURNOT L. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. **J Neurosci**, v. 17. n. 1, p. 83-90, 1997.
- WALKER EH, PACOLD ME, PERISIC O, STEPHENS L, HAWKINS PT, WYMAN MP, WILLIAMS RL. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. **Mol Cell**, v. 6. n. 4, p. 909-19, 2000.
- WEINBERG RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, p. 323-330, 1995.
- WHITMAN SP, CIVOLI F, DANIEL LW. Protein kinase C β 1 activation by 1- β -D-arabinofuranosylcytosine is antagonistic to stimulation of apoptosis and Bcl-2 α down-regulation. **J Biol Chem**, v. 272, n. 38, p. 23481-4, 1997.
- WOLF BB, GREEN DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. **J Biol Chem**, v. 274. n. 29, p. 20049-52, 1999.
- WU T, TANGUAY RM. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and diseases: friend or foe? **Cell Stress Chaperones**, v. 11. n. 1, p. 1-12, 2006.
- YAO R, COOPER GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. **Science**, v. 267. n. 5206, p. 2003-6, 1995.
- YOUNG, JC, OBERMANN WM J, HARTL FU. Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. **J Biol Chem**, v. 273, p. 18007-18010, 1998.

YOUNG JC, HARTL FU. Chaperones and transcriptional regulation by nuclear receptors. **Nat Struct Biol**, v. 9. n. 9, p. 640-2, 2002.

YOUNG RW. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. **J Comp Neurol**, v. 229. n. 3, p. 362-73, 1984.

YOUNG RW. Cell differentiation in the retina of the mouse. **Anat Rec**, v. 212. n. 2, p. 199-205, 1985.

YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. **Cell**, v. 75. n. 4, p. 641-52, 1993.

ZANATA SM, LOPES MH, MERCADANTE AF, HAJJ GN, CHIARINI LB, NOMIZO R, FREITAS AR, CABRAL AL, LEE KS, JULIANO MA, DE OLIVEIRA E, JACHIERI SG, BURLINGAME A, HUANG L, LINDEN R, BRENTANI RR, MARTINS VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J**, v. 21. n. 13, p. 3307-3316, 2002.

ZHOU Y, PERNET V, HAUSWIRTH WW, DI POLO A. Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma. **Mol Ther**, v. 12. n. 3, p. 402-12, 2005.

ZIMMERMANN KC, BONZON C, GREEN DR. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, v. 92. n. 1, p. 57-70, 2001.

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](#)