

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

**ELIEZER DE MELLO SILVA**

**AÇÃO MODULATÓRIA DE IGF-I E EGF SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS  
CÉLULAS DA RETINA DE RATOS NEONATOS *IN VITRO*.**

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

**Orientadora: Elizabeth Giestal de Araujo**



**NITERÓI  
2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ELIEZER DE MELLO SILVA**

**AÇÃO MODULATÓRIA DE IGF-I E EGF SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS  
CÉLULAS DA RETINA DE RATOS NEONATOS *IN VITRO*.**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Hertha Meyer  
Departamento de Neurobiologia, Programa de Neuroimunologia  
Instituto de Biologia – UFF  
Apoio financeiro: CAPES, CNPq, PRONEX e FAPERJ.

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

**Orientadora: Elizabeth Giestal de Araujo**

**ELIEZER DE MELLO SILVA**

**AÇÃO MODULATÓRIA DE IGF-I E EGF SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS  
CÉLULAS DA RETINA DE RATOS NEONATOS *IN VITRO*.**

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

BANCA EXAMINADORA:

---

Dra. Penha Cristina Barradas (UERJ)

---

Dra. Clarissa Rodrigues Nascimento (UFRJ)

---

Dra. Regina Célia Cussa Kubrusly (UFF)

---

Dra. Aline Araújo dos Santos Rabelo (UFF-Revisora e Suplente)

---

Dr. Roberto Paes de Carvalho (Sub-coordenador do programa)

Silva, Eliezer de Mello  
AÇÃO MODULATÓRIA DE IGF-I E EGF SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS  
CÉLULAS DA RETINA DE RATOS NEONATOS *IN VITRO*. Eliezer de Mello  
Silva – Niterói: [s. n.], 2010.

Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia).

Universidade Federal Fluminense, 2010.

1. 2. 3. 4. 5.

I. Título.

*“Ao único que é digno de receber toda  
honra, toda glória, força e poder:  
Jesus Cristo”*

*Dedico este trabalho a  
minha família e a Line.  
Esta conquista é nossa  
meus amados.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me abençoar e me mostrar o quanto a sua mão esteve e está presente em minha vida me amparando e iluminando meus passos. “Esforça-te e tem bom ânimo porque eu serei contigo”. Js 1:09

Aos meus pais Carlos e Eliane por serem meu espelho de caráter, exemplos de motivação e de determinação, pois me mostraram que não importa o quanto as barreiras são grandes, elas nunca são intransponíveis.

A minha irmã Carolina, por sempre me incentivar e apoiar na busca de meus objetivos.

A Aline, pelo amor, carinho, dedicação e companheirismo com que sempre esteve ao meu lado, pelas conversas tentando me animar quando o cansaço e o desânimo me abatiam e pelos finais de semana indo ao laboratório comigo.

A minha orientadora Beth, que com paciência e extrema parsimônia me orientou e mostrou o caminho do conhecimento.

Ao amigo e professor Simão Pereira por ter me apresentado a Profa. Beth.

A amiga e professora Mônica Gouvêia, por ter sido minha grande incentivadora a fazer o mestrado, por ser o referencial de profissional farmacêutico e ter me dado a mão em meus primeiros passos caminhando na profissão.

Em especial a amiga Karinne por ter sido a primeira a me dar força e apoio me acolhendo logo que cheguei ao Hertha Meyer e também por me ajudar durante a dissertação. Kk à você minha gratidão, obrigado por você ensinar-me ainda mais a valorizar as pessoas.

Ao amigo Leandro, pelo seu otimismo, auto-estima e pela grande ajuda com o Western Blot. “Valeu Lê, você me ajudou muito lek”

Ao amigo Docinho, pelas conversas francas que tínhamos nos momentos de abatimento e tentando superar os obstáculos. “Valeu véio”

A Aline, por ter aceitado prontamente ser minha revisora, por me incentivar quando eu desanimava com resultados não esperados de algum experimento e pela ajuda criteriosa em alguns detalhes técnicos, mas que fizeram total diferença.

Aos demais “*fofletes*” do laboratório: Claydson, Luiz Eduardo, Leandro, Babu, Rafael, Sheila, Bebê e Bebéia, por estarem presentes em todos os momentos. Com vocês eu me diverti muito e assim o peso do cansaço do trabalho somado à empreitada do mestrado tornaram-se um pouco menos árdus do que realmente eram.

Aos amigos Alexandre José Fernandes e Alecsandro de Jesus pelo apoio técnico, sem vocês nada teria sido possível.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XVI
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1 Introdução.....	1
1.1 A Retina.....	1
1.2 Ciclo celular e a proliferação celular.....	6
1.3 Fator de crescimento semelhante à insulina.....	9
1.3.1 Receptor do IGF.....	15
1.3.2 Proteínas de ligação ao IGF.....	18
1.3.4 Sinalização Química.....	21
1.4 Fator de crescimento epidermal.....	24
1.4.1 Efeitos gerais do EGF.....	27
1.4.2 Efeitos do EGF no sistema nervoso.....	30
1.4.3 Receptor de EGF.....	31
1.4.4 Tráfego, endocitose e transativação do EGFR.....	35
1.4.5 Vias de sinalização ativadas pelo EGF.....	36
2. Objetivos.....	42
3. Materiais e métodos.....	43
3.1 Materiais.....	43
3.2 Métodos.....	43
3.2.1 Tratamento das placas de petri com poli-L-ornitina.....	43
3.2.2 Cultura de células da retina de ratos.....	44
3.2.3 Ensaio para incorporação de [ <sup>3</sup> H]-timidina.....	46
3.2.4 Análise estatística dos resultados.....	47
4. Resultados.....	48
5. Discussão.....	61
6. Conclusão.....	71
7. Referências Bibliográficas.....	73

## 7. LISTA DE ABREVIATURAS

A431 - Linhagem de células de carcinoma epidermóide humana.

ADAM - Família de proteínas compostas por desintegrinas e metaloproteínases.

Akt/PKB - Proteína cinase B.

AR - Anfirregulinas ou fator de crescimento derivado de Schwannoma (Ligante membro da família de ligantes EGF)

ATP - Adenosina Trifosfato.

BAD - Proteína próapoptótica que regula negativamente BCL-2 e BCL-XL e desloca BAX.

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro.

BSA - Albumina de soro bovino.

BTC - Betacelulina.

CCG - Camada de células ganglionares na retina.

CDK - Cinases dependentes de ciclinas.

c-Fos - Protooncogen celular pertencente à família de genes de fatores de transcrição.

c-Jun - Fator de transcrição.

CKI - Inibidor de cinases de ciclina.

CMF - Solução salina sem cálcio e magnésio.

c-Myc - Fator de transcrição

CNE - Camada nuclear externa na retina.

CNI - Camada nuclear interna na retina.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

CPE - Camada plexiforme externa na retina.

CPI - Camada plexiforme interna na retina.

CREB - Elemento de ligação responsivo ao AMPc.

CSF- Flúido cerebrospinal.

DAG - Diacilglicerol.

DNA - Ácido desoxirribonucléico.

E - Dia embrionário.

EGF - Fator de crescimento epidermal.

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidermal.

EPR - Epirregulina.

ErbB - Família de receptores dos ligantes de membros da família EGF (ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4).

ERKs - Cinases reguladas por sinais extracelulares.

Fase M - Mitose (divisão celular).

Fase S - Fase do ciclo celular onde ocorre a síntese de DNA.

FCS - Soro fetal bovino.

FGFb - Fator de crescimento de fibroblastos básico.

G0 - Período em que a célula está fora do ciclo celular; período quiescente.

G1 - Fase da interfase; primeiro intervalo, após a mitose.

G2 - Fase da interfase; segundo intervalo, antes da próxima mitose.

GDP - Guanosina difosfato.

GH - Hormônio de crescimento ou hormônio somatotrófico.

GPR - G protein receptors (receptores que quando ativados se ligam à proteína G).

Grb2 - Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento

GTP - Guanosina trifosfato.

G $\alpha$ i - Subunidade da proteína G (inibitória).

G $\beta$  $\gamma$  - Subunidades da proteína G.

HB-EGF - Heparina-EGF.

HER2 - Receptor de EGF tipo 2.

HER3 - Receptor de EGF tipo 3.

HER4 - Receptor de EGF tipo 4.

HIF - Fator induzido por hipóxia.

IGFBPs - Proteínas que se ligam ao IGF semelhantes à insulina.

IGF-I - Fator de crescimento semelhante à insulina 1.

IGF-II - Fator de crescimento semelhante à insulina 2.

IGFR-1 - Receptor para IGF do tipo 1.

IL-3 - Interleucina 3.

IL-4 - Interleucina 4.

IP3 - Inositol 1,4,5-trifosfato.

IRS1 - Substrato 1 para o receptor de insulina.

IRS4 - Substrato 4 para o receptor de insulina.

JAKs - Janus cinases.  
JNK - Cinase do c-Jun.  
KDa - quilo Daltons.  
MAP - Proteína cinase ativadora de mitose.  
MEK - Cinase ativadoras da MAP cinase (MEK 1/2).  
NFκB - Fator de ativação nuclear κB.  
NGF - Fator de crescimento do nervo.  
NIH 3T3 - Linhagem de células de fibroblastos de camundongos.  
NSILA - Anticorpos anti insulina.  
P0 - Dia pós natal 0 (primeiras 24h após o nascimento).  
P1 - Dia pós natal 1.  
p38 - Proteína cinase da família das MAPK.  
p53 - Proteína supressora de tumor de 53kDa.  
p85 - Subunidade da PI3K.  
PDK1 - Cinase dependente de fosfoinositídeo 1  
PH - Domínio homólogo à pekstrina.  
PI3K - Fosfatidilinositol-3-cinase.  
PIP - Inositol fosfato.  
PIP3 - Fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato.  
PKB - Proteína cinase B.  
PKC - Proteína cinase C.  
PKCδ - Proteína cinase C delta.  
PLC - Fosfolipase C.  
PLCγ - Fosfolipase C gama.  
pRb - proteína supressora de tumor de retinoblastoma.  
Raf - Cinase que ativa a MEK  
Ras - Proteína de um sarcoma de rato  
NA<sub>m</sub> - Ácido ribonucléico mensageiro  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SH3 - Domínio de homologia Src  
SHC - Contém domínio 2 de homólogo à Src  
SN - Sistema nervoso  
SNC - Sistema nervoso central  
SOS - “son of sevenless”

sp1 - Fator de transcrição

SRC - Proteína tirosina cinase citoplasmática

STAT - Transdutores de sinal e ativadores de transcrição de proteínas

T3 - Triiodotiroxina

TCA - Ácido tricloroacético

TGF- $\alpha$  - Fator de Transformação do Crescimento  $\alpha$

TrKB – Receptor tirosina cinase B

TRPM6 - Canais permeáveis ao  $Mg^{++}$

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Modelo de retina de rato neonato (P0-P2).
- Figura 2:** Esquema da retina madura.
- Figura 3:** Estágios do ciclo celular.
- Figura 4:** Estrutura molecular tridimensional da molécula de IGF-I.
- Figura 5:** Proteínas às quais o IGF se liga (IGFBPs).
- Figura 6:** Representação esquemática do receptor de insulina.
- Figura 7:** Estrutura das IGFBPs.
- Figura 8:** Algumas vias de sinalização envolvidas no efeito do IGF.
- Figura 9:** Fotografia de Stanley Cohen.
- Figura 10:** Estrutura do EGF.
- Figura 11:** Representação esquemática divisão em grupos da Família EGF de fatores tróficos e seus respectivos receptores ativados.
- Figura 12:** Representação esquemática das diferentes vias de sinalização ativadas por EGF.
- Figura 13:** Papel do soro fetal bovino (5%) no efeito proliferativo do IGF-I (10ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura por 48h.
- Figura 14:** Efeitos proliferativos não aditivos induzidos por IGF-I (10ng/mL) e EGF (0,1ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura por 24h.
- Figura 15:** Tratamento crônico e simultâneo com IGF-I (10ng/mL) e EGF (0,1ng/mL) não exerce efeito aditivo sobre a proliferação das células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura por 48h.
- Figura 16:** Papel inibitório de IGF-I (10ng/mL) sobre o efeito proliferativo de EGF (0,1ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura por 72h.
- Figura 17:** Pré-tratamento das células da retina de ratos neonatos com EGF (0,1ng/mL) por 24 horas seguido por tratamento com IGF-I (10ng/mL) por mais 24 horas não interfere no efeito proliferativo do IGF-I.
- Figura 18:** Aumento da responsividade das células ao EGF (0,1ng/mL) é verificado quando estas são pré-tratadas com IGF-I (10ng/mL) por 24 horas.

**Figura 19:** Papel não inibitório de IGF-I (10ng/mL) sobre o efeito proliferativo de EGF (0,1ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura de tratamento intercalado de 48h com cada fator.

**Figura 20:** Papel inibitório de IGF-I (10ng/mL) sobre o efeito proliferativo de EGF (0,1ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura de tratamento intercalado de 48h com cada fator.

**Figura 21:** Pré-tratamento das células da retina de ratos neonatos por 24 horas com meio controle não interfere na responsividade ao tratamento com IGF-I (10ng/mL) e EGF (0,1ng/mL).

**Figura 22:** Pré-tratamento das células da retina de ratos neonatos por 48 horas com meio 199 não interfere na responsividade ao tratamento com IGF-I (10ng/mL) e EGF (0,1ng/mL) em cultura de tratamento intercalado de 48h com cada fator.

**Figura 23:** Pré-tratamento das células da retina de ratos neonatos por 72h com IGF-I torna as células bem menos responsivas ao EGF.

**Figura 24:** Efeito do meio condicionado sobre a proliferação de células da retina mantidas por 48h.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Localização do RNAm dos membros da grande família de IGF na retina.

**Tabela 2:** Descrição das IGFBPs, seus efeitos e suas localizações celulares.

**Tabela 3:** Distribuição da IGFBPs em diferentes fluidos biológicos.

**Tabela 4:** Família EGF e seus receptores.

## RESUMO

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e o fator de crescimento epidermal (EGF) desempenham um importante papel durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Dados do nosso laboratório demonstram que em culturas, tanto o EGF como o IGF-I são capazes de aumentar a proliferação de células da retina, sendo o efeito do IGF-I mediado pela ativação dos receptores EGF. O objetivo do presente trabalho é analisar o efeito dos tratamentos simultâneos ou alternados com EGF (0,1ng/mL) e IGF-I (10ng/mL) sobre a proliferação de células da retina. Nossos resultados demonstram que o tratamento com EGF e IGF-I por 24, 48 e 72h não induz um efeito aditivo sobre a proliferação celular. Ao contrário em 72h podemos observar uma inibição do efeito proliferativo do EGF. O pré-tratamento com IGF-I por 48 e 72h induz uma diminuição da responsividade das células ao tratamento com EGF 48 ou 24h. Baseados em nossos resultados podemos concluir que o IGF-I regula a responsividade das células da retina ao efeito proliferativo do EGF de maneira tempo-dependente.

## **ABSTRACT**

Insulin-like growth factor I (IGF-I) and epidermal growth factor (EGF) play an important role during the development of the nervous system. Data from our laboratory show that treatment with EGF (0,1ng/mL) and with IGF-I (10ng/mL) in cultures leads to an increase in retinal cell proliferation. Interestingly the effect of IGF-I is mediated by the activation of EGF receptors. The aim of this work is to study the effect of simultaneous or alternate treatments with both factors on retinal cell proliferation. Our results show that simultaneous treatments with EGF and IGF-I for 24, 48 and 72h did not induce an additive effect on cell proliferation. It is interesting to notice that treatment with both factors for 72h induces a decrease in cell proliferation when compared to the effect of EGF treatment. Exposure the cells to a pre treatment with IGF-I for 48 and 72h induces a decrease in the effect of EGF on cell proliferation. Taken together our results show that IGF-I can modulate the effect of EGF on cell proliferation in a time dependent manner.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A RETINA

Os estudos acerca dos mecanismos envolvidos no processamento da informação no sistema nervoso central têm sido conduzidos por diferentes grupos de pesquisa em diferentes países e por um grande número de anos. Dentre estes diferentes grupos muitos utilizam a retina como modelo experimental. O que torna a retina um bom modelo são determinadas características que facilitam o processo de experimentação e culminam na obtenção de resultados que permitem avançar no conhecimento dos eventos eletroquímicos que medeiam a formação e a funcionalidade do sistema nervoso. Desvendar os mecanismos que norteiam o funcionamento do sistema nervoso tem grande importância acadêmica, pois possibilitará não só o conhecimento, mas também será a base para a compreensão dos processos patológicos e o alicerce para o estabelecimento de estratégias terapêuticas.

A retina é originária do ectoderma neural e apresenta uma organização laminar semelhante às demais regiões do sistema nervoso central. Esta característica faz com que os resultados experimentais obtidos neste tecido possam ser correlacionados a outros, obtidos em outras regiões do sistema nervoso. Assim sendo, a retina é considerada como um bom modelo para se estudar o desenvolvimento e a funcionalidade do sistema nervoso (Dowling, 1991, para revisão).

Macroscopicamente podemos descrever a retina como um tecido delgado e translúcido, de localização periférica fora da caixa craniana. Estas características permitem que este tecido possa ser obtido por dissecação, sem a

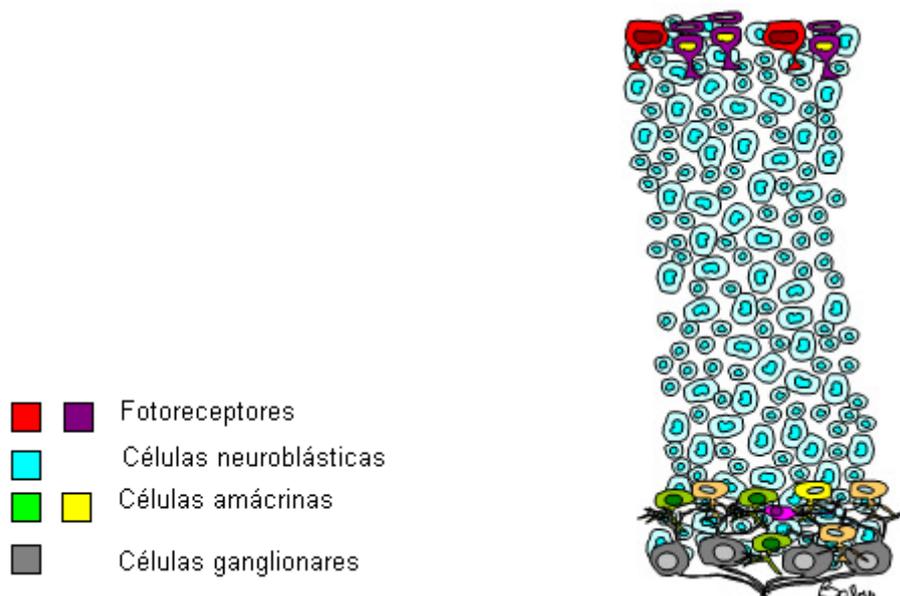
presença de tecido conjuntivo adjacente e sem a presença de outras populações neuronais e gliais. Assim sendo, ao se isolar a retina se tem uma estrutura do sistema nervoso de forma purificada. A população de células retinianas é formada por cinco populações neuronais, um tipo de célula glial (a célula de Müller) e pela microglia (Adler, 1993).

Dados da literatura demonstram que o processo de proliferação e de diferenciação das células da retina é mediado por diferentes fatores tróficos produzidos ao longo do desenvolvimento deste tecido. Ao estudarmos a retina de ratos neonatos observamos que nela ainda está ocorrendo uma importante neurogênese (Figura 1). Imediatamente após o nascimento apenas os precursores das células ganglionares, dos cones, das células horizontais e de algumas células amácrinas já saíram do ciclo proliferativo (Cepko, 1993).

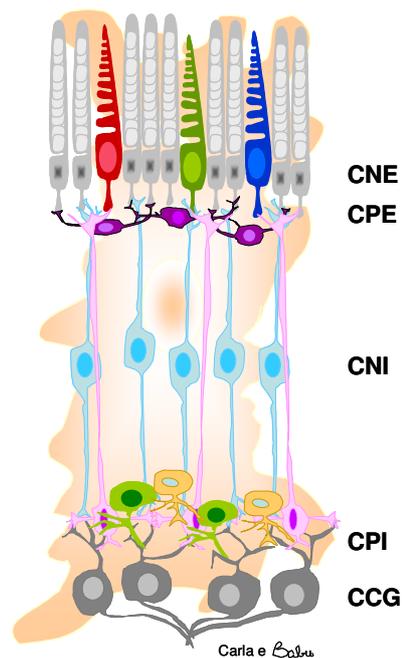
Concluído o período de desenvolvimento a retina apresenta camadas de corpos celulares (camadas nucleares) e camadas plexiformes nas quais ocorre um maior processamento sináptico (Figura 2). Assim, em um tecido maduro, torna-se possível a identificação das seguintes camadas celulares (Dowling, 1991; Cepko & Dyer, 2001):

- **Camada nuclear externa (CNE)**, onde são encontrados os corpos celulares de fotorreceptores, os quais se dividem em dois subtipos: os cones, sensíveis à exposição da luz intensa e responsáveis pela visão escotópica e os bastonetes que são responsáveis pela visão fotópica;
- **Camada plexiforme externa (CPE)**, na qual os prolongamentos de fotorreceptores, células bipolares e horizontais fazem contatos sinápticos entre si;

- **Camada nuclear interna (CNI)**, onde estão localizados corpos celulares de células bipolares, horizontais, amácrinas e de células ganglionares deslocadas;
- **Camada plexiforme interna (CPI)**, onde se encontram os prolongamentos de células bipolares, amácrinas e ganglionares e onde ocorrem as sinapses entre elas;
- **Camada de células ganglionares (CCG)**, nela se encontram os corpos de células amácrinas deslocadas e células ganglionares. Os axônios pertencentes às células ganglionares constituem o nervo óptico, sendo responsáveis assim pela chegada da informação visual a outras regiões do SNC.



**Figura 1:** Modelo de retina de rato neonato entre os dias pós-natais (P0-P2). Observamos a camada de células ganglionares, amácrinas, fotoreceptores e uma grande quantidade de células neuroblásticas. Esquema cedido por Gustavo de Rezende Corrêa.



**Figura 2:** Esquema da retina madura. Estão representados os diferentes tipos celulares, assim como as camadas celulares e sinápticas da retina neural (CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares. Gentilmente cedido por Gustavo de Rezende Corrêa e Carla Valéria Vieira Guillarducci-Ferraz.

O destino das diferentes populações de células da retina de vertebrados é regulado por uma seqüência de eventos que se mantêm conservados ao longo da evolução. A identificação dos muitos genes responsáveis pela regulação destes eventos tem demonstrado que existe uma interação entre fatores de transcrição, macromoléculas regulatórias do ciclo celular e moléculas sinalizadoras para que o desenvolvimento possa ocorrer (Andreazzoli, 2009). Os estudos sobre a gênese das populações celulares em retinas de ratos demonstram que as células ganglionares são as primeiras cujos progenitores saem do ciclo celular (E14 e E20) (Reese e Colello, 1992). As células amácrinas são geradas entre E14 e P0. Os fotoreceptores do tipo cones são gerados entre E15 e P0, as células horizontais são geradas entre E16 e E18 e em seguida, surgem as células bipolares e os bastonetes (outro

tipo de fotorreceptor) entre E20 e P13. Já as células de Müller, são geradas entre E20 e P13 (Cepko, 1993).

As células de Müller são capazes de produzir fatores de crescimento, de expressar um grande número de receptores para neurotransmissores e também para moléculas tróficas, sugerindo em alguns casos e confirmando em outros a participação das células gliais no desenvolvimento do tecido retiniano (Ikeda e Puro, 1995). Dados importantes demonstram que interações neurônio-glia são extremamente importantes nos processos relacionados com a regeneração do tecido nervoso, com a modulação sináptica, plasticidade sináptica, e com a manutenção de concentrações extracelulares de potássio e neurotransmissores, evidenciando seu papel na homeostase cerebral (Vernadakis, 1996).

No tecido retiniano são encontradas substâncias neuroativas e estudos farmacológicos têm demonstrado que basicamente todos os neurotransmissores e neuromoduladores encontrados no cérebro também estão presentes neste tecido (Pourcho, 1996 para revisão).

Dados da literatura mostram que a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células neuronais e gliais são mediadas por vários eventos tais como a atividade elétrica e a produção de moléculas tróficas. O mecanismo de interação entre moléculas neurotransmissoras e seus receptores específicos origina de maneira direta ou indireta atividade elétrica, essencial para uma formação harmônica do SN nos estágios iniciais de desenvolvimento. Trabalhos têm demonstrado que a síntese de moléculas tróficas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento do nervo (NGF) é regulada pela atividade neuronal (Berzaghi et al., 1993).

## 1.2 Ciclo Celular e a Proliferação Celular

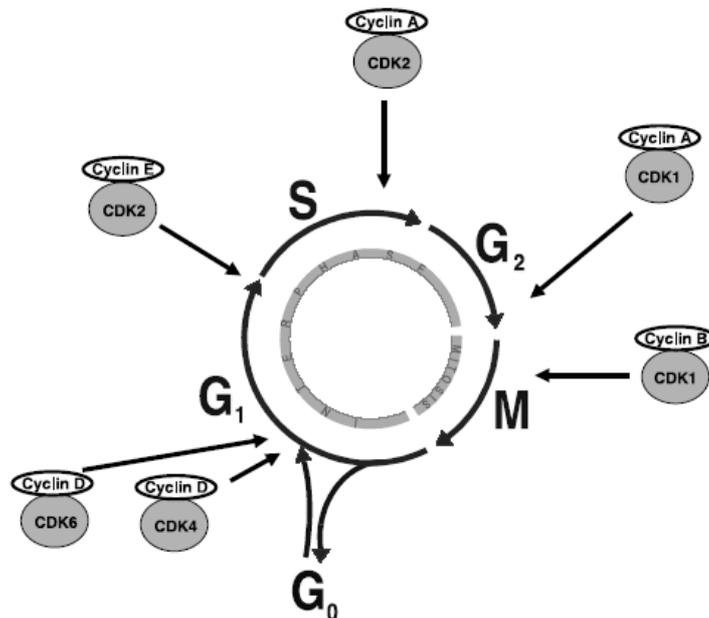
O processo de proliferação celular está baseado, de uma forma geral, na capacidade de uma célula gerar duas células independentes, cada uma com carga genética idêntica à da sua célula irmã. Este processo envolve uma grande quantidade de moléculas estimuladoras, inibidoras e reguladoras do ciclo celular que pode ser dividido em dois períodos distintos: intérfase e mitose. Abaixo faremos um breve descritivo de cada uma destas fases.

**Intérfase:** fase em que ocorre o crescimento celular. As células estão sintetizando os componentes que irão constituir as células filhas. Esta fase se subdivide em três:

- **G1:** período entre o final da mitose e o início da fase S.
- **Fase S:** fase onde ocorre a replicação do DNA (ácido desoxirribonucléico). Sinais citoplasmáticos são enviados ao núcleo induzindo-o a iniciar a replicação. Ressalta-se que é nesta fase que as células podem ser marcadas com [<sup>3</sup>H]timidina, um nucleotídeo derivado da timina, utilizado para avaliar a proliferação celular.
- **G2:** período entre o fim da fase S e o início da mitose. A célula que completa a fase S e entra na G2 condensa seus cromossomos e segue para mitose. Este é um período de preparação para a produção de fatores cruciais que disparam a mitose.

**Fase M (mitose):** fase onde ocorre a divisão celular.

As fases G1 e G2 conferem tempo adicional para o crescimento. No decorrer da fase G1, a célula verifica se as condições ambientais são adequadas para começar o processo de divisão celular. Se a sinalização é favorável inicia-se o ciclo celular, porém se as condições são desfavoráveis para a entrada no ciclo, a célula entra em um período de quiescência denominado G0, no qual ela pode permanecer por um longo tempo. Se estas condições ambientais voltarem a ser favoráveis, a célula pode sair dessa fase G0 e iniciar seu ciclo de divisão. Na fase G2, a célula analisa se a fase S foi realizada de forma correta e decide se será iniciada a mitose, ou se espera para que sejam realizados reparos necessários ao DNA devido a erros ocorridos durante a fase S (Figura 3) (Vermeulen et al., 2003).



**Figura 3:** Estágios do ciclo celular. Os locais da atividade regulatória dos complexos CDK/ciclina estão indicados pelas setas. Retirado de Vermeulen et al., 2003.

Ciclina são proteínas regulatórias importantes para que ocorra a transição da fase G0 para a S dentre outras (Morgan, 1995). O nível de expressão das ciclina é regulado nas várias fases do ciclo. As ciclina D são

sintetizadas durante a fase G1, e sua inibição previne a entrada da célula na fase S (Resnitzky et al., 1994). A ciclina E é sintetizada em G1 mais tardiamente e está ativa de forma máxima na transição de G1-S (Dulic et al., 1992), enquanto a ciclina A é expressa durante a fase S (Pagano et al., 1992).

A sinalização mediada pelas ciclinas depende da ligação destas proteínas às cinases dependentes de ciclinas (Cdk), que exercem um papel fundamental para a entrada da célula no ciclo, síntese de DNA e regulação da mitose. Assim, as ciclinas regulam a atividade da Cdk, e esta regulação é essencial para a progressão do ciclo. A ciclina D liga-se à Cdk4 e Cdk6, enquanto a ciclina E e A ligam-se à Cdk2 (Morgan, 1995).

A proteína supressora de tumor de retinoblastoma (pRb) é um regulador negativo da proliferação celular. Essa ação inibitória da pRb depende de sua capacidade de se ligar às outras proteínas e formar complexos com elas. Ciclinas tipo D, quando ligadas a Cdk4 e/ou Cdk6, são responsáveis pela fosforilação e inativação funcional da Rb, um evento que ocorre no meio da fase G1 (Weinberg, 1995).

É importante salientar que além do papel das ciclinas e suas subunidades catalíticas (Cdk) na progressão do ciclo celular, existem ainda os pontos de verificação ("check points") da correção do processo. Existem proteínas denominadas de ciclinas inibidoras de cinases (CKI) que fazem uma regulação negativa do ciclo celular (Peter e Herskowitz, 1994). Esses inibidores podem ligar Cdks e inibir sua atividade. Existem 2 famílias de CKI que incluem: família da p16<sup>INK4a</sup> e família p21 (Cip1, Waf1, Adil1, Cap20) incluindo p27<sup>kip1</sup> e p57<sup>kip1</sup>. Todas as CKI são capazes de inibir o complexo ciclina D-Cdk4, enquanto apenas a p21 e p27 inibem o complexo ciclina E-Cdk4 (Dulic et al.,

1992). Quando há supressão de p16, p21 ou p27, várias células param o crescimento (Toyoshima e Hunter, 1994).

A proliferação celular que é induzida por fatores de crescimento ou citocinas pode ocorrer apenas na presença de diferentes sinais de sobrevivência. Células que recebem o sinal proliferativo na ausência de sinal de sobrevivência não proliferam, ao contrário, morrem por um processo denominado de apoptose (Birchenkamp e Coffey, 2003, para revisão), que se caracteriza por alterações morfológicas distintas da morte por necrose que incluem: perda de volume celular e condensação da cromatina (Kerr et al., 1972). Assim, a apoptose age como um importante mecanismo para eliminação de células que sofreram mutações durante o ciclo celular e que podem resultar em uma proliferação celular descontrolada (Birchenkamp e Coffey, 2003, para revisão).

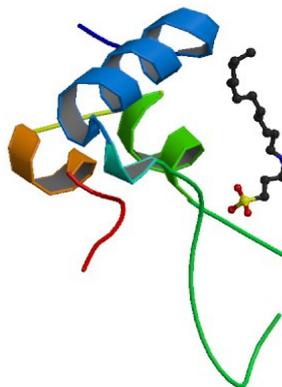
### **1.3 Fator de Crescimento semelhante à Insulina (IGF)**

O IGF foi o segundo fator trófico a ser descoberto e este fato aconteceu em 1957. Todavia, antes de se chamar IGF recebeu várias denominações, relacionadas ao seu efeito biológico, como poderemos ver no texto abaixo.

Salmon e Daughaday descobriram, no soro, um fator que era capaz de mediar o efeito do hormônio somatotrófico (GH) tanto no processo de sulfatação da cartilagem como no processo de crescimento longitudinal do osso, por este motivo o fator foi chamado de fator de sulfatação e este estudo ocorreu justamente em 1957 (citado em: Kermer et al., 2000; Russo et al., 2005, para revisão). Algum tempo depois, Dulak e Termin em 1973 analisando os fatores de crescimento presentes no soro, identificaram um

que apresentava atividade estimulatória múltipla. Como já se conheciam os efeitos múltiplos da insulina e este hormônio está presente no soro, acreditaram que o fator por eles identificado fosse a insulina. Contudo, o efeito deste fator ou fatores não era inibido pelos anticorpos anti-insulina, indicando tratar-se de outra molécula. Nesta altura este fator fora denominado de fator cuja atividade não era inibida pelos anticorpos anti-insulina (NSILA I e II). Logo a seguir, os NSILA foram renomeados e chamados de somatomedinas. Com o avanço das pesquisas, demonstrou-se uma semelhança estrutural entre a cadeia  $\beta$  desse fator e a da insulina e então ele passou a receber a denominação de fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) (Russo et al., 2005, para revisão).

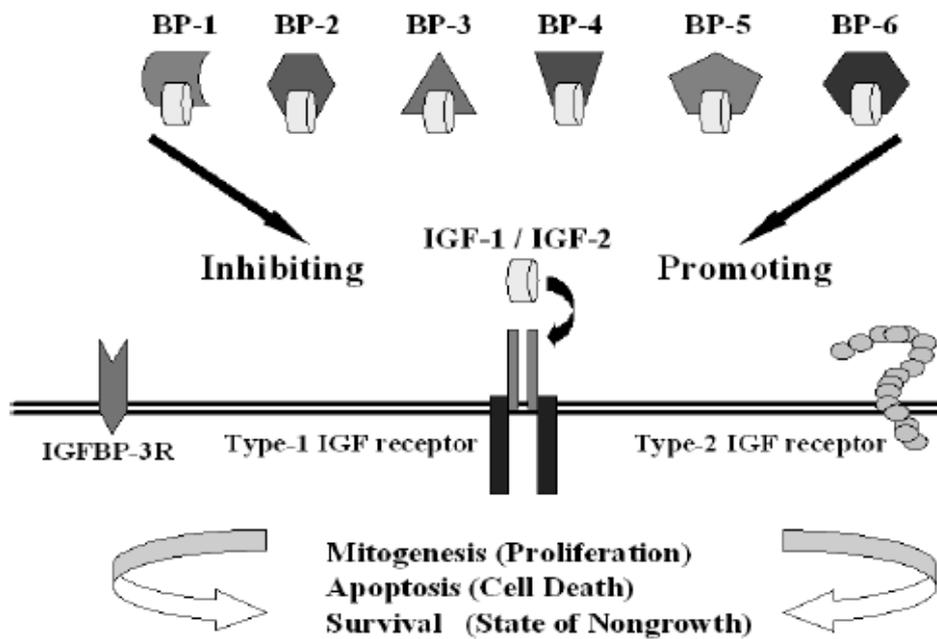
A caracterização bioquímica das moléculas de IGF-I e de IGF-II foi apresentada em 1978. O IGF-I é formado por uma cadeia polipeptídica constituída por 70 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 7,5 kDa (Figura 4) e a cadeia de aminoácidos de IGF-II se assemelha à do IGF-I em 45 aminoácidos dos 73 presentes (Rinderknecht e Humbel, 1978).



**Figura 4:** Estrutura molecular tridimensional da molécula de IGF-I apresentando as regiões em alfa hélice nas cores azul-marrom-verde e as regiões beta pregueadas sendo representadas pelas cores vermelho-verde.  
Obtido do site: [http:// www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1RMJ](http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1RMJ) em 29.11.09

A síntese do IGF foi encontrada inicialmente nos hepatócitos e também foi observado que o hormônio somatotrófico desempenha um papel muito importante neste processo (Russo et al., 2005, para revisão). A maior parte do IGF-I que se encontra na circulação é proveniente do fígado, porém este fator não está diretamente relacionado com o crescimento do corpo, sendo esta função mediada pelo hormônio do crescimento (GH). Entretanto, o IGF-I desempenha um papel muito importante para a função neuronal. Animais que apresentam deficiência em IGF-I exibem complicações neurológicas múltiplas (Carro and Torres-Aleman, 2006).

O fator trófico IGF-I apresenta uma característica muito peculiar no seu mecanismo de sinalização, pois além de existirem os receptores também estão presentes proteínas que se ligam a esta molécula e desempenham um papel regulatório. Desta maneira podemos dizer que a sinalização depende de um conjunto de moléculas que participam deste processo. São elas: os dois fatores (IGF-I e II), seis proteínas às quais o IGF se liga e que portanto desempenham papel regulatório (IGFBPs) e dois tipos de receptores (Chesik, 2004; Pavelić et al., 2007). Na figura 5 temos uma representação esquemática destas diferentes macromoléculas e as respostas celulares induzidas pela ativação dos receptores.



**Figura 5:** Proteínas às quais o IGF se liga (IGFBPs) e eventos modulados por este fator trófico compreendem o sistema de ligação do IGF-I. Chesik, 2004; dissertations.ub.rug.nl/faculties/medicine.

O ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para o IGF-I, o IGF-II e para as IGFBPs 2, 4 e 5 é expresso em regiões distintas do Sistema Nervoso Central. No cerebelo, no bulbo olfatório, no tálamo, no hipocampo e na retina o RNAm para o IGF-II é detectado no início do desenvolvimento e o RNAm para IGF-I, aparece em períodos mais tardios (De Pablo and De La Rosa, 1995).

O RNAm para IGF-I foi detectado em ratos, no primeiro dia de nascimento, nas células de Purkinje e em outros elementos celulares no córtex cerebral. Uma observação interessante diz respeito à observação de que a expressão do IGF-I está associada a elementos neuronais, a expressão do IGF-II a elementos não neuronais e os IGFBPs a elementos mesenquimais, neuronais e a células gliais (De Pablo and De La Rosa, 1995).

Um estudo publicado em 1996, realizado com ratos da linhagem sprague-dawley entre 12 a 14 semanas, demonstrou a localização do

RNA<sub>m</sub> para o IGF-I, para o receptor de IGF tipo I e para proteínas de ligação ao IGF em retinas de ratos (Burren et al., 1996). O quadro abaixo sintetiza os resultados obtidos pelos pesquisadores.

RETINA	IGFI	IGFRI	IGFBP1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBP6
<b>Camada de células ganglionares</b>	+	++	-	-	-	-	+	+
<b>Camada nuclear interna</b>	-	++	-	-	-	-	++	+
<b>Camada nuclear externa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Membrana limitante externa</b>	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Epitélio pigmentar retiniano</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Células Endoteliais</b>	-	-	-	-	-	-	+	-

**Tabela 1:** Localização do RNA<sub>m</sub> dos membros da grande família de IGF na retina (Burren et al., 1996).

Popken e colaboradores, em trabalho realizado em 2005, mostraram que o IGF-I é amplamente expresso no SNC, de maneira tempo dependente e coincidente com o desenvolvimento neuronal. Em camundongos, foi demonstrado que o pico de expressão do IGF-I ocorre entre os dias embrionários E-11 e E-17, período este em que ocorre a proliferação dos progenitores neuronais (Chrysis, et al., 2001). Um dado interessante acerca do IGF-I, obtido na região cortical de camundongos, é a sua capacidade de encurtar o ciclo celular durante a fase G1 e aumentar o número de células que entram novamente no ciclo (Hodge et al., 2004).

O IGF-I desempenha diferentes funções tais como estimular a proliferação de células progenitoras neurais e favorecer tanto a sobrevivência neuronal como a dos oligodendrócitos. Igualmente o IGF-I é capaz de regular a diferenciação neuronal no aspecto do crescimento de neuritos e sinaptogênese (Pfenninger, et al., 2003; O`Kusky, et al., 2003).

Dados da literatura demonstram que astrócitos sintetizam IGF-I e IGF-II e este fator exerce um importante efeito mitótico sobre estas células. Igualmente foi demonstrado que os astrócitos são capazes de sintetizar IGF-BPs e têm o seu crescimento relacionado à ligação do IGF-I a estas proteínas (Rotwein et al., 1988; Han et al., 1987).

O IGF-I desempenha uma importante função na maturação dos oligodendrócitos. Células progenitoras de oligodendrócitos respondem ao IGF-I e a presença deste fator induz um aumento de sobrevivência, um aumento na diferenciação e um aumento na produção de mielina (Mc`Morris et al., 1993; Ye and D`ercole, 1999).

Em 1995, Beck e colaboradores publicaram um estudo realizado em camundongos knockout para IGF-I onde foi possível constatar uma redução marcante na população da região do estriato. Esses resultados estão de acordo com evidências experimentais que mostram o papel trófico do IGF-I em neurônios estriatais (Arsenijevic and Weiss, 1998; Shimazaki et al., 1999). Em contrapartida, camundongos que apresentam um aumento na expressão de IGF-I apresentam um aumento na sobrevivência neuronal em regiões do córtex e do cerebelo (Ye et al., 1996; Chrysis, et al., 2001).

De acordo com estudo publicado por Cheng e colaboradores em 2003, os efeitos da ausência de IGF-I sobre o sistema nervoso são extremamente

graves. Camundongos que não expressam IGF-I apresentam uma diminuição no comprimento dos dendríticos e alterações tanto no crescimento axonal como na arborização dendrítica (Cediel et al., 2006). Mutações que levam à perda da expressão do receptor de IGF-I induzem o aparecimento de microencefalia e retardo mental em cérebros de humanos (Abuzzahab et al., 2003).

### **1.3.1 Receptor do IGF**

Para exercer seu papel tanto o IGF-I como o IGF-II necessitam de receptores e hoje são conhecidos dois receptores para estes fatores; o tipo I e o tipo II. Cabe ressaltar que a expressão de receptores de IGF está presente ao longo da evolução, estando presente de invertebrados a mamíferos (Pavelić et al., 2007; Russo et al., 2005; Le Roith, 2003).

O receptor do tipo I é o único da família dos receptores catalíticos e apresenta grande homologia com o receptor de insulina. Tanto o receptor do tipo I quanto o de insulina são compostos por duas cadeias  $\alpha$  extracelulares com domínios ricos em cisteína, região onde ocorrem as ligações específicas. Apresentam também duas cadeias  $\beta$  citoplasmáticas com resíduos com atividade tirosina cinase (Chesik, et al., 2007). O gene para o receptor do tipo I é expresso de forma constitutiva, em vários tecidos, mas também pode ser regulado tanto *in vivo* quanto *in vitro* por fatores de transcrição tais como sp1 e p53 (Russo et al., 2005, para revisão).

O receptor do tipo II para IGF apresenta semelhança ao receptor de manose 6 fosfato independente de cátion (Jones and Clemmons, 1995; Russo et al., 2005, para revisão). Sua estrutura apresenta uma cadeia polipeptídica com um pequeno domínio citoplasmático, sem atividade tirosina cinase. Esses

receptores estão envolvidos com funções tais como o tráfego de enzimas lisossomais, a endocitose e a degradação lisossomal de ligantes extracelulares, regulação dos efeitos apoptóticos/ mitogênicos e possível transdução de sinalização intracelular (Russo et al., 2005).

Os respostas celulares ativadas tanto pelo IGF-I como pelo IGF-II, que melhor se conhecem, ocorrem através da ativação do receptor do tipo I, que é uma glicoproteína de membrana. Após ocorrer a ligação do IGF a este receptor, tirosinas cinases presentes na porção intracelular do receptor são ativadas e a partir deste momento cascatas de sinalização são estimuladas. Podemos destacar os IRS1-IRS4 (substratos para receptor de insulina) que culminam na ativação da via da PI-3 (fosfato-3-inositol) e das MAP cinases (proteínas cinases ativadoras de mitose). (Russo et al., 2005).

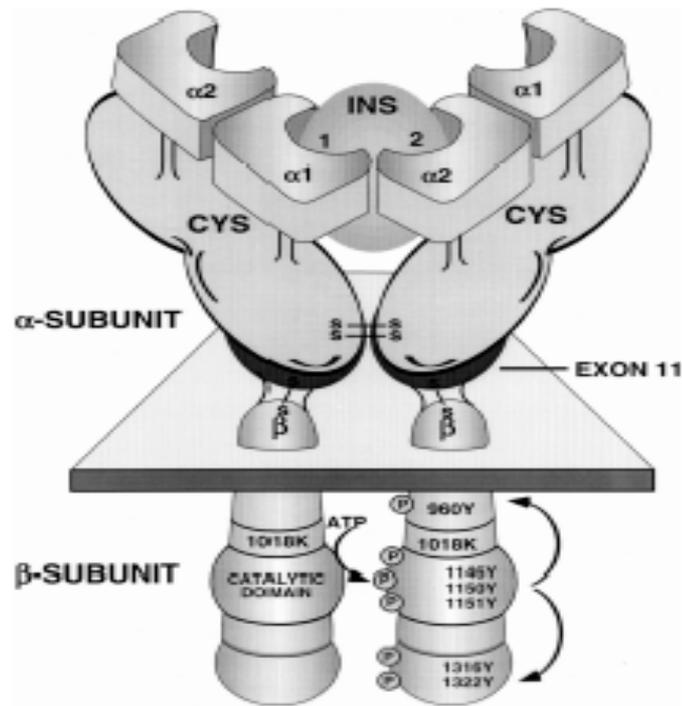
Obberghen e colaboradores em 2001 compararam os receptores para insulina e o receptor do tipo I para o IGF e observaram haver poucas diferenças estruturais entre eles (figura 6). Essas diferenças encontradas são as seguintes:

- os receptores de insulina possuem 3 resíduos de tirosina localizados nas posições Y1146; Y1150 e Y1151 e nos receptores tipo I as tirosinas estão em Y1131; Y1135 e Y1136.

- a tirosina Y960 existente no receptor de insulina e a Y950 no receptor de IGF-I localiza-se na região justa-membranar e uma vez fosforilada essa tirosina compõe uma região de reconhecimento para vários substratos desses receptores.

- o receptor de insulina em seu terminal carboxila apresenta dois sítios de autofosforilação, Y1322 e Y1316 enquanto o receptor de IGF-I apresenta

apenas o Y1316. A funcionalidade desta tirosina no terminal carboxi não é clara, mas parece estar envolvida com algumas diferenças na sinalização mediada pela insulina ou pelo IGF-1 (Obberghen et al., 2001).



Y1131; Y1135; Y1136  
(resíduos tirosina do receptor de IGF)

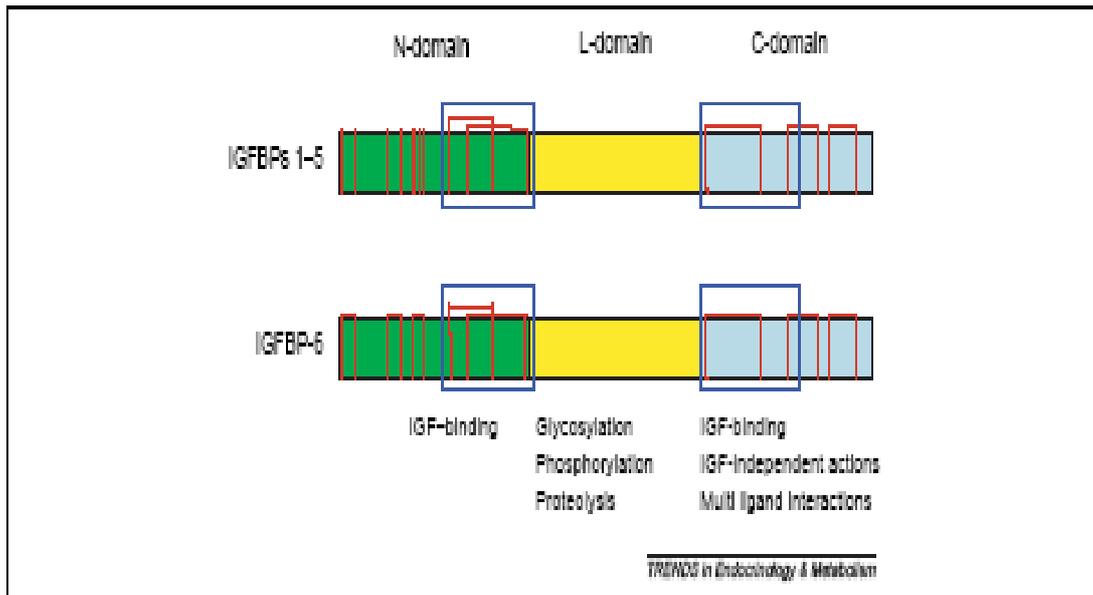
**Figura 6:** Representação esquemática do receptor de insulina. São feitas comparações entre os resíduos de tirosina fosforilados no receptor de insulina e no receptor IGF-I (Obberghen et al., 2001).

Em 1985 os receptores de insulina, de IGF-I e de IGF-II foram identificados no SNC de mamíferos por Gammetoft e seus colaboradores. Os receptores de IGF e insulina são mais abundantes, de quatro a dez vezes, no cérebro de fetos de ratos do que nos animais adultos demonstrando a importância destes fatores para o desenvolvimento do SNC. A expressão deles é alta em regiões que apresentam os corpos celulares das células nervosas e baixa nas regiões da substância branca (de Pablo, F. and de la Rosa, J., 1995).

### **1.3.2 Proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs)**

Uma característica importante das vias de sinalização do IGF constitui-se na presença das proteínas de ligação deste fator trófico, denominadas de IGFBPs. Tanto as moléculas de IGF como as IGFBPs estão presentes tanto na circulação como no espaço extracelular e desta forma a sinalização estará na dependência destas interações que poderão ser tanto inibitórias como estimulatórias (Jones and Clemmons, 1995).

As IGFBPs são macromoléculas protéicas secretadas que apresentam uma homologia seqüencial de 80%, sendo que a seletividade de ligação com o IGF1 ou IGF2 varia de uma proteína para outra (Rajaram et. al., 1997). A estrutura polipeptídica das IGFBPs apresenta dois domínios altamente conservados, o C e o N e um domínio variável central, o L (Figura 7). O domínio N é composto por 12 cisteínas e contém o principal sítio de ligação para o IGF, o domínio C apresenta 6 cisteínas e o domínio L contém sítios para a regulação pós-translacional como a glicosilação, fosforilação e proteólise (Duan and Xu, 2005).



**Figura 7:** Estrutura das IGFbps, destacando-se os três domínios N, L e C (Bach et al., 2005).

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

A função modulatória das IGFbps pode ser facilmente visualizada ao analisarmos a tabela abaixo:

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

**Tabela 2:** Descrição das IGFBPs, seus efeitos e suas localizações celulares (Rajaram et. al., 1997).

É importante assinalar que os níveis de IGFBPs são regulados durante várias condições fisiológicas e patológicas. Já foi demonstrado que os exercícios, cirurgias, a gravidez e o envelhecimento podem regular a expressão das IGFBPs. Entre as condições patológicas que envolvem a regulação de algumas IGFBPs podemos destacar as seguintes: diabetes, tumores, deficiência de receptores GH, acromegalia, osteoporose, falência renal entre outras (Rajaram et. al., 1997). Na tabela abaixo podemos observar a

distribuição das principais IGFBPs nos fluídos biológicos (Rajaram et. al., 1997).

<b>Fluido</b>	<b>Principal(is) IGFBPs</b>
<b>Soro</b>	IGBPB-3
<b>Fluído Amniótico</b>	IGBPB-1
<b>Fluído Folicular</b>	IGBPB-3
<b>Fluido Cérebrospinal (CSF)</b>	IGBPB-2, IGBP-6

**Tabela 3:** Distribuição das IGFBPs em diferentes fluidos biológicos (Rajaram et. al., 1997).

### 1.3.3 Sinalização Química

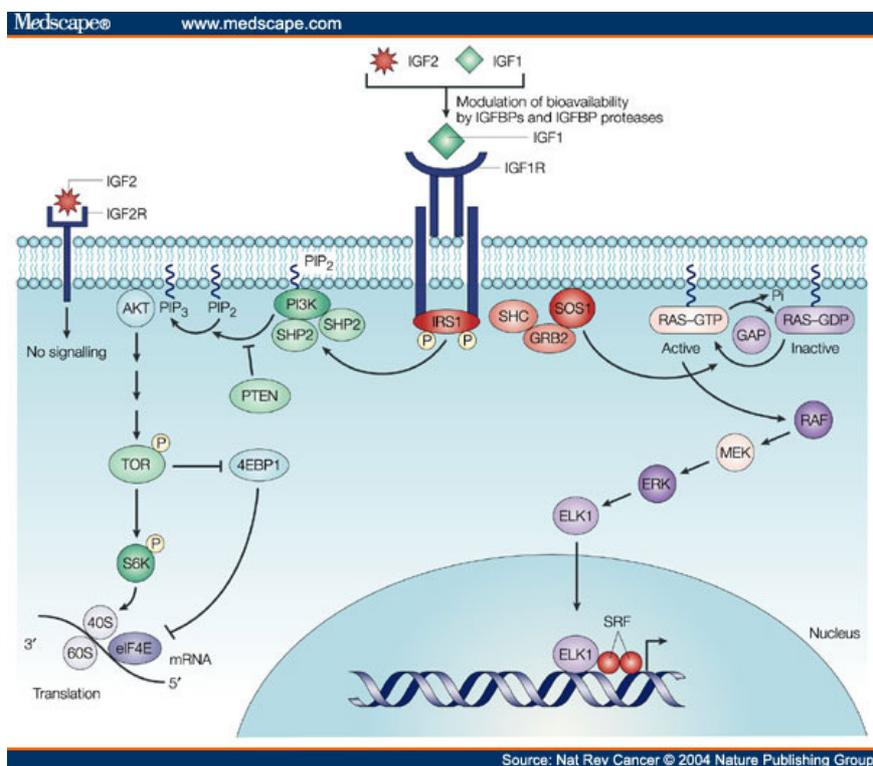
As duas principais vias envolvidas na sinalização através dos receptores de insulina e IGF-I, como descrito na figura 8, envolvem a fosforilação do substrato IRS e/ou Shc. Através de uma proteína adaptadora, Grb2 ocorre o recrutamento da SOS formando um complexo IRS-1-Grb2-SOS que ativa a Ras. Neste momento ocorre a estimulação da Raf (proteína cinase ativadora da MEK) que resulta na fosforilação e ativação das ERKs (cinases reguladas por sinais extracelulares) (Bateman and Neill, 2006; Jones and Clemmons, 1995).

O receptor tipo I de IGF, assim como o tipo II, estão envolvidos também na ativação da via da PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase), que pode ser estimulada pela IRS-1 fosforilada. Ressalta-se que esta via, em muitos casos, está relacionada ao crescimento celular. Um outro evento observado com a autofosforilação do receptor de IGF do tipo 1 é a associação direta com a subunidade p85 da PI3K (Jones and Clemmons, 1995).

Células hematopoiéticas de murinos D32, ao serem estudadas, mostram que a retirada da IL-3 leva essas células rapidamente à apoptose, porém se

estas células forem tratadas com IGF-I, a apoptose é inibida através da fosforilação induzida, via PI3 cinase, da proteína proapoptótica Bad (Kurmasheva and Houghton, 2006).

Os efeitos antiapoptóticos do IGF-I são, em muitos sistemas, mediados pela proteína IRS-1 e estudos realizados em camundongos knockout para esta proteína corroboram estes dados (Kurmasheva and Houghton, 2006). A sinalização do IGF-I, em células tumorais de fígado que super expressam IRS-1, leva à ativação das vias da PI3K e da ERK1/2 o que confere uma grande resistência à apoptose nestas células (Kurmasheva and Houghton, 2006).



**Figura 8:** Algumas vias de sinalização envolvidas no efeito do IGF. Obtido do site: <http://www.medscape.com/content/2004004832483288art-nrc483288.fig2.jpg> em 29.11.09.

Células NIH 3T3 (linhagem de células de fibroblastos de camundongos) quando tratadas com IGF-I ou com insulina, apresentam um aumento na expressão de seus respectivos receptores e um concomitante aumento na

fosforilação da IRS-1 (Giorgetti et al., 1993). Nessas mesmas células, mutações no sítio de ligação de ATP (adenosina trifosfato) do receptor de IGF-I previne a autofosforilação dos receptores, o aumento na incorporação de timidina, a ativação da PI3 cinase, a incorporação de 2 deoxiglicose e a expressão da ornitina descarboxilase. A mutação nos três principais sítios de autofosforilação do receptor bloqueia toda a cascata de sinalização induzida pelo IGF-I (Jones and Clemmons, 1995).

Em um modelo de axotomia in vivo foi demonstrado que o IGF-I, injetado no vítreo, é capaz de resgatar células ganglionares da retina do processo de apoptose; sendo este efeito mediado pela ativação da via da PI-3 cinase e da inibição da ativação da via da caspase 3 (Kermer et al., 2000).

Em 2001, Dalle e colaboradores mostraram que o tratamento com IGF-I é capaz de estimular a síntese de DNA efeito este mediado pela ativação da proteína G. Eles mostraram que o receptor de IGF-I se associa com G $\alpha$ i liberando assim a subunidade G $\beta\gamma$ , sendo que esse acoplamento do receptor de IGF com a proteína G é essencial para a sinalização mitogênica desse fator. Estes autores igualmente demonstraram que os receptores de insulina e de IGF apresentam diferenças no acoplamento à proteína G. Essas diferenças poderiam explicar parcialmente as diferenças potenciais entre esses dois receptores com relação à sinalização mitogênica versus a resposta metabólica (Dalle et al., 2001).

Em culturas primárias de neurônios de camundongo, o aumento intracelular de cálcio, induzido pela ativação da via glutamatérgica, é inibido tanto pelo tratamento com IGF-I como pelo tratamento com BDNF. Ao analisar as vias de sinalização envolvidas neste efeito, os autores constataram que a

exposição aguda ao BDNF é capaz de ativar a via da MAPK/ERK. A potencialização deste efeito ocorre de forma significativa quando os neurônios são pré-tratados com IGF-I sendo que o tratamento apenas com o IGF-I não é capaz de ativar a via da ERK. Esses resultados demonstram que o IGF-I leva a uma potencialização da resposta ao BDNF. Neste mesmo trabalho os autores demonstraram que o tratamento com IGF-I induz um aumento na expressão de receptores TrkB nas primeiras 24h de tratamento, o que justificaria os resultados observados (McCusker et al., 2006).

#### **1.4 Fator de Crescimento Epidermal (EGF)**

O fator de crescimento epidermal (EGF) foi o terceiro fator trófico a ser descoberto. Em 1959, Stanley Cohen observou que ao injetar extratos de glândulas salivares de murinos, tanto em cérebro de camundongos como em cérebro de ratos recém nascidos, ocorria a abertura precoce dos olhos e erupção antecipada dos dentes incisivos. Cohen ainda constatou que isto ocorria de forma dose dependente, pois cada vez que se dobrava a concentração do extrato injetado, mais rapidamente ocorria a abertura dos olhos. Os avanços das pesquisas permitiram que Cohen isolasse esta molécula a partir das glândulas salivares e verificasse também que sua atividade estava relacionada ao crescimento e à queratinização da epiderme, nomeando-a assim de Fator de Crescimento Epidermal (Cohen, 2004 para revisão).



**Figura 9:** Fotografia de Stanley Cohen, responsável pela descoberta do EGF.  
Obtido do site: <http://nobelprize.org> em 29.11.09.

A exemplo de outros fatores, o EGF é sintetizado primeiramente em uma forma precursora, caracterizada como uma glicoproteína transmembranar com 1217 aminoácidos e peso molecular de 140 a 150 kDa. Após o processo de clivagem a forma madura é liberada, se liga ao receptor e ativa diferentes vias de sinalização que serão descritas posteriormente (Wong and Guillaud, 2004, para revisão). A proteína EGF, na sua forma madura, apresenta uma estrutura polipeptídica constituída de 53 resíduos de aminoácidos, dos quais 6 são resíduos de cisteína altamente conservados e que estabelecem pontes de cistina. Essas pontes conferem estabilidade à molécula sendo responsáveis pela sua atividade biológica (figura 10).



**Figura 10:** Estrutura do EGF apresentando as 3 pontes dissulfeto (linhas verdes), ligando os 6 resíduos cisteína.  
Obtido do site: <http://www.kent.ac.uk> em 29.11.09.

O EGF pertence a uma família de fatores de crescimento com semelhança estrutural entre si, denominada família EGF. Além do EGF, compõem esta família o Fator de Transformação do Crescimento  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), a Anfirregulina (AR, conhecido também como fator de crescimento derivado de Schwannoma), o EGF ligado à Heparina (HB-EGF), a Betacelulina (BTC), a Epirregulina (EPR) e a Heregulina ou Neuregulina (também conhecida como fator de diferenciação Neu). Todas estas moléculas contém uma estrutura que conserva 3 alças ligadas por pontes dissulfeto. Esta região apresenta uma seqüência de aproximadamente 50 aminoácidos, com homologia de 26-50%, conhecida como domínio comum entre os diferentes membros da família EGF (Rowinsky, 2004, para revisão e Chen et al., 2007).

Todos os membros da família EGF são sintetizados inicialmente na forma de precursores, como uma proteína transmembranar e sofrem a ação de proteases, sendo clivados em seus ectodomínios e liberados de forma solúvel (madura) (Xian and Zhou 2004, para revisão; Rowinsky 2004, para revisão e Chen et al., 2007). O mecanismo de clivagem de membros da família EGF, na superfície celular, possivelmente ocorre através da ação de membros da família de desintegrinas e metaloproteases (ADAMs) (Hsieh and Conti 2005, para revisão), pois além de ativarem as metaloproteinases (que clivam o proEGF) também são capazes de diretamente estimular a liberação destes fatores. Quando liberados na superfície celular, estes fatores têm a capacidade de ativar a própria célula (mecanismo de sinalização autócrina), ou células adjacentes (sinalização parácrina) (Stirnweiss et al., 2006).

### 1.4.1 Efeitos Gerais do EGF

O EGF é uma molécula ubíqua capaz de estimular proliferação e diferenciação em vários tecidos tanto de origem mesodérmica quanto ectodérmica. A falta do EGF induz o aparecimento de anomalias em vários órgãos confirmando a sua ação em diferentes sistemas (Henson e Gibson, 2006 para revisão).

O EGF pode ser sintetizado em vários tipos celulares incluindo: fibroblastos, células do endotélio vascular, células epiteliais, etc. Esta molécula está presente em vários fluidos corporais como sangue, urina e saliva. Efeitos estimulatórios e inibitórios na proliferação celular são atribuídos ao EGF. Além disso, o EGF é capaz de regular diversas atividades biológicas e metabólicas dependendo das células estudadas (Gobin and West, 2003). Abaixo descreveremos alguns desses muitos efeitos.

Uma importante função do EGF está relacionada à sua ação na cicatrização tecidual e também na migração de fibroblastos (Gobin and West, 2003), o que leva à sua aplicação terapêutica em pacientes com úlceras diabéticas e de compressão (Yin et al., 2007). A resposta ao EGF é mediada por receptores do tipo tirosina cinase capazes de mediar uma cascata de eventos de sinalização que envolve a estimulação de receptores para integrinas e a conseqüente adesão à matriz extracelular (Cabodi et al., 2004).

O EGF também é capaz de estimular, de forma indireta, a diferenciação de trofoblastos, através do aumento da produção de gonadotrofina- $\beta$ -coriônica, que é responsável pelo processo de diferenciação. Segundo Johnstone e colaboradores (2005), este efeito se dá através da via da MAP cinase p38, pois bloqueando esta via, ocorre a inibição da diferenciação estimulada pelo EGF.

Na musculatura gástrica o EGF induz a contração de maneira dose-dependente, através da ativação de tirosinas cinases citoplasmáticas (Srivastava and St-Louis, 1997). O EGF também age na musculatura lisa dos brônquios, induzindo sua proliferação que é mediada pela via da MAP cinase. Uma possível implicação clínica deste efeito é o fato de ratos asmáticos apresentarem um desbalanço na sinalização do EGF o que leva a proliferação da musculatura dos brônquios e está relacionado à fisiopatologia da doença (Jing et al., 2007).

Em rim, glândulas submaxilares, duodeno e pâncreas, foram identificados níveis de RNAm para o EGF, sendo que no rim e nas glândulas submaxilares há uma maior expressão. No sistema renal o EGF está envolvido em diversas funções como, inibir a reabsorção de sódio em túbulos coletores e a gliconeogênese em células dos túbulos proximais, além de também diminuir a filtração glomerular e o fluxo plasmático renal (Coimbra, 1997, para revisão).

O EGF também participa da regulação dos níveis de  $Mg^{++}$  nos túbulos contornados distais do rim. Muallem e Moe em 2007 sugeriram que o EGF seja um hormônio regulador do  $Mg^{++}$ , pois de uma forma parácrina e/ou autócrina, regula a reabsorção e a concentração na urina deste cátion. Isto ocorre através da regulação dos canais TRPM6 permeáveis ao  $Mg^{++}$  presente na membrana das células dos túbulos contornados distais.

O efeito do EGF observado em células tronco embrionárias de camundongos, demonstra que este fator é capaz de aumentar a proliferação. Este efeito depende do aumento dos níveis de  $Ca^{++}$  no citoplasma, da ativação da PLC (fosfolipase C) e da PKC (proteína cinase C), e da ativação da MAP

cinase 44/42. Igualmente ocorre a ativação de proteínas do ciclo celular como a ciclina D1, a ciclina E, a CDK2 e a CDK4 (Heo et al., 2005).

Há uma abundante expressão do receptor de EGF, em várias linhagens de células tumorais. A linhagem de células de carcinoma epidermal A431, apresenta a expressão deste receptor aumentada, porém altas concentrações de EGF (> 200ng/mL) induzem uma inibição do crescimento celular, sendo parte deste efeito mediado pela PKC $\delta$  e pelo NF $\kappa$ B (fator de ativação nuclear  $\kappa$ B). Um dado interessante foi obtido por Grudinkin e colaboradores em 2007, que mostraram o efeito apoptótico do EGF em células de carcinoma epidermóide A431 quando o tratamento foi feito com altas doses; sendo este efeito mediado pela STAT1.

Em 1995, os efeitos do EGF foram comparados com os efeitos do NGF em células NIH-3T3 por Decker. O autor observou que os fatores induziam respostas distintas, sendo o EGF um estimulador da proliferação e o NGF um mediador da parada do crescimento e indutor da diferenciação. Os estudos visando esclarecer estes resultados mostraram que o efeito mitogênico do EGF dependia da ativação transiente da MAP cinase e o efeito do NGF era mediado pela ativação sustentada desta enzima. De acordo com Kholodenko em 2007 as diferenças na ativação da MAP cinase, regulando a resposta da célula, poderia ser explicado através de um mecanismo de “*feedback*” positivo ou negativo na regulação da Raf-1 pela Erk1/2. O “*feedback*” positivo da Raf-1, promoveria uma ativação sustentada da Erk1/2 e a diferenciação celular, enquanto o “*feedback*” negativo, promoveria uma ativação transitória e a proliferação celular.

## 1.4.2 Efeitos do EGF no Sistema Nervoso

Sabendo-se que o EGF regula sobrevivência, proliferação, diferenciação e regeneração no sistema nervoso, podemos dizer que este fator trófico desempenhe um papel importante ao longo do desenvolvimento deste sistema; bem como tenha sua função preservada na vida adulta (Gomes et al., 2001, para revisão; Weuste et al., 2006).

Análises acerca da expressão do RNAm para o EGF, a partir do 14<sup>o</sup> dia embrionário até o período pós-natal, demonstrou a presença deste fator em todas as regiões do encéfalo, incluindo tronco cerebral, cerebelo, córtex cerebral, hipocampo, tálamo, hipotálamo, bulbo olfatório e estriatum, sendo os maiores níveis encontrados no bulbo olfatório, hipotálamo e cerebelo (Wong and Guillaud, 2004 para revisão).

Astrócitos são capazes de secretar EGF e foi demonstrado, *in vitro*, que astrócitos cerebelares tratados com o hormônio tireoideano triiodotironina (T3), produzem EGF que é responsável pela proliferação destas células (Gomes et al., 2001 para revisão). Também já foi demonstrado que o tratamento de astrócitos por 24 h com EGF leva a um aumento nos níveis de expressão do RNAm para o receptor de IL-4 (interleucina 4). Como a interleucina 4 inibe a proliferação celular podemos sugerir que o EGF regule o seu próprio efeito proliferativo (Barna et al., 2001).

Em 2005, Koprivica e colaboradores, mostraram que o EGF e o seu receptor estão envolvidos nos processos de regeneração axonal, pois bloqueando a atividade cinase do receptor de EGF (EGFR), houve uma inibição da mielinização e do crescimento axonal em células granulares do cerebelo.

O EGF está diretamente envolvido com a capacidade de aumento da sobrevivência de progenitores neurais “in vitro”, além de estimular diferentes respostas celulares durante os estágios do desenvolvimento neural (Walder and Ferretti, 2004). As células tronco neurais são definidas como células com a capacidade de se auto-renovar e com potencial de se diferenciar em três principais tipos de células: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Glaser et al., 2007). Culturas de precursores neuronais de embriões humanos apresentam a formação de colônias quando tratadas simultaneamente com EGF e do fator de crescimento de fibroblastos básico (FGFb) (Walder and Ferretti, em 2004). Células tronco neurais derivadas do cérebro dependem do EGF tanto para sobreviver como para proliferar (Xian and Zhou 2004, para revisão).

### **1.4.3 Receptor de EGF**

O receptor de EGF (EGFR) caracteriza-se por ser uma proteína de 170 kDa, transmembranar, que passa uma única vez a membrana plasmática. A síntese deste receptor ocorre primeiramente no retículo endoplasmático na sua forma precursora com peso molecular de 160 kDa. Sequencialmente a forma madura ocorre pela ligação a oligossacarídeos (170 kDa) na porção N (Sliker et al., 1986).

A expressão do EGFR em células normais varia entre 40.000 a 100.000 receptores por célula. Um dado importante é que camundongos “*knockout*” para este receptor morrem ainda na fase de gestação ou morrem durante os primeiros dias pós-natais. Aqueles que conseguem nascer, apresentam anomalias na pele, no trato gastrointestinal, nos pulmões, na fenda palpebral, no sistema nervoso e nos dentes (Wong, 2006 para revisão). Em contrapartida, o

receptor de EGF é expresso de forma abundante na maioria dos tumores sólidos, incluindo câncer de: mama, cabeça e pescoço, ovário, rins, cólon e em carcinoma pulmonar de pequenas células (Herbst, 2004).

Já foram identificados quatro grupos de receptores para a família do EGF todos eles sendo proteínas transmembranares. São eles: ErbB1 ou EGFR, ErbB2 ou HER2, ErbB3 ou HER3, ErbB4 ou HER4 (Barnes and Kumar, 2003; Toshi and Cappuzzo, 2007; Schlessinger, 2002 para revisão).

Tanto o EGFR como o ErbB2 estão presentes nas regiões de "*lipid rafts*". Quando ativado o EGFR, pode alterar o ambiente dos "*lipids rafts*", gerando a formação de caveolinas oligoméricas na membrana plasmática direcionando assim os mecanismos de sinalização citoplasmáticos (Freeman et al., 2007).

A porção extracelular desta família de receptores apresenta como uma característica marcante a presença de resíduos de cisteína responsáveis pela ligação com o EGF, além disto, apresentam um único domínio transmembrana e um domínio tirosina cinase citoplasmático responsável pela geração e regulação da sinalização intracelular (Barnes and Kumar, 2003; Hsieh and Conti, 2005 para revisão). Os receptores ErbB podem se apresentar sob a forma de monômeros ou de dímeros, podendo formar tanto homodímeros quanto heterodímeros. Quando EGF se liga a ErbB1 permite que este receptor se ligue a outros membros da família ErbB, formando heterodímeros (Henson and Gibson, 2006 para revisão). Mesmo que ErbB2 não tenha nenhum ligante conhecido, ele também pode formar heterodímeros com outros receptores ErbB e potencializar o complexo de sinalização (Henson and Gibson, 2006; Barnes and Kumar, 2003; Hsieh and Conti, 2005 para revisão). O receptor

ErbB3, tem atividade cinase que se ativa somente quando associada com outro receptor da família ErbB; sendo chamados de co-receptores (Hsieh and Conti, 2005 para revisão).

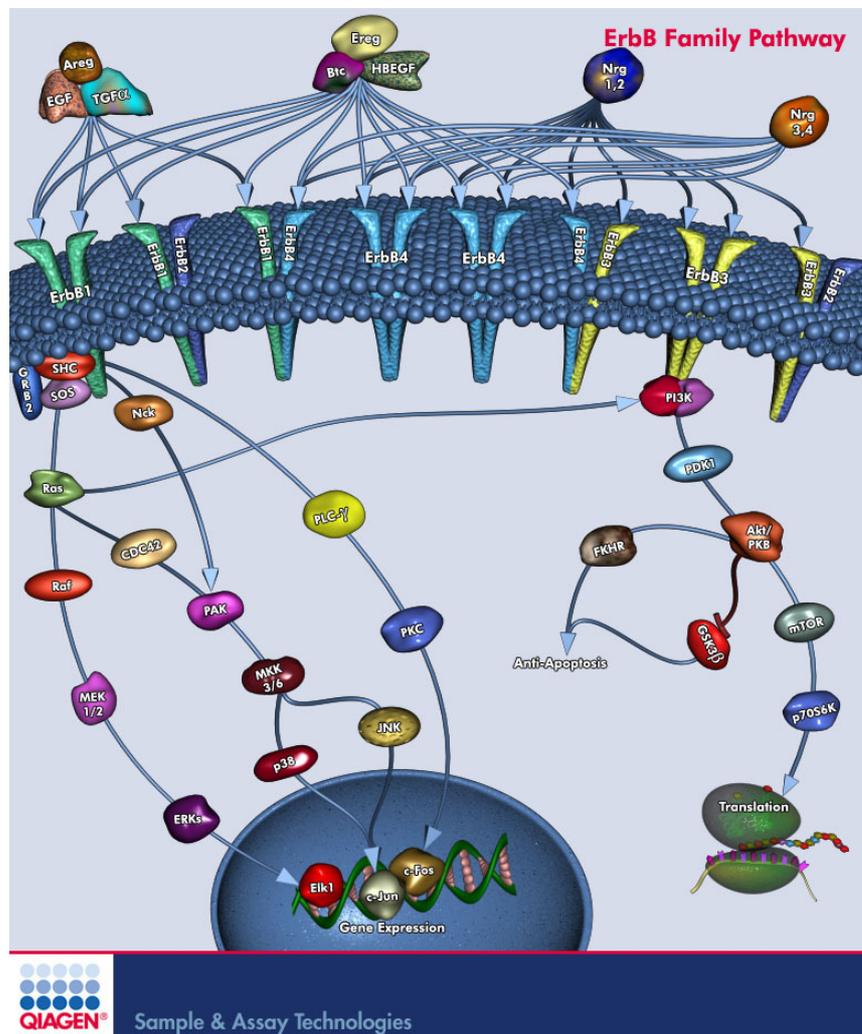
Com relação à ativação do EGFR, dados da literatura mostram que diferentes ligantes pertencentes à família EGF de fatores tróficos também são capazes de se ligar ao EGFR, ativá-lo e induzir cascatas de sinalização intracelulares (Toshi and Cappuzzo, 2007; Hsieh and Conti, 2005 para revisão). Esta família então, é dividida em 3 grupos (Tabela 4 e Figura 11) de acordo com os receptores aos quais são capazes de se ligar.

GRUPO	LIGANTES	RECEPTORES
I	EGF, TGF $\alpha$ , ANFIRREGULINA.	Apenas EGFR (ErbB1)
II	NEUREGULINAS	ErbB3 e ErbB4
III	HB-EGF, BETACELULINA E EPIRREGULINA.	Tanto EGFR quanto ErbB4

**Tabela 4:** Família EGF e seus receptores. Adaptado de Wong and Guillaud (2004).

O grupo 1 se liga especificamente ao EGFR e é formado pelo EGF, TGF $\alpha$  e pela Anfirregulina. O grupo 2 é constituído pelas Neuregulinas que se ligam tanto ao ErbB3 quanto ao ErbB4. Já o grupo 3 compreende a HB-EGF, a Betacelulina e a Epirregulina que podem se ligar tanto ao EGFR, como ao ErbB4 (Hsieh and Conti, 2005 para revisão). Estas interações trans-regulatórias podem ser mediadas por meio das ligações aos receptores, através da fosforilação direta dos receptores por proteínas tirosina cinase e também por

padrões de heterodimerização e transativação dos receptores ErbB (Barnes and Kumar, 2003 para revisão).



**Figura 11:** Representação esquemática divisão em grupos da Família EGF de fatores tróficos e seus respectivos receptores ativados. Obtido do site: [http://www1.qiagen.comGeneGlobePathwayView.aspxID=NM\\_005235](http://www1.qiagen.comGeneGlobePathwayView.aspxID=NM_005235) em 29.11.09

As respostas celulares que podem surgir a partir da ligação do EGF ao seu receptor estão diretamente relacionadas à concentração da molécula de EGF no meio, assim como ao nível de expressão do seu receptor (Henson and Gibson, 2006 para revisão). Existem duas formas pelas quais o EGF pode se ligar e em 95-98% dos casos a ligação é de alta afinidade ( $KD=10nM$ ) e em 2-

5% dos casos a ligação é de baixa afinidade ( $KD=0,1nM$ ) (Schlessinger, 2002 para revisão).

O receptor ErbB2 pode ter sua fosforilação estimulada por EGF quando há a formação do heterodímero EGFR/ErbB2 (Wong and Guillaund, 2004, para revisão). Este evento torna-se viável devido à existência de uma alça de dimerização altamente conservada em todos os membros da família EGFR, sendo ErbB2 considerado padrão de heterodimerização entre todos os outros membros da família de receptores (Schlessinger, 2002, para revisão). Os EGFR sofrem a dimerização ligando duas moléculas do ligante para duas moléculas do receptor, formando um complexo estável 2:2 /EGF:EGFR (Barnes and Kumar, 2003 para revisão, Schlessinger, 2002 para revisão).

#### **1.4.4 Tráfego, Endocitose e Transativação do EGFR**

A ativação fisiológica dos receptores para o EGF deve ocorrer de forma pontual e rápida para que as células não venham a receber uma ativação crônica. Caso esta ativação crônica venha a ocorrer podem ser induzidas respostas celulares que levem ao aparecimento de processos tumorais. Desta forma, há um grande número de controles do tipo “*feedback*” que ajudam a atenuar estes efeitos, como a fosforilação de resíduos serina/treonina do receptor ou seus substratos, a estimulação de fosfatases e a endocitose (Martin et al., 2006). Quando o EGFR é fosforilado via PKC, isto pode levar a uma “*downregulation*” da atividade do receptor, pois a fosforilação da PKC na treonina 654 do EGFR promove uma diminuição da afinidade pelo EGF, reduzindo a atividade tirosina cinase e autofosforilação deste receptor (Wong and Guillard, 2004 para revisão).

O complexo EGF – EGFR aparece sequencialmente em endossomas primários. Evidências mostram que a ativação da cinase não ocorre somente na membrana plasmática, mas também nos endossomas, pois proteínas como a Grb2, a Shc e a mSOS foram localizadas nestas organelas logo após a ativação do EGFR. Estes resultados indicam que mesmo durante a endocitose o processo de sinalização é mantido. Quando endocitado o EGFR pode ser translocado para o núcleo, contudo este processo está diretamente relacionado à ligação do EGF e da participação da importina- $\beta$  promovendo a ativação da ciclina D e de outros genes (Vergarajuaregui et al., 2006; Balbis et al., 2007).

A partir de 1999 foi considerado como um mecanismo de ativação dos EGFR o processo de transativação (Stirnweiss et al., 2006). Esta resposta pode ser estimulada pela ativação de receptores ligados à proteína G que resulta em fosforilação do EGFR e conseqüente geração e transdução do sinal de proteínas como a ERK1/2, fosfolipase-C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), PI3 cinase/Akt (Hsieh and Conti, 2005 para revisão; Stirnweiss et al., 2006).

Em 2004, foi mostrado que receptores para integrinas podem mediar a transativação dos receptores para o EGF. Além disto, também foi demonstrado que as integrinas cooperam com a sinalização do EGF, sugerindo uma relação de adesão à matriz celular e o EGFR para induzir respostas biológicas (Cabodi et al., 2004).

#### **1.4.5 Vias de Sinalização ativadas pelo EGF**

O terminal carboxi dos receptores de EGF é constituído de aminoácidos que apresentam resíduos de tirosina, que uma vez fosforilados servem como sítios de ligação, favorecendo a sinalização desencadeada por diferentes proteínas. Estas proteínas apresentam atividade catalítica ou atuam como

proteínas adaptadoras, ligando o receptor a enzimas envolvidas na transdução do sinal, conforme mostrado na figura 12 (Sorkin, 2001).

Uetz e Stagljar em 2006 mostraram que cada fosfotirosina do EGFR se liga a sete proteínas diferentes, enquanto ErbB2, ErbB3 e ErbB4 se ligam a 17, 9 e 2 proteínas respectivamente.

Uma vez ligado ao seu receptor, o EGF promove a dimerização deste e a transfosforilação dos sítios de resíduos de tirosinas, através dos quais há a ativação de proteínas como: Grb2, Shc, tirosinas cinases da família Src, fosfato inositol 3-cinase (PI3), PLC $\gamma$ , janus cinase (JAK) e os transdutores de sinal e ativadores de transcrição de proteínas STAT (Martin et al., 2006, Grudinkin et al., 2007).

O EGFR quando transfosforilado pode ativar a proteína Grb2 através de seu domínio SH2, enquanto o domínio SH3 desta, promove a associação com o fator de troca de nucleotídeo Sos, recrutando assim, o complexo Grb2–Sos para a membrana plasmática próximo à proteína Ras ancorada na camada interna da membrana plasmática. Desta forma a Sos, estimula a troca do nucleotídeo GDP (guanosina difosfato) para GTP (guanosina trifosfato), resultando na formação do complexo Ras-GTP que é ativo (Sorkin, 2001, Gale et al., 1993).

Através da ativação da Ras há então a estimulação da cascata das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), uma superfamília de proteínas cinases serina-treonina. Assim, a Ras ativa a Raf-1 (MAPKKK - proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno), que por consequência fosforila e ativa a MEK1/2 (MAPKK - proteína cinase cinase ativada por mitógeno) que fosforila e ativa a cinase regulada por sinal extracelular (ERK

1/2). A proteína ERK quando ativada pode ser translocada para o núcleo e ativar fatores de transcrição e regulação de expressão gênica (Henson and Gibson, 2006 para revisão). Vale salientar que esta via é uma das mais bem caracterizadas nos efeitos estimulados pelo EGF (Sorkin, 2001). A via da ERK está envolvida no aumento de níveis da ciclina D, estimulada pelo EGF, o que leva à progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S (Zhang et al., 2004).

Entretanto, cabe salientar que outras MAPKs também podem contribuir para os efeitos proliferativos (Hollborn et al., 2005). Dentre os membros da família MAPK, a p38, foi originalmente identificada como uma cinase ativada em resposta a lipopolissacarídeos. Algum tempo depois, descobriu-se que esta proteína também é regulada quando as células são expostas a estímulos, incluindo alguns fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e sob diferentes formas de stress (Vergarajaregui et al., 2006). Foi demonstrado também que a p38 é um importante mediador da migração celular estimulada pela Ras em cânceres de células epiteliais (Zhou et al., 2007).

O EGFR apresenta também um sítio de ligação capaz de ativar a PLC $\gamma$ , que quando ativada, catalisa a hidrólise do fosfolípido fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato, em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$ ) (Heo et al., 2005). O DAG é um ativador fisiológico da proteína cinase C (PKC), enquanto o IP $_3$  induz a liberação de cálcio dos estoques citoplasmáticos, contribuindo nos processos intracelulares regulados pelo cálcio. A PKC também pode estimular a via da ERK, através da ativação da Raf-1 – MEK 1/2 – ERK 1/2, induzindo efeitos mitogênicos (Hassan et al., 2004). A Erk1/2 é uma proteína reguladora *upstream* da p38 e esta por sua vez, é capaz de ativar múltiplos fatores de transcrição, como *c-jun* e *c-fos* (Zhou et al., 2007).

Entre as classes de PKC a convencional depende, para a sua ativação, da participação de cálcio e de DAG. Estas proteínas estão freqüentemente envolvidas com efeitos proliferativos. Porém, a classe atípica, não requer cálcio para ser ativada, e comumente encontra-se envolvida com efeitos de sobrevida como em células-tronco de camundongos estimuladas com EGF que sofrem aumento da proliferação. Este efeito também pode ser mediado por isoformas da classe convencional e envolvem a translocação destas proteínas do citoplasma para a membrana celular (Heo et al., 2005).

Outra via que participa do crescimento, sobrevida e diferenciação de várias células de mamíferos é a da PI3-cinase (Hassan et al., 2004). Esta proteína não se liga diretamente ao EGFR, porém pode ser ativada pelo estímulo de EGF, quando o EGFR forma heterodímero com ErbB3 que apresenta um sítio de ligação do domínio SH2 da subunidade regulatória da PI3-cinase, não encontrado no EGFR (Woung and Guillaund, 2004, para revisão). A via da RAS pode ser ativada a partir da PI3-cinase, permitindo assim a ativação também da via de sinalização da Erk, favorecendo, um “crosstalk” entre as vias de sinalização na sobrevida (Henson and Gibson, 2006 para revisão).

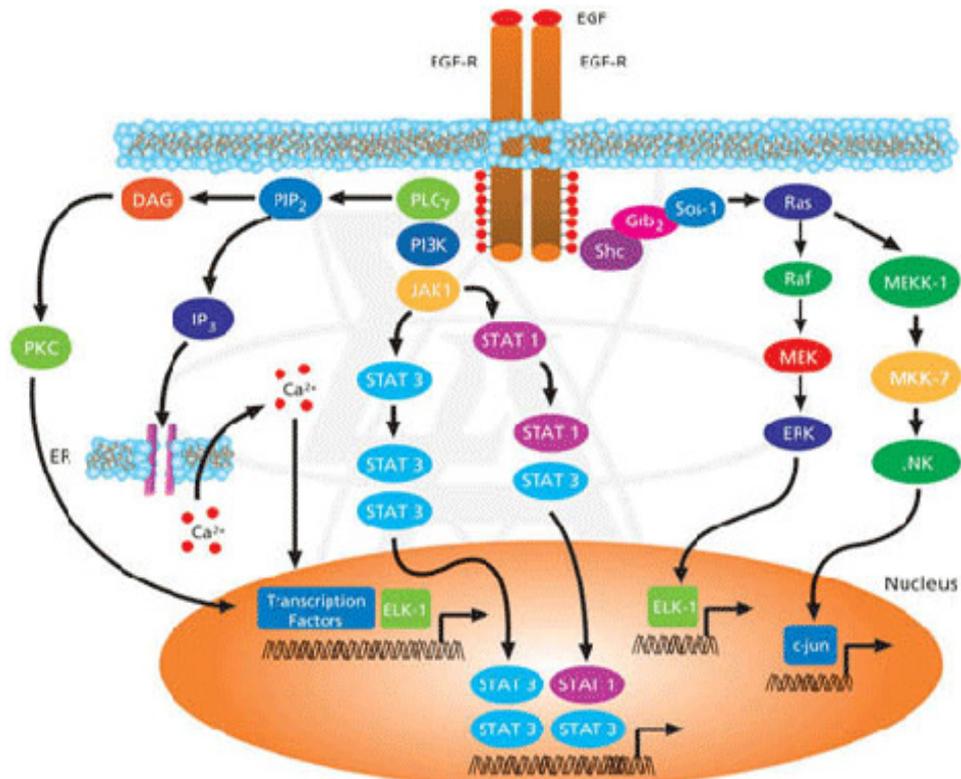
Uma vez ativada a PI3-cinase cataliza a transferência de um grupo fosfato do ATP para o fosfatidil-inositol gerando 3`fosfatidil-inositol fosfato (PIP) que se apresenta como um sítio de ligação para proteínas com domínio homólogo a pectrina (PH). Além disto, a PI3-cinase permite a formação de 3,4,5 fosfatidil-inositol (PIP3) e subsequente recrutamento da Akt para membrana plasmática através de seu domínio PH (Henson and Gibson, 2006 para revisão).

A proteína cinase B (PKB) ou Akt trata-se de uma proteína cinase do tipo serina/treonina que regula atividades celulares como: apoptose, proliferação e migração celular. Quando presente na membrana celular, é fosforilada pela cinase 1 dependente de fosfoinosítídeo (PDK1) no resíduo treonina 308 (T308), localizado na alça de ativação (Kumar et al., 2007). A ativação de PKB, favorece a fosforilação de duas proteínas próapoptóticas BAD e caspase 9, inibindo suas atividades e ativando fatores de transcrição (NFκB, HIF-1α, CREB) o que promove um aumento da transcrição de genes anti-apoptóticos, controlando assim a sobrevivência celular (Henson e Gibson, 2006 para revisão).

Os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) também estão envolvidos nos mecanismos de sinalização downstream do EGFR, pois as proteínas STAT são fatores de transcrição citoplasmáticos que contêm o domínio SH2 e podem interagir com grupos de fosfotirosinas nos receptores de fatores de crescimento ou nos receptores de citocinas. A via da STAT tem sua ativação dependente da fosforilação de uma única tirosina, que pode ocorrer por receptores de citocinas conjugados a tirosinas cinases citoplasmática como da família JAK, ou mesmo por receptores de fatores de crescimento, aparentemente pelo efeito direto do domínio cinase (Guren et al., 1999).

As proteínas STAT ativadas, após a homo ou heterodimerização, são translocadas para o núcleo onde se ligam a regiões promotoras de genes alvos como *c-fos*, *c-junB*, *c-myc* e ciclina D1 atuando como regulatórias da proliferação e diferenciação (Guren et al., 1999). A STAT 1 ativada por EGF parece se associar a efeitos anti-apoptóticos e anti-proliferativos, enquanto a STAT 3 está associada a estimulação do crescimento, ativando o EGFR através de um mecanismo autócrino. Dados da literatura sugerem que a STAT

5 pode estar envolvida tanto com eventos de proliferação quanto diferenciação (Guren et al., 1999, Grudinkin et al., 2007). O receptor de EGF é capaz de ativar diferentes vias de sinalização resumidas na figura 12.



**Figura 12:** Representação esquemática das diferentes vias de sinalização ativadas por EGF. Obtido do site [www.sigmaaldrich.com/etcm/medialib/life-science/cell-signaling-andmigratecellsignal1egf\\_r.Par.0001.Image.470.gif](http://www.sigmaaldrich.com/etcm/medialib/life-science/cell-signaling-andmigratecellsignal1egf_r.Par.0001.Image.470.gif) em 29.11.09.

## **2. OBJETIVOS**

Dados prévios do nosso laboratório demonstram que o tratamento com IGF-I é capaz de aumentar a proliferação de células da retina em cultura, de maneira tempo-dependente. Em 24 e 48h de tratamento o IGF-I é capaz de aumentar a taxa de proliferação, entretanto em 72h o efeito não é mais observado (Medina, 2008). Um resultado interessante que surgiu deste trabalho mostra que o efeito do IGF-I é mediado pela ativação dos receptores de EGF, pois quando estes receptores são inibidos, o efeito proliferativo do IGF-I é abolido.

Paralelamente aos estudos sobre o papel do IGF-I na proliferação de células da retina mantidas em cultura, nosso laboratório também analisou o papel do EGF na proliferação destas células. Os resultados obtidos por Miranda em 2008 demonstram que o EGF é um potente fator de proliferação para as células da retina sendo seu efeito observado até 6 dias em cultura.

Baseado neste conjunto de resultados decidimos analisar, em nosso trabalho, qual o efeito do tratamento simultâneo ou alternado destes dois fatores sobre a proliferação de células da retina de ratos mantidas em cultura.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

O IGF-I, EGF e anticorpo para BDNF foram comprados da PeproTech (Rocky Hill, USA). A penicilina G, o sulfato de estreptomicina, a poli-L-ornitina, a L-glutamina, o anticorpo para actina e o 2,5-diphenil-oxazol foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA). O meio de cultura 199 foi fornecido pela Gibco (Gaithersburg, USA) e a tripsina utilizada é proveniente da Worthington (Freehold, USA). A solução salina sem cálcio e sem magnésio (CMF) era preparada no nosso laboratório e apresentava a seguinte composição: cloreto de sódio (NaCl) 131mM, cloreto de potássio (KCl) 4,09mM, fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0,92mM, fosfato de monopotássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,45mM, glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 12,2mM, bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 9,4mM, vermelho de fenol 10mg/mL. A [ $^3\text{H}$ -metil]-timidina foi comprada da Amersham (Piscataway, USA).

### **3.2 Métodos:**

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

As placas de Petri de 40 mm foram compradas da TPP (TPP, Switzerland) e tratadas com uma solução de poli-L-ornitina (PM 30000 – 70000 kDa). Esta solução foi preparada em tampão borato (pH 8,0) e utilizada na concentração de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para se obter a esterilidade da solução realizava-se uma filtração em membrana de nitrocelulose marca Millipore (poros de 0,22  $\mu\text{m}$ ).

Ao longo de nossas experiências, o tempo de polimerização com a poli-L-ornitina variou de 8 a 12 horas, sempre à temperatura ambiente, no fluxo laminar, na ausência de radiação ultravioleta. Após a polimerização, a poli-L-ornitina era retirada, desprezada e as placas lavadas, uma vez, com meio de cultura completo (contendo glutamina, antibiótico e soro fetal bovino). Imediatamente após este procedimento, as células eram semeadas.

### **3.2.2 Cultura de células da retina de ratos:**

Utilizamos células da retina de ratos pigmentados da linhagem Lister Hooded que são criados no biotério de roedores do departamento de Neurobiologia da Universidade Federal Fluminense. Nos diferentes experimentos foram utilizados animais nas primeiras 24 ou 48 horas de vida (P0 - P1, respectivamente).

Todos os nossos procedimentos experimentais estão de acordo tanto com as normas da Sociedade Internacional de Neurociências, como com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Todos os esforços são realizados no intuito de minimizar ao máximo o sofrimento dos animais e os protocolos experimentais são ajustados para que seja utilizado o número de animais estritamente necessário.

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

- os animais foram sacrificados por decaptação e tiveram suas cabeças limpas com solução de álcool etílico 70 %;
- incisões bilaterais de aproximadamente 1,0 cm foram feitas nas regiões orbitais, de onde se retirou o globo ocular com o auxílio de uma pinça curva de dissecação;

- em uma solução salina sem cálcio e sem magnésio (CMF), os globos oculares foram incubados, até o momento de dissecação das retinas;
- as retinas foram dissecadas em CMF e, livres do epitélio pigmentado, transferidas para um tubo de ensaio contendo também CMF;
- a dissociação das células foi realizada, primeiramente, com tripsina na concentração de 0,1 % por aproximadamente 25 min, a 37°C;
- após o período de tratamento enzimático, adicionava-se meio de cultura completo (199 Gibco, acrescido de 5 % de soro fetal bovino, glutamina 2,0 mM e antibiótico: estreptomicina 100,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  + penicilina 100 U.mL<sup>-1</sup>). A presença do soro fetal bovino fazia com que a tripsina residual fosse inativada ;
- em seguida, lavava-se a preparação duas vezes com meio de cultura completo e após esta lavagem adicionava-se aproximadamente 2,0 mL de meio completo;
- finalizando o processo de dissociação, passavam-se as células por até 20 vezes através de uma pipeta Pasteur de ponta afilada. Este processo de trituração produzia uma suspensão homogênea de células da retina;
- a densidade de plaqueamento utilizada foi de aproximadamente  $1,25 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$  ;
- o plaqueamento das células foi feito em um volume de 1,0 mL. O volume final de 2,0 mL foi obtido pela adição de meio de cultura controle ou meio de cultura contendo os fatores tróficos. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5 % de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e 95 % de ar, por períodos de tempo que variaram conforme o experimento.

### 3.2.3 Ensaio para incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina

A análise da incorporação de timidina ao DNA nas culturas mantidas por diferentes períodos de tempo e sob os diversos tratamentos foi feita segundo o protocolo abaixo descrito.

- Lavagem rápida das culturas com 2,0 mL de meio de cultura sem soro, por duas vezes, à temperatura de 37°C;
- Incubação das culturas com 1,0 mL de meio de cultura acrescido de: 0,5µCi.mL<sup>-1</sup> de timidina tritiada ([metil-<sup>3</sup>H]-thymidine, Amersham Lifescience, USA) por 60 min, na estufa a 37°C em atmosfera umidificada contendo 95% ar/5% CO<sub>2</sub>;
- Lavagem rápida das culturas com 2,0 mL de meio de cultura sem soro, por quatro vezes, à temperatura de 37°C, para a retirada da radioatividade não incorporada às células;
- Retirada do meio de cultura e incubação das culturas com 200µL/placa de hidróxido de sódio (NaOH) 0.4N, por 15 min;
- Transferência do conteúdo das placas, junto com 3 mL de H<sub>2</sub>O destilada, para tubos de vidro, acondicionados sobre gelo;
- Adição de 600µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% por amostra e incubação por 30 min;
- Filtração de cada amostra radioativa, utilizando filtros de fibra de vidro, sob pressão negativa, para a retirada da radioatividade não incorporada ao DNA.

Para assegurar um melhor rendimento do método, cada tubo de vidro onde estavam as amostras, era lavado com 2 mL de TCA 5%, por três vezes;

- Os filtros eram deixados em capela de exaustão de gases para desidratação por 24h. A seguir eram transferidos para frascos de cintilação contendo 3 mL de solução de tolueno acrescida de 2,5-diphenil-oxazol 0,4% ;

- Medida da radioatividade das amostras em cintilador de fase líquida.

### **3.2.4 Análise Estatística dos Resultados**

Foi feita a análise de variância (ANOVA) seguida de um pós teste de comparação entre as diferentes condições experimentais (Newman-Keuls).

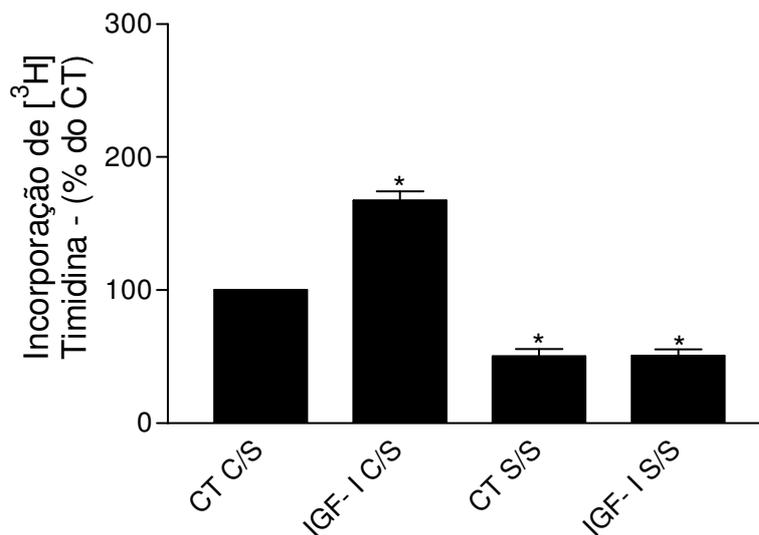
#### **4. RESULTADOS:**

Dados prévios do nosso laboratório (Medina, 2008) haviam demonstrado que o tratamento de culturas de células da retina de ratos neonatos com 10ng/mL de IGF-I, por 48h, induzia um aumento de aproximadamente 50% na proliferação celular avaliada através do método de incorporação de timidina tritiada.

É consenso na literatura que o soro fetal bovino possui fatores tróficos capazes de aumentar tanto a proliferação, como a viabilidade celular. Por este motivo decidimos analisar se a proliferação induzida pelo tratamento com IGF-I dependia ou não da presença de soro fetal bovino. Com este propósito realizamos experiências em que as células foram plaqueadas na presença de soro fetal bovino (5%) e mantidas inicialmente em cultura por 4h. Este primeiro procedimento torna-se necessário para garantir a adesão das células ao substrato (se as células forem plaqueadas na ausência de soro fetal bovino, não é possível obter adesão, utilizando-se o protocolo experimental estabelecido em nosso laboratório). Após este período de 4h as placas foram lavadas duas vezes com meio de cultura, sem adição de soro fetal bovino, e posteriormente divididas em dois grupos. No primeiro grupo tínhamos o controle e o tratado com 10ng/mL de IGF-I na presença de soro fetal. No segundo grupo tínhamos o controle e o tratado com 10ng/mL IGF-I na ausência de soro fetal bovino. Ambos os grupos foram mantidos em cultura por 48h.

Na figura 13 podemos observar que a ausência de soro fetal bovino abole completamente o efeito do IGF-I sobre a proliferação celular. É

interessante ressaltar que 50% da proliferação observada em nossos controles é devida a fatores tróficos presentes em nosso soro já que a proliferação obtida no controle sem soro equivale à aproximadamente 50% daquela observada no controle com soro. Quando comparamos este resultado a outros obtidos em nosso laboratório observamos que tanto o efeito proliferativo do FGF-2 (Guilarducci-Ferraz et al., 2008) como o do EGF (Pinto, 2008) independe da presença de soro fetal bovino. Assim, nosso resultado sugere que a presença do soro seja importante para possibilitar que a via de sinalização do IGF-I seja ativada.



**Figura 13** – Papel do soro fetal bovino (5%) no efeito proliferativo do IGF-I (10ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura por 48h. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle (na presença de soro fetal bovino) foi considerado 100% (aproximadamente 1000 cpm/placa). CT C/S (controle na presença de soro fetal bovino); IGF-I C/S (tratamento com IGF-I na presença de soro fetal bovino); CT S/S (controle na ausência de soro fetal bovino); IGF-I S/S (tratamento com IGF-I na ausência de soro fetal bovino). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 4-9) (\* p < 0,001 em relação ao controle com soro de 48h).

Medina demonstrou que o efeito do IGF-I, sobre a proliferação de células da retina, somente era observado até 48h de tratamento crônico. Quando as

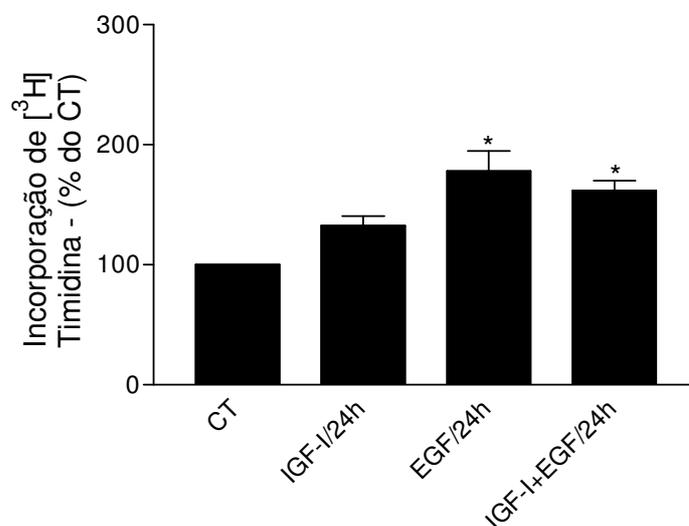
culturas eram tratadas cronicamente por 72h não mais era possível observar um efeito proliferativo. Um outro dado interessante obtido neste trabalho foi o envolvimento dos receptores de EGF no efeito proliferativo do IGF-I. Quando as culturas eram tratadas com IGF-I, por 48 horas, na presença do inibidor dos receptores de EGF o efeito era totalmente abolido (Medina 2008).

Paralelamente também em nosso laboratório, um outro estudo era feito sobre o papel do EGF sobre a proliferação de células da retina. Os dados obtidos mostram que o EGF é um potente fator indutor de proliferação em células da retina, sendo possível observar um aumento igual ou superior a 100% na incorporação de timidina quando as células eram tratadas com 0,1ng/mL de EGF por 48h (Miranda, 2008).

Esse conjunto de resultados nos levou a perguntar como as culturas responderiam aos tratamentos simultâneos ou alternados com estes fatores tróficos. Que possíveis interações poderiam resultar destes tratamentos? Estariam estes fatores agindo sobre a mesma população celular ou seriam populações distintas?

Para dar início aos nossos estudos resolvemos analisar se os efeitos destes dois fatores poderiam se somar no tempo. Como o efeito máximo do IGF-I era de 50% e o do EGF era sempre maior do que o do IGF-I começamos fazendo tratamentos de 24h, já que neste tempo o efeito de ambos os fatores já podia ser observado. Analisando os resultados apresentados na figura 14 podemos observar que o tratamento tanto com EGF (0,1ng/mL) por 24h como o tratamento com IGF-I (10ng/mL) por 24h, induz um aumento de 81,45% e 28,97% respectivamente, na proliferação celular. Entretanto, quando adicionávamos os dois fatores simultaneamente o efeito não era aditivo

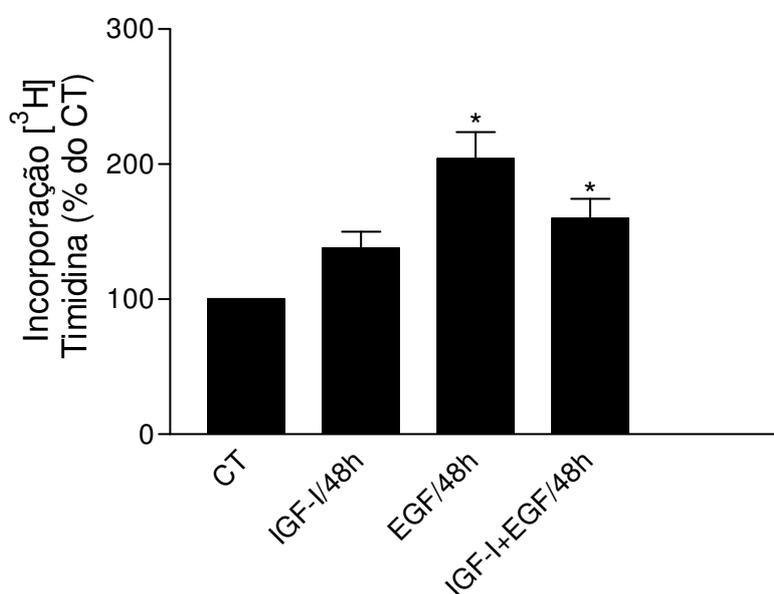
53,68%. Este resultado sugere que estes fatores estejam agindo provavelmente sobre a mesma população de células.



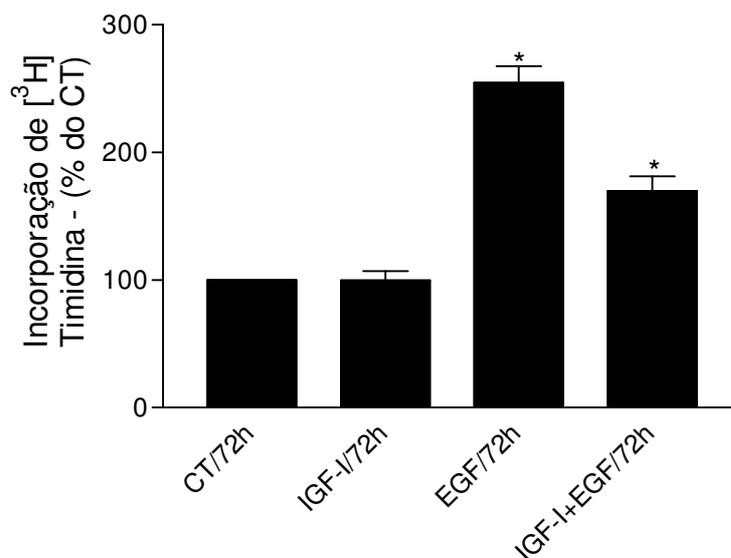
**Figura 14** – Os efeitos proliferativos induzidos por IGF-I (10ng/mL) e EGF (0,1ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura por 24h, não são aditivos. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 2000 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 24 horas); IGF-I/24h (tratamento crônico com IGF-I por 24 horas); EGF/24h (tratamento crônico com EGF por 24 horas); IGF-I+EGF/24h (tratamento crônico e simultâneo com IGF-I e EGF por 24 horas). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 9-12) (\* p < 0,001 em relação ao controle de 24h).

Nosso próximo passo foi analisar se o efeito do tratamento simultâneo por 48h seguiria o mesmo padrão daquele obtido em 24h. Os resultados obtidos na figura 15 mostram que não há efeito aditivo sobre a proliferação quando as culturas são tratadas com ambos os fatores por um período de 48h. Novamente podemos observar que tanto o tratamento com EGF como o tratamento com IGF-I são capazes de aumentar a proliferação em 109,81% e 42,78% respectivamente, mas quando adicionamos os dois fatores o aumento na proliferação é de 59,54%. Apesar de não ser significativo, quando analisamos o gráfico da figura 15 podemos observar que na presença do IGF-I o EGF não exerce seu efeito máximo. Por este motivo decidimos fazer o

tratamento simultâneo com os dois fatores por um período de 72h. Na figura 16 podemos observar que a presença do IGF-I induz um significativo decréscimo ( $p < 0,001$ ) no efeito proliferativo do EGF. Enquanto o tratamento com EGF por 72h induz um aumento de 154,60% na proliferação celular, o tratamento com EGF na presença de IGF-I induz um aumento de 69,86% na proliferação das células.



**Figura 15** – Tratamento crônico e simultâneo com IGF-I (10ng/mL) e EGF (0,1ng/mL) não exerce efeito aditivo sobre a proliferação das células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura por 48h. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 1000 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 48 horas); IGF-I/48h (tratamento crônico com IGF-I por 48 horas); EGF/48h (tratamento crônico com EGF por 48 horas); IGF-I+EGF/48h (tratamento crônico e simultâneo com IGF-I e EGF por 48 horas). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes ( $n = 11-12$ ) (\*  $p < 0,001$  em relação ao controle de 48h).

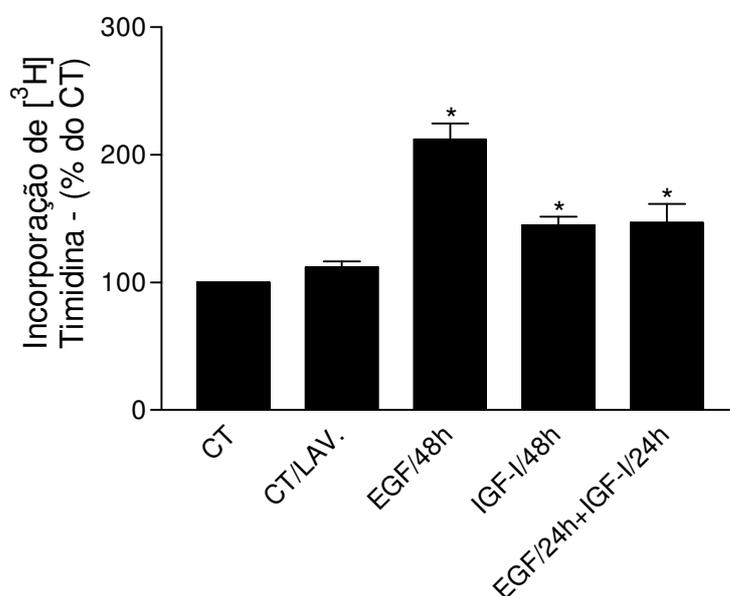


**Figura 16** – Papel inibitório de IGF-I (10ng/mL) sobre o efeito proliferativo de EGF (0,1ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura por 72h. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 1000 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 72 horas); IGF-I/72h (tratamento crônico com IGF-I por 72 horas); EGF/72h (tratamento crônico com EGF por 72 horas); IGF-I+EGF/72h (tratamento crônico e simultâneo com IGF-I e EGF-I por 72 horas). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 10-12) (\* p < 0,001 em relação ao controle de 72h).

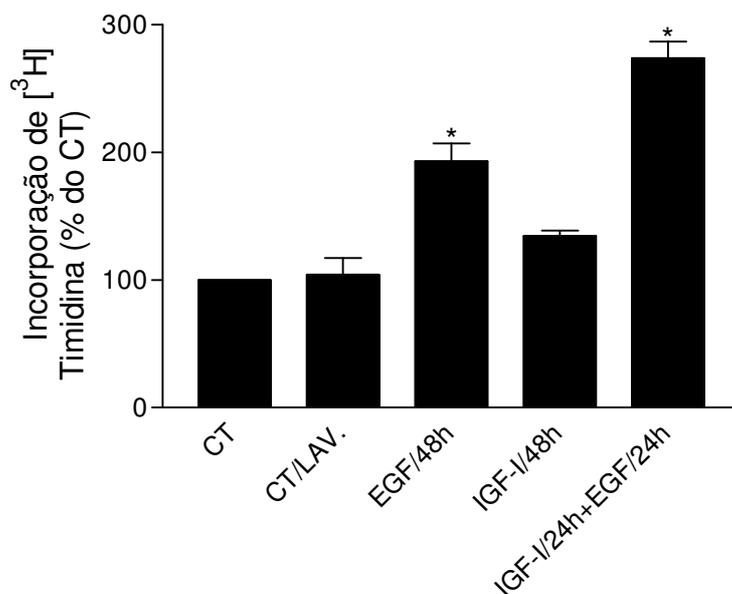
Este conjunto de resultados nos levou a pensar que o tratamento com IGF-I pudesse modular a resposta das células ao EGF. Supusemos que o IGF-I pudesse induzir um certo grau de diferenciação celular o que levaria a uma diminuição no efeito proliferativo do EGF. Interessante ressaltar que este efeito era tempo dependente, já que apenas em 72h podíamos claramente observar a inibição parcial do efeito proliferativo do EGF induzida pelo IGF-I.

Após a obtenção destes resultados optamos por analisar como seria o comportamento das células se os dois fatores fossem apresentados de maneira alternada. Começamos analisando se o tratamento prévio com EGF poderia influenciar a resposta das células ao IGF-I. A figura 17 mostra que quando as culturas são inicialmente tratadas por 24h com EGF e posteriormente tratadas por mais 24h com IGF-I o efeito proliferativo obtido é igual àquele obtido com o tratamento com IGF-I por 48h. Ou seja, o tratamento

inicial com EGF não deixa as células mais responsivas ao IGF-I (46,83%). Entretanto, quando as células são inicialmente tratadas com IGF-I por 24h e posteriormente tratadas com EGF por mais 24h observa-se uma potencialização no efeito proliferativo do EGF (figura 18). Enquanto o tratamento com EGF por 48h induziu um aumento de 105,13% na proliferação celular, o tratamento com IGF-I por 24h seguido de um tratamento com EGF por mais 24h induziu um aumento na proliferação de 183,12% (figura 18).



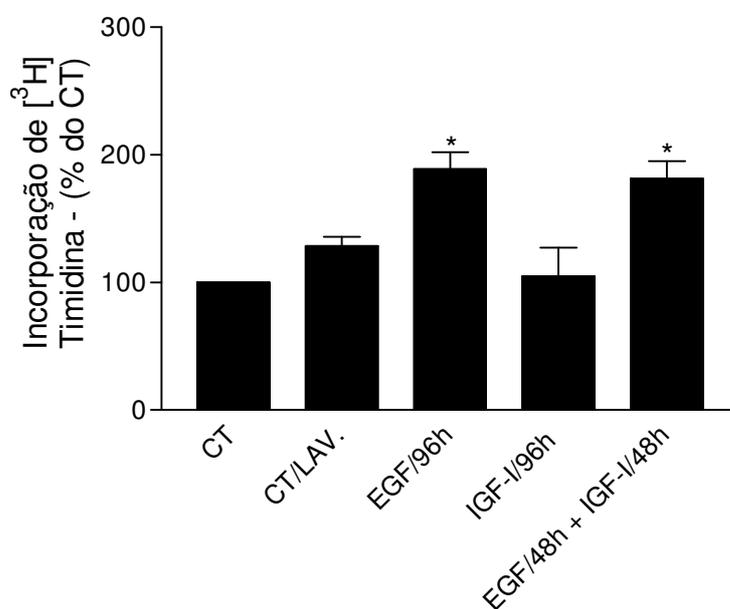
**Figura 17** – Pré-tratamento das células da retina de ratos neonatos com EGF (0,1ng/mL) por 24 horas seguido por tratamento com IGF-I (10ng/mL) por mais 24 horas não interfere no efeito proliferativo do IGF-I. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 1000 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 48 horas); CT/LAV.(tratamento nas 24 horas iniciais com meio de cultura controle e troca por meio fresco nas 24 horas finais); EGF/48h (tratamento crônico com EGF por 48 horas); IGF-I/48h (tratamento crônico com IGF-I por 48 horas); EGF/24h+IGF-I/24h (tratamento intercalado com EGF por 24 horas e substituição por tratamento com IGF-I nas 24 horas finais). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 5-9) (\*  $p < 0,001$  em relação ao controle de 48h).



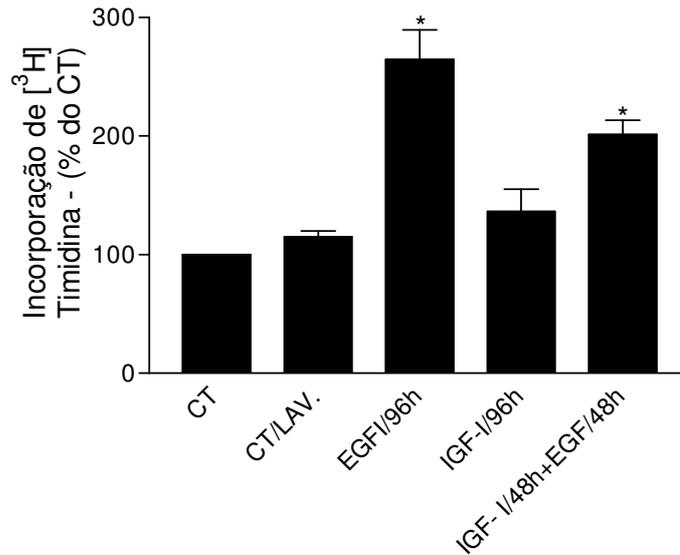
**Figura 18** – Aumento da responsividade das células ao EGF (0,1ng/mL) é verificado quando estas são pré-tratadas com IGF-I (10ng/mL) por 24 horas. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 1000 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 48 horas); CT/LAV.(tratamento nas 24 horas iniciais com meio de cultura controle e troca por meio fresco nas 24 horas finais); EGF/48h (tratamento crônico com EGF por 48 horas); IGF-I/48h (tratamento crônico com IGF-I por 48 horas); IGF-I/24h+EGF/24h (tratamento intercalado com IGF-I por 24 horas e substituição por tratamento com EGF nas 24 horas finais). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 7-12) (\* p < 0,001 em relação ao controle de 48h).

A seguir analisamos como as células se comportariam com tratamentos alternados por períodos de 48h. Na figura 19 podemos observar que o tratamento prévio das culturas com EGF e posterior tratamento com IGF-I induz a mesma taxa de proliferação das culturas tratadas com EGF por 96h. Todavia quando o tratamento é feito inicialmente por 48h com IGF-I e posteriormente se faz o tratamento com EGF por 48h observa-se uma tendência de diminuição do efeito (figura 20). Como controle da resposta das células ao EGF e ao IGF-I ao longo do tempo em cultura fizemos uma experiência em que as células foram mantidas em cultura por 24h e 48h em meio de cultura completo e após estes períodos foram tratadas ou com EGF ou com IGF-I e deixadas por períodos

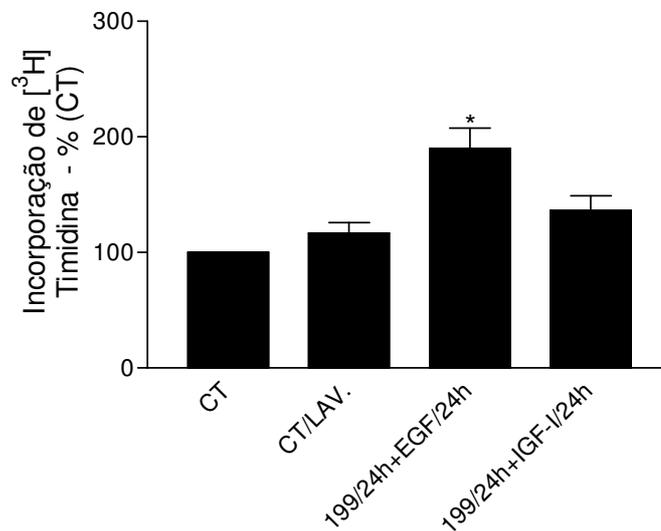
idênticos. Nas figuras 21 e 22 podemos observar que as células continuam responsivas ao EGF e ao IGF-I mesmo após as culturas serem pré-tratadas com 199 por 24h e 48h. Nossos resultados mostram que o aumento na proliferação induzido pelo EGF é de 89,79% e o induzido pelo IGF-I é de 36,48% em 24h (figura 21). Já em 48h o EGF aumenta em 96,27% a proliferação e o IGF-I induz aumento de 31,01% (figura 22).



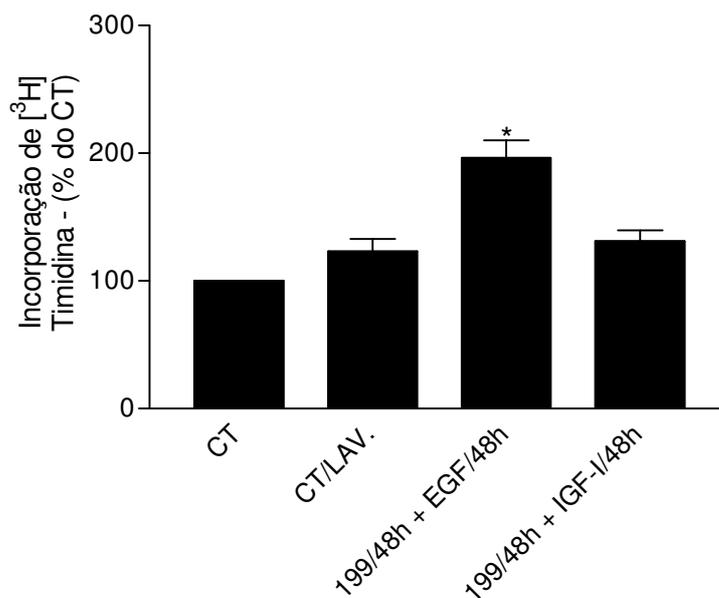
**Figura 19** – Papel não inibitório de IGF-I (10ng/mL) sobre o efeito proliferativo de EGF (0,1ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura de tratamento intercalado de 48h com cada fator. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 500 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 96 horas); CT/LAV.(tratamento nas 48 horas iniciais com meio de cultura controle e troca por meio fresco nas 48 horas finais); EGF/96h (tratamento crônico com EGF por 96 horas); IGF-I/96h (tratamento crônico com IGF-I por 96 horas); EGF/48h+IGF-I/48h (tratamento intercalado com EGF por 48 horas e substituição por tratamento com IGF-I nas 48 horas finais). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 7-11) (\*  $p < 0,001$  em relação ao controle de 96h).



**Figura 20** – Papel inibitório de IGF-I (10ng/mL) sobre o efeito proliferativo de EGF (0,1ng/mL) em células da retina de ratos neonatos mantidas em cultura de tratamento intercalado de 48h com cada fator. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 500 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 96 horas); CT/LAV.(tratamento nas 48 horas iniciais com meio de cultura controle e troca por meio fresco nas 48 horas finais); EGF/96h (tratamento crônico com EGF por 96 horas); IGF-I/96h (tratamento crônico com IGF-I por 96 horas); IGF-I/48h+EGF/48h (tratamento intercalado com IGF-I por 48 horas e substituição por tratamento com EGF nas 48 horas finais). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 7-9) (\*  $p < 0,001$  em relação ao controle de 96h).

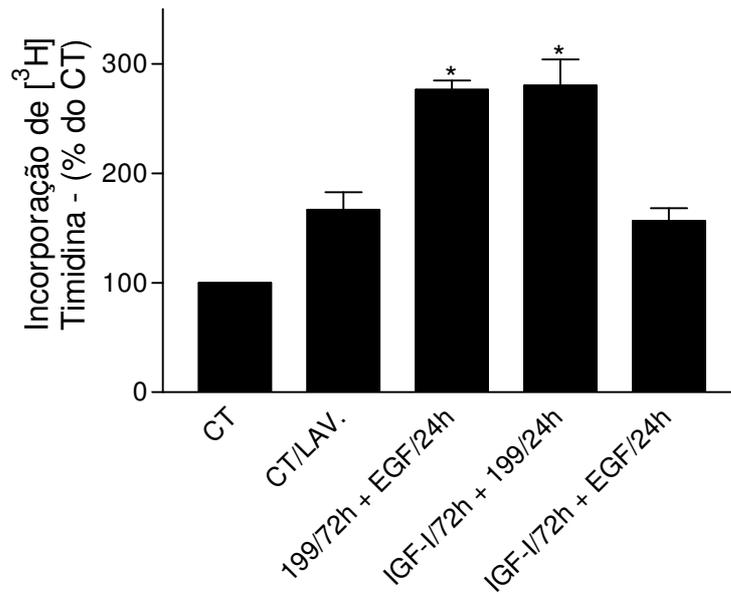


**Figura 21** – Pré-tratamento das células da retina de ratos neonatos por 24 horas com meio controle não interfere na responsividade ao tratamento com IGF-I (10ng/mL) e EGF (0,1ng/mL). O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 1000 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 48 horas); CT/LAV.(tratamento nas 24 horas iniciais com meio controle e troca por meio fresco nas 24 horas finais); 199/24h+EGF/24h (tratamento com meio nas 24 horas iniciais e substituição por tratamento com EGF nas 24 horas finais); 199/24h+IGF-I/24h (tratamento com meio nas 24 horas iniciais e substituição por tratamento com IGF-I nas 24 horas finais). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 3-7) (\*  $p < 0,001$  em relação ao controle de 48h).



**Figura 22** – Pré-tratamento das células da retina de ratos neonatos por 48 horas com meio 199 não interfere na responsividade ao tratamento com IGF-I (10ng/mL) e EGF (0,1ng/mL) em cultura de tratamento intercalado de 48h com cada fator. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 500 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle por 96 horas); CT/LAV.(tratamento nas 48 horas iniciais com meio de cultura e troca por meio fresco nas 48 horas finais); 199/48h+EGF/48h (tratamento com meio nas 48 horas iniciais e substituição por tratamento com EGF nas 48 horas finais); 199/48h+IGF-I/48h (tratamento com meio nas 48 horas iniciais e substituição por tratamento com IGF-I nas 48 horas finais ). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 5-7) (\* p< 0,001 em relação ao controle de 96h).

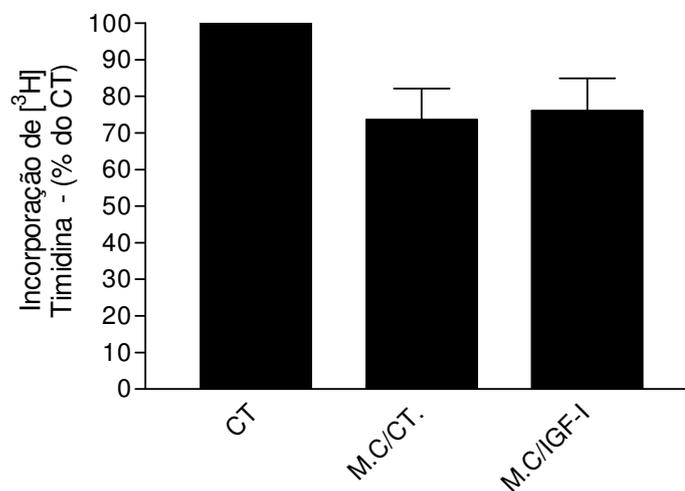
Baseado nestes resultados fizemos uma experiência em que as células foram inicialmente tratadas por 72h com IGF-I e em seguida tratadas com EGF por 24h. Na figura 23 podemos observar que o tratamento prévio com IGF-I torna as células bem menos responsivas ao EGF.



**Figura 23** – O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 500 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 96 horas); CT/LAV. (tratamento nas 72 horas iniciais com meio controle e troca por meio fresco nas 48 horas finais); 199/72h+EGF/24h (tratamento com meio 199 nas 72 horas iniciais e substituição por tratamento com EGF nas 24 horas finais); IGF-I/72h+199/24h (tratamento com IGF-I nas 72 horas iniciais e substituição por tratamento com meio 199 nas 24 horas finais); IGF-I/72h+EGF/24h (tratamento com IGF-I nas 72 horas iniciais e substituição por tratamento com EGF nas 24 horas finais). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 4-6) (\* p < 0,001 em relação ao controle de 96h).

A partir deste último resultado surgiu a hipótese do tratamento com IGF-I por 72h induzir à liberação de algum fator que tivesse um papel na inibição da proliferação celular. Para analisar esta possibilidade tratamos as culturas com IGF-I por 72h e recolhemos o meio condicionado que foi armazenado à -20°C até o momento da experiência. Na figura 24 podemos observar que o tratamento com meio condicionado com IGF-I (diluição 1:1) induz uma diminuição na proliferação celular. Entretanto, quando comparamos o efeito do meio condicionado controle com o do meio condicionado tratado com IGF-I verificamos que o efeito sobre a proliferação foi o mesmo, ou seja uma inibição

de aproximadamente 30% (figura 24). Este último resultado pode parecer incoerente, mas analisando a figura 23 observamos que quando lavamos as culturas controle após 72h e colocamos meio de cultura fresco observamos um aumento na proliferação. Neste sentido, podemos supor que tanto nas culturas controle como nas tratadas estejam sendo acumuladas moléculas capazes de exercer um efeito inibitório sobre a proliferação celular.



**Figura 24** – Efeito do meio condicionado sobre a proliferação de células da retina mantidas por 48h. O valor da radioatividade (cpm/placa) da cultura controle foi considerado 100% (aproximadamente 1000 cpm/placa). CT (tratamento com meio de cultura controle (5% de soro fetal bovino) por 48 horas); M.C/CT. (tratamento por 48 horas com meio condicionado de 72h controle); M.C/IGF-1 (tratamento por 48 horas com meio condicionado de culturas tratadas com IGF-1 por 72h). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão de pelo menos três experimentos independentes (n = 9) (\* p< 0,001 em relação ao controle de 48h).

## 5. DISCUSSÃO

O IGF-I e o EGF são fatores de crescimento que desempenham importantes funções nos processos de proliferação, sobrevivência e diferenciação em diferentes sistemas sendo, por este motivo, considerados como moléculas ubíquas. No que concerne ao sistema nervoso estes fatores têm um papel de destaque no processo de proliferação/diferenciação de células multipotentes presentes em diferentes regiões tais como: hipocampo, diencéfalo, telencéfalo, zona subventricular e retina (Weuste, 2006; Gu et al., 2007). Assim, os estudos acerca da função destas moléculas no processo de proliferação/diferenciação de células tronco ajudarão a consolidar o conhecimento sobre os processos relativos ao desenvolvimento, bem como permitirão que sejam estabelecidos protocolos experimentais que levem a estimular, de forma controlada, o processo de proliferação e diferenciação de células tronco visando as estratégias terapêuticas que envolvem terapia celular.

Nosso grupo vem estudando o efeito dos tratamentos com fatores de crescimento sobre o processo de proliferação de células da retina de ratos neonatos, mantidas em cultura, por diferentes intervalos de tempo. Inicialmente avaliamos o papel do FGF2 na proliferação de células da retina e observamos que este fator induz um aumento na proliferação (100% em relação ao controle) de maneira concentração dependente sendo o melhor efeito obtido com 25ng/mL (Guilarducci-Ferraz, et al., 2008). Outros resultados do nosso grupo mostram, que o tratamento das culturas por 48h, tanto com EGF como com IGF-I, igualmente induz um aumento na proliferação de células da retina. O efeito destes dois fatores também depende da concentração utilizada e do

tempo de tratamento das culturas. O tratamento com EGF na concentração de 0,1ng/mL, induz um aumento na proliferação de 100% (Miranda, 2008) e o tratamento com IGF-I, na concentração de 10ng/mL, induz um aumento de 50% na taxa de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina (Medina, 2008). Desta maneira, nossas evidências iniciais demonstram que tanto o FGF2 como o EGF e o IGF-I são capazes de estimular a proliferação de células da retina.

Quando nosso grupo analisou a participação do soro fetal bovino, no efeito proliferativo do FGF2 e do EGF, foi observado que mesmo na ausência de soro tanto o FGF2 como o EGF ainda eram capazes de induzir a proliferação de células da retina (Guilarducci-Ferraz, et al., 2008; Pinto, 2008). Isso significa que os receptores para estes fatores, bem como toda a plataforma de sinalização, devem ser expressos mesmo na ausência de soro fetal bovino. Entretanto, quando tratamos as culturas com IGF-I, sem a presença de soro fetal bovino, o efeito proliferativo foi totalmente abolido. Este resultado sugere que, as vias de sinalização ativadas pelo IGF-I necessitem de possíveis fatores tróficos presentes no soro, para a sua expressão e ou ativação. Talvez a própria expressão dos receptores de IGF-I dependa de fatores tróficos presentes no soro tais como o EGF e o FGF2, dentre outros.

Baseado nos resultados que tínhamos acerca dos efeitos do EGF e do IGF-I sobre a proliferação de células da retina nos perguntamos se o tratamento simultâneo induziria um efeito sinérgico. Tratamos nossas culturas com IGF-I (10ng/mL) e com EGF (0,1ng/mL) por períodos de 24, 48 e 72h e não observamos, em nenhum dos casos, um efeito aditivo sobre a proliferação celular. Ao contrário, pudemos observar que o tratamento das culturas por 72h na presença dos dois fatores, induzia uma significativa diminuição na

proliferação celular quando comparada ao efeito do tratamento apenas com EGF. Este resultado sugere que a presença do IGF-I possa modular a resposta proliferativa das células ao EGF e que este efeito dependa do tempo de exposição aos dois fatores já que apenas em 72h pudemos claramente observar o efeito. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Arsenijevic e colaboradores que analisaram o efeito proliferativo do tratamento simultâneo com EGF e IGF-I em células tronco do estriatum. Os autores não observaram um efeito aditivo dos fatores sobre a proliferação celular. (Arsenijevic et al., 2001). Entretanto, nossos resultados contrastam com os dados apresentados por Han e colaboradores em culturas de astrócitos. Esses autores demonstraram que o tratamento simultâneo com IGF-I (50ng/mL) e EGF (0,25ng/mL) induzia uma potenciação no efeito proliferativo (Han et al., 1992).

Esta diferença nos resultados obtidos, pelos diferentes grupos, pode refletir uma particularidade no processo de sinalização em cada uma das células e ou pode estar relacionada com o estágio de diferenciação de cada uma delas. Igualmente, nossos dados nos permitem sugerir que tanto o EGF como o IGF-I estejam agindo sobre a mesma população de células, pois se fossem populações distintas deveríamos ter encontrado um efeito aditivo. Dados prévios do nosso laboratório, obtidos com a marcação para BrdU, indicam que o EGF esteja induzindo a proliferação de células que apresentam morfologia comparável ao padrão glial. Assim, nosso próximo passo será analisar quais as células que estão proliferando após o tratamento com IGF-I para que possamos compará-las às que proliferam após tratamento com EGF.

A sinalização dos receptores para o IGF-I e para o EGF apresenta características peculiares de acordo com as células estudadas. Em células tumorais tem sido bem descrita a participação do EGF e do IGF-I no processo de proliferação celular. Além destas moléculas apresentarem efeito sinérgico sobre a proliferação celular, já foi descrito que o bloqueio de uma das vias, por exemplo bloqueio dos receptores EGF, leva a um mecanismo compensatório na sinalização dos receptores de IGF-I. Este fato faz com que a proliferação seja mantida em taxas elevadas (Roskoski, 2004; Chakravarti et al., 2002). Igualmente foi demonstrado que a inativação do gene do receptor de IGF-I em células de câncer de mama leva a um aumento considerável nos níveis de fosforilação do receptor de EGF (Riedemann et al., 2007). Por isso, estratégias terapêuticas que visam bloquear o receptor de EGF ou o de IGF-I têm sido ineficientes no controle da proliferação de células tumorais (Warshamana-Greene et al., 2005).

Um resultado interessante acerca do efeito do IGF-I na proliferação de células da retina está relacionado ao seu efeito temporal. Medina observou que o efeito do IGF-I somente podia ser observado nas primeiras 48h em cultura. Em 72h o efeito proliferativo não mais podia ser observado. Interessante salientar que a perda do efeito proliferativo se dá antes que as células tenham atingido a confluência (Medina, 2008). Este é um resultado diferente daquele que havíamos obtido tanto para o FGF2 como para o EGF pois estes fatores eram capazes de induzir a proliferação celular até o momento em que as células tivessem atingido a confluência nas placas de Petri (Guilarducci-Ferraz, et al., 2008; Miranda, 2008). Desta maneira podemos sugerir que o IGF-I

induza, por um período de 48h, a proliferação de células da retina e este efeito é auto regulado no ambiente da cultura.

Um outro resultado interessante acerca do efeito do IGF-I está relacionados ao fato do seu efeito ser mediado pela ativação dos receptores de EGF. Quando as culturas foram tratadas com IGF-I na presença do inibidor dos receptores de EGF, o efeito proliferativo foi totalmente abolido (Medina, 2008). Desta maneira nossas evidências sugeriam que o IGF-I era capaz de aumentar a proliferação através da ativação dos receptores de EGF, mas este efeito era restrito a uma janela temporal. Esta longa janela temporal nos indica que o IGF-I induza transformações no ambiente da cultura que levam a uma perda do efeito proliferativo induzido por este fator.

Em 1995, foi demonstrado que a ativação dos receptores de IGF-I levava ao seu processo de internalização a partir do qual ocorria a ativação de vias de sinalização que mediavam a transativação dos receptores de EGF (Chow et al.,1998; Roudabush et al., 2000). Em nosso laboratório Medina observou que o efeito do IGF-I era abolido quando as culturas eram tratadas com um inibidor da interiorização dos receptores (Medina 2008), mas Pinto observou que o efeito do EGF não era abolido quando a interiorização dos receptores era bloqueada (Pinto, 2008). Sabendo-se que o efeito do IGF-I em nossas culturas depende da ativação dos receptores de EGF, podemos sugerir que o tratamento com IGF-I possa estar induzindo a transativação dos receptores de EGF, por um mecanismo que envolva a interiorização dos receptores de IGF-I, como já descrito por Chow e colaboradores em 1998 e por Roudabush e colaboradores em 2000.

Baseado nos resultados obtidos com os tratamentos simultâneos, nos perguntamos como as células responderiam a tratamentos alternados com EGF e IGF-I. Nossos resultados demonstram que culturas pré-tratadas por 24 horas com EGF e posteriormente com IGF-I por mais 24 horas, apresentam percentuais de proliferação semelhantes aos das culturas tratadas apenas com IGF-I por 48h. Isso significa que o pré-tratamento com EGF por 24h não torna as células mais responsivas ao IGF-I. Analisando a literatura observamos que os nossos resultados estão de acordo com aqueles obtidos em células embrionárias do estriatum. Neste trabalho, os autores demonstraram que o pré tratamento com EGF por 24 horas não aumenta a responsividade das células ao tratamento com IGF-I nas 24 seguintes (Arsenijevic et al., 2001).

Entretanto, quando as células foram pré-tratadas com IGF-I por 24h e sequencialmente tratadas com EGF por mais 24h observamos a potenciação do efeito proliferativo. Esse resultado indica que o tratamento com IGF-I por 24h induza um aumento na responsividade das células ao EGF. Esse aumento na responsividade pode ser mediado por um aumento na expressão de receptores para o EGF o que poderia justificar um aumento na resposta proliferativa. Futuramente pretendemos analisar se o tratamento com IGF-I induz um aumento na expressão dos receptores de EGF, ou um aumento nos processos de transativação deste receptor, ou ainda um aumento na disponibilização deste fator trófico no meio extracelular.

Quando realizamos tratamentos alternados com EGF ou IGF-I por 48 horas observamos que o pré tratamento com EGF por 48h seguido do tratamento com IGF-I por 48h induz efeito proliferativo semelhante ao tratamento crônico com EGF por 96h. Este resultado foi de certa forma

surpreendente, pois o tratamento com IGF-I por 48h induz uma proliferação média em torno de 50%. Entretanto, o tratamento com IGF-I por 48h após um tratamento prévio com EGF por 48h, induziu uma taxa de proliferação maior do que 50%. Uma possível explicação para este resultado poderia ser o fato do tratamento com EGF por 48h aumentar a expressão dos receptores para IGF-I ou mesmo para o EGF e desta forma possibilitar um aumento nas taxas de proliferação. Assim, pretendemos analisar a expressão dos receptores de IGF-I e de EGF em culturas tratadas por 48h com EGF.

Em contrapartida quando o IGF-I foi fornecido nas 48 horas iniciais e logo após o EGF foi fornecido por igual período observou-se nitidamente uma tendência de redução no efeito proliferativo comparado ao observado com o tratamento crônico com EGF por 96h. Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Arsenijevic e colaboradores em 2001 que demonstraram que a pré exposição de células (E14) do estriatum de ratos ao IGF-I por 5 dias e posterior tratamento com EGF, induzia uma diminuição da responsividade ao EGF.

É interessante ressaltar que as células mantidas em cultura, na presença de meio de cultura controle, por 24h ou por 48h ainda são capazes de responder ao EGF e ao IGF-I aumentando a taxa de proliferação celular. Este resultado nos sugere que os mecanismos de sinalização sejam preservados após estes períodos in vitro e não justificaria, por si só, a tendência na redução da proliferação descrita acima.

Retornando a análise do gráfico que representa o resultado obtido com o tratamento com IGF-I nas primeiras 48h e posterior tratamento com EGF por mais 48h observamos que há uma tendência de diminuição do efeito do EGF.

Nossa hipótese era de que com o passar do tempo em cultura, o tratamento com IGF-I iria transformando as células o que levaria a uma diminuição na responsividade ao EGF. Se nossa hipótese estivesse correta, se tratássemos as células por 72h com IGF-I e depois tratássemos com EGF por 24h, a proliferação induzida pelo EGF deveria estar diminuída quando comparada a das células que receberam o tratamento com EGF apenas nas últimas 24h. Quando analisamos o resultado desta experiência observamos que de fato o tratamento por 72h com IGF-I diminui a responsividade ao EGF. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Arsenijevic em 2001. O autor demonstrou que o tratamento por 3 e 5 dias de culturas de células embrionárias do estriatum com IGF-I diminuía a responsividade ao EGF. Neste trabalho também foi observado que quanto maior fosse o tempo de exposição ao IGF-I maior era a perda da responsividade ao EGF.

Este último efeito por nós observado poderia ser mediado por moléculas solúveis secretadas no meio de cultura e que estivessem controlando a proliferação celular. Para testar esta hipótese resolvemos tratar as culturas com IGF-I por 72h e após este período recolhemos o meio condicionado para posteriormente tratarmos as culturas com este meio na diluição de 1:1 e avaliamos o efeito sobre a proliferação celular. Os resultados dos experimentos com meios condicionados mostraram que o meio condicionado de culturas tratadas com IGF-I induzia um decréscimo na proliferação, porém o meio condicionado controle também inibia a proliferação. Este resultado instigante indica que tanto nas culturas controle como nas culturas tratadas com IGF-I estejam sendo liberadas moléculas capazes de diminuir a taxa de proliferação das células da retina. De fato isso parece ser verdadeiro, pois quando

retiramos o meio de cultura após 72h de incubação e adicionamos meio fresco observamos um incremento na taxa de proliferação. Nossas próximas experiências visarão analisar o efeito do meio condicionado em outras diluições na tentativa de avaliar se o meio condicionado de culturas tratadas com IGF-I é mais eficiente em diminuir a proliferação do que o meio condicionado de culturas controle. Acreditamos que a presença de IGF-I esteja mediando a produção e liberação de moléculas capazes de regular o processo de proliferação de células da retina.

Dados da literatura demonstram que o tratamento de neurônios com IGF-I induz um aumento na síntese de BDNF e de seu receptor Trk B (Mattson et al., 2004). Ao analisar as vias de sinalização que levam ao aumento na produção de BDNF estimulada por IGF-I em neurônios corticais, foi demonstrada a participação da via da ERK (McCusker et al., 2006). Assim, existem vários relatos na literatura acerca do papel do IGF-I no controle da síntese do BDNF. Um outro exemplo interessante é o aumento na expressão do BDNF (Ding et al., 2006) observada após o exercício físico, que é mediada pelo aumento nos níveis de IGF-I circulante (Carro et al., 2000).

Dados prévios do nosso laboratório demonstram que o tratamento de células da retina em cultura com a neurotrofina BDNF, por 48h, induz uma diminuição de 50% na proliferação celular. Neste mesmo trabalho também demonstramos que o tratamento de culturas controle com K-252a, que é um inibidor dos receptores Trk das neurotrofinas, induz um aumento de 100% na proliferação das células (Santos et al., 2003). Este resultado sugere que as células da retina sejam capazes de produzir e liberar neurotrofinas que desempenhem um importante papel no controle da proliferação celular.

Baseados nesse conjunto de resultados decidimos quantificar qual seria a expressão de BDNF em culturas tratadas com IGF-I por 72h. Escolhemos este intervalo de tempo, pois em 72h o IGF-I não mais apresenta um efeito proliferativo. Nossos resultados ainda são muito preliminares e não nos permitem afirmar que o IGF-I esteja aumentando a síntese do BDNF, apesar de termos encontrado um aumento em algumas experiências realizadas. Futuras experiências serão feitas para melhor compreendermos se de fato o IGF-I está modulando a síntese de BDNF em nossas culturas.

Analisando os nossos resultados em conjunto podemos sugerir que o tratamento das culturas com IGF-I induza, de maneira tempo dependente, uma diminuição na responsividade ao EGF. Esse resultado nos parece interessante pois nesta condição o IGF-I poderia ser um importante regulador do processo de proliferação de células da retina. Nossos próximos passos serão no intuito de esclarecer o mecanismo de ação do IGF-I e de identificar qual a população que responde a este fator trófico.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados podemos concluir que:

- As vias de sinalização ativadas pelo IGF-I necessitam de possíveis fatores tróficos presentes no soro, para a sua expressão ou ativação. Talvez a própria expressão dos receptores de IGF-I dependa de fatores tróficos presentes no soro.
- Tanto o EGF (0,1 ng/mL) como o IGF-I (10 ng/mL) estão agindo sobre a mesma população de células, pois se fossem populações distintas deveríamos ter encontrado um efeito aditivo quando estes dois fatores foram fornecidos de forma simultânea.
- A presença do IGF-I pode modular a resposta proliferativa das células ao EGF e este efeito depende do tempo de exposição aos dois fatores já que em 72h de exposição simultânea, pudemos observar claramente este efeito inibitório.
- O pré-tratamento com EGF por 24h não torna as células mais responsivas ao IGF-I, porém quando as células são primeiramente tratadas com IGF-I por 24h e sequencialmente tratadas com EGF por mais 24h é observada a potenciação do efeito proliferativo, demonstrando que o pré-tratamento feito, neste intervalo de tempo, promove um aumento da responsividade das células ao EGF.
- Resultados de nossos experimentos com IGF-I nas primeiras 48h e posterior tratamento com EGF por mais 48h apresentam uma tendência de diminuição do efeito do EGF, mostrando que a ação de IGF-I sobre o efeito de EGF esteja restrita a uma janela temporal, a qual indica que o IGF-I induza

transformações no ambiente da cultura levando a uma perda do efeito proliferativo induzido por EGF.

- Acreditamos que a presença de IGF-I esteja mediando à produção e liberação de moléculas como o BDNF ou seu receptor que induziriam uma diferenciação celular com conseqüente parada do processo de proliferação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUZZAHAB, M. J., SCHENEIDER, A., GODDARD, A., GRIGORESCU, F., LAUTIER, C., KELLER, E., KIESS, W., KLAMMT, J., KRATZSCH, J., OSGOOD, D., PFAFFLE, R., RAILE, K., SEIDEL, B., SMITH, R. J., CHERMAUSEK, S. D. (2003). IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med.* 349:2211-2222.

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

ANDREAZZOLI, M. (2009). Molecular Regulation of Vertebrate Retina Cell Fate. *Birth Defects Research(Part C)* 87:284–295.

ARSENIJEVIC, Y., WEISS, S., BERNARD; SCHNEIDER, B. and AEBISCHER, P. (2001). Insulin Like Growth Factor-I is Necessary for Neural Stem Cell Proliferation and Demonstrates Distinct Actions of Epidermal Growth Factor and Fibroblast Growth Factor-2. *The Journal of Neuroscience.* (18):7194-7202.

ARSENIJEVIC, Y., WEISS, S. (1998). Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 18(6):2118-28.

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

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

BALBIS, A., PARMAR, A., WANG, Y., BAQUIRAN, G. and POSNER, B. I (2007). Compartmentalization of signaling competent Epidermal Growth Factor Receptors in the endosomes. *Endocrinology.* doi:10.1210/en.2006-1674.

BARNA, B. P., MATTERA, R., JACOBS, B. S., DRAZBA, J., ESTES, M. E., PRAYSON, R. A. and BARENT, G. H. (2001). Epidermal growth factor

regulates astrocyte expression of the interleukin-4 receptor via a MAPK-independent pathway. *Cellular Immunology*. 208: 18-24.

BARNES, C. J. and KUMAR, R. (2003). Epidermal Growth Factor Receptor family tyrosine kinases as signal integrators and therapeutic targets. *Cancer and Metastasis Reviews*. 22:301-307.

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

BECK, K. D., POWELL-BRAXTON, L., WIDMER, H. R., VALVERDE, J., HEFTI, F. (1995). IGF1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron*. 14(4):717-30.

BERZAGHI, M. P., COOPER, J., CASTRÓN, E., ZAFRA, F., SOFRONIEW, M., THOENEN, H. and LINDHOLM, D. (1993). Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat hippocampus. *J. Neurosci*. 13, 3818-3826.

BIRKENKAMP, K. U., COFFER, P. J. (2003). Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochemistry Society Transaction*. 31:292-297.

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

CABODI, S., MOROT, L., BERGATTO, E., ERBA, E. B. DI STEFANO, P., TURCO, E., TARONE, G. and DEFILIPPI, P. (2004). Integrin regulation of Epidermal Growth Factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochemical Society Transactions*. 32(3); 438-442.

CARRO, E. and TORRES-ALEMAN I. (2006). Serum insulin-like growth factor I in brain. *Keio J Med*. 2006 Jun;55(2):59-63.

CARRO, E., NUNEZ, A., BUSIGUINA, S., TORRES-ALEMAN, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J. Neurosci.* 20:2926-2933.

CEDIEL, R., RIQUELME R., CONTRERAS J., DI ´AZ A. and VARELA-NIETO I. (2006). Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *European Journal of Neuroscience.* 23: 587–590, 2006. *Cell Fate. Birth Defects Research* 87:284–295.

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

CEPKO, C. L. DYER, M. A. (2001). Regulating proliferation during retinal development. *Nature Reviews– Neuroscience* 2(5):333-42.

CHAKRAVARTI, A., LOEFFLER, J. S., DYSON, N. J. (2002). Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-Kinase signaling. *Cancer Res.* 62:200-207.

CHEN, H., LIU, B. and NEUFELD, A. H. (2007). Epidermal Growth Factor Receptor in adult retinal neurons of rat, mouse and human. *The Journal of Comparative Neurology.* 500: 299-310.

CHENG, C. M., MERVIS, R. F., NIU, S. L., SALEM, N. JR., WITTERS, L. A., TSENG, V., REINHARDT, R., BONDY, C. A. (2003). Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *J Neurosci Res.* 1;73(1):1-9.

CHENG, C. M., JONCAS, G., REINHARDT, R. R, FARRER, R., QUARLES, R., JANSSEN, J., McDONALD, M. P., CRAWLEY, J. N., POWEL-BRAXTON, L., BONDY, C. A. (1998). Biochemical and morphometric analyses show that myelination in the insulin-like growth factor 1 null brain is proportionate to its neuronal composition. *J. Neurosci.* 18: 5673-5681.

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

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

- CHOW, J., CONDORELLI, G. and SMITH, R. (1998). Insulin-like growth factor-I mitogenic signaling in 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Endocrinology*. 139:11638-11644.
- CHRYSIS, D., CALIKOGLU, A. S., YE, P., D'ERCOLE, A. J. (2001). Insulin-like growth factor I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J. Neurosci.* 1; 21(5):1481-1489.
- COHEN, S. (2004). The origins of growth factors: NGF and EGF. *New York Academy of Science*. 1038: 1-5.
- COIMBRA, T. M. (1997). Participação de fatores de crescimento na regeneração celular pós-necrose tubular aguda. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 19(2):169-175.
- DALLE, S., RICKETTS, W., IMAMURA, T. and VOLLENWEIDER, P. (2001) Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. *Journal of Biological Chemistry*. 11:15688-15695.
- DE PABLO, F. and DE LA ROSA, J. (1995). The Developing CNS: scenario for the action of pro-insulin, insulin and insulin-like growth factors. *Trends in Neuroscience*. 18:143-150.
- DECKER, S. J. (1995). Nerve growth factor-induced growth arrest and induction of p21<sup>Cip1/WAF1</sup> in NIH-3T3 cells expressing TrkA. *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (52): 30841-30844.
- DING, Q., VAYNMAN, S., AKHAVAN, M., YING, Z., GOMEZ-PINILHA, F. (2006). Insulin-Like growth factor prevents the amblyopic effects of monocular deprivation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. 88:8811-8815.
- DOWLING, J. E. "Retina." *Enc. Hum. Biol.*, 1991, v.6, p. 615-631.
- DUAN, C. and XU, Q. (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *General and Comparative Endocrinology*. 14:44-52.

DULIC, V., LEES, E. and REED, S. I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*. 257:1958-1961.

DYER, M. A., CEPKO, C. L. (2001). Regulating proliferation during retinal development. *Nature Reviews– Neuroscience* 2(5):333-42.

FREEMAN, M. R., CINAR, B., KIM, J., MUKHOPADHYAY, N. K., VIZIO, D. di., ADAM, R. M. and SOLOMON, K. R. (2007). Transit of hormonal and EGF receptor-dependent signals through cholesterol-rich membranes. *Steroids*. 72:210-217.  
*function.Keio J. Med.* 55:59–63

GALE, N. W, KAPLAN, S., LOWENSTEIN, E. J., SCHELESSINGER, J. and BAR-SAQI, D. (1993) .Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange of Ras. *Nature*. 363(6424):88-92.

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

GIORGETTI, S., BALLOTTI, R., KOWALSKI-CHAUVEL, A., TARTARE, S. and OBBERGHEN, E. V. (1993). The insulin and insulin-like growth factor-I receptor substrate IRS-1 associates with and activates phosphatidylinositol 3-kinase in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. 268:7358-7364.

GIUDICELLI, J. (2001). Surfing the insulin signaling web. *European Journal of Clinical Investigation*. 31:966-977.

GLASER, T., POLLARD, S. M., SMITH, A. and BRÜSTLE, O. (2007). Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *Plos ONE*. 2(3): 298.

GOBIN, A. S. and WEST, J. L. (2003). Effects of Epidermal Growth Factor on fibroblast migration through biomimetic hydrogels. *Biotechnology Progress*. 19:1781-1785.

GOMES, F. C. A., SPOHR, T. C. L. S., MARTINES, R. and NETO, V. M. (2001). Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34: 611-620.

GRUDINKIN, P. S., ZENIN, V. V., KROPOTOV, A. V., DOROSH, V. N. and NIKOLSKY. (2007). EGF-induced apoptosis in A431 cells is dependent on Stat1, but not on Stat3. *European Journal of Cell Biology*. DOI:10.1016/j.ejcb.2007.05.009

GU, P., HARWOOD, L. J., ZHANG, X., WYLIE, M., CURRY, W. J. and COGLIATI, T. (2007). Isolation of retinal progenitors and stem cells from the porcine eye. *Molecular Vision*. 13:1045-1057.

GUILARDUCCI-FERRAZ, C. V., DA SILVA, G. M., TORRES, P. M., DOS SANTOS, A. A. and ARAUJO, E. G. (2008). The increase in retinal cells proliferation induced FGF2 is mediated by tyrosine and PI3K. *Neurochemistry Research*. 33(5):754-64.

GUREN, T.K., ABRAHAMSEN, H., THORESEN, H., BABAIE, E., BERG, T. and CHRISTOFFERSEN, T. (1999). EGF – induced activation of Stat1, Stat3, and Stat5b is unrelated to stimulation of DNA synthesis in cultured hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 258: 565-571.

HAN, V. K. M., SMITH, A., MYINT, W., NYGARD, KAREN and BRADSHAW, S. (1992). Mitogenic Activity of Epidermal Growth Factor on Newborn Rat Astroglia: Interaction with Insulin-Like Growth Factors. *Endocrinology*.131:1134-1142.

HAN, V. K. M., LAUDER, J. M., D'ERCOLE, A. J. (1987). Characterization of somatomedin/Insulin-like growth factor receptors and correlation with biologic actions in cultured neonatal rat astroglial cells. *J. Neurosci*. 7, (2):501-511.

HASSAN, S., DOBNER, P. R. and CARRAWAY, R. E. (2004). Involvement of MAP-kinase, PI3-kinase and EGF receptor in the stimulatory effect of Neurotensin on DNA synthesis in PC3 cells. *Regulatory Peptides*. 120: 155-166.

HENSON, E. S. and GIBSON, S. B. (2006). Surviving cell death through Epidermal Growth Factor (EGF) signal: implications for cancer therapy. *Cell Signaling*. 18: 2089-2097.

HEO, J. S., LEE, Y. J. and HEN, H. J. (2005). EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of  $Ca^{2+}$  influx and p42/44 MAPKs. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. 290:123-133.

- HERBST, R. S. (2004). Review of Epidermal Growth Factor Receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 59(2): 21-26.
- HODGE, R. D., D'ERCOLE, A. J., O'KUSKY J. R. (2004). Insulin-like growth factor-I accelerates the cell cycle by decreasing G1 phase length and increases cell cycle reentry in the embryonic cerebral cortex. *J. Neurosci*. 24, (45):10201-10210.
- HOLLBORN, M., TENCKHOFF, S., JAHN, K., IANDIEV, I., BIEDERMANN, B., SCHNURRBUSCH, U. E. K., LIMB, G. A., REICHNBACH, A., WOLF, S., WIEDEMANN, P., KOHEN and BRINGMANN, A. (2005). Changes in retinal gene expression in proliferative vitreoretinopathy: glial cell expression of HB-EGF. *Molecular Vision*. 11:397-413.
- HSIEH, M. and CONTI, M. (2005). G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine system. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 16(7): 320-326.
- IKEDA, T. and PURO, D. G. (1995). Regulation of retinal glial cell proliferation by antiproliferative molecules. *Experimental Eye Research*. 60:435-443.
- JIN, Y., ZHANG, C., ZENG, W., TAYA, K. and TAN, T. Q. (2007) Interactive actions of prostaglandin and epidermal growth factor to enhance proliferation of granulosa cells from chicken prehierarchical follicles. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 83(4):285-94.
- JING, B., XIAN-SHENG, L., YONG-JIAN, X., ZHEN-XIANG, Z., MIN, X. and WANG, N. (2007). Extracellular signal-regulated kinase activation in airway smooth muscle cell proliferation in chronic asthmatic rats. *Acta Physiologica Sinica*. 59 (3): 311-318
- JOHNSTONE, E. D., SIBLEY, C.P., LOWEN, B. and GUILBERT, L. J. (2005). Epidermal Growth Factor stimulation of trophoblast differentiation requires MAPK11/14 (p38 MAP kinase) activation. *Biology of Reproduction*. 73: 1282-1288.
- JONES, J. I. and CLEMMONS, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Review*. 16:3-33.

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

KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26:239-257.

KHOLODENKO, B. N. (2007). Untangling the signaling wires. *Nature*. 9(3): 247-249.

KOPROVICA, V., CHO, K. S., PARK, J. B., YIU, G., ATWAL, J., GORE, B., KIM, J. A., LIN, E., TESSIER-LAVIGNE, M., CHEN, D. F. and HE, Z. (2005). EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science*. 310: 106-110.

KUMAR, N., AFEYAN, R., SHEPPARD, S., HARMS, B. and LAUFFENBURGER, D. A. (2007). Quantitative analysis of Akt phosphorylation and activity in response to EGF and insulin treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 354:14-20.

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

LE ROITH, D. (2003). The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res*. 4(4):205-12.

MARTIN, N. P., MOHNEY, R. P., DUNN, S., DAS, M., SCAPPINI, E. and O'BRYAN, J. P. (2006). Intersectin regulates Epidermal Growth Factor Receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Molecular Pharmacology*. 70 :1643-1653.

MATTSON, M. P., MAUDSLEY, S., BROWEN, M. (2004). A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-I, BDNF and serotonin. *Ageing research reviews*. 3:445-464.

McCUSKER, R. H., McCREA, K., ZUNICH, S., DANTZER, R., BROUSSARD, S. R., JOHNSON, R. W. and KELLEY, K. W. (2006). Insulin like growth factor-I

enhances the biological activity of brain derived neurotrophic factor on cerebrocortical neurons. *The Journal of Neuroscience*. 179:186-190.

McMORRIS, F. A., MOZELL R. L., CARSON, M. J., SHINAR, Y., MEYER, R. D., MARCHETTI, N. (1993). Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann NY Acad Sci*. 692:321-334.

MEDINA, S. V. (2008). IGF-I aumenta a proliferação de células da retina em cultura: Vias de sinalização envolvidas. [s.n.], Niterói. Rio de Janeiro.

MIRANDA, R. A. A. (2008). Efeito proliferativo do EGF em células da retina in vitro: vias de sinalização envolvidas. [s.n.], Niterói. Rio de Janeiro.

MORGAN, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*. 374:551-555.

MUALLEM S. and MOE O. W. (2007). When EGF is offside, magnesium is wasted. *The Journal of Clinical Investigation*. 117(8): 2086-2089.

O`KUSKY, J. R., YE, P., D`ERCOLE, A. J. (2003). Increased expression insulin-like growth factor-I augments the progressive phase of synaptogenesis without preventing synapse elimination in the hypoglossal nucleus. *J. Comp. Neurol*. 464:382-391.

OBBERGHEN, E. V., BARON, V., DELAHAYE, L., EMANUELLI, B., FILIPPA, N., GIORGETTI-PERALDI, S., LEBRUN, P., MOTHE-SATNEY, I., PERALDI, P., ROCCHI, S., SAWKA-VERHELLE, D., TARTARE-DECKERT, S., GIUDICELLI, J. (2001). Surfing the insulin signaling web. *Eur J Clin Invest*. 31(11):966-77.

PAGANO, M., PEPPERKOK, R., VERDE, F., ANSORGE, W., DRAETTA, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *The EMBO Journal*. 11:961-971.

PAVELIĆ, J., RADAKOVIĆ, B., PAVELIĆ, K. (2007). Insulin-like growth factor 2 and its receptors (IGF 1R and IGF 2R/mannose 6-phosphate) in endometrial adenocarcinoma. *GynecologicOncology*.105:727–735

PETER, M. and HERSKOWITZ, I. (1994). Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory protein and the cell cycle. *Cell*. 79:181-184.

- PFENINGER, K. H., LAURINO, L., PERETTI, D., WANG, X., ROSSO, S., MORFINI, G., CACERES, A., QUIROGA, S. (2003). Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *J. Cell Sci.* 116: 1209-1217.
- PINTO, T. de A. (2008). Papel do EGF na proliferação de células da retina. Niterói: [s.n]. 2008. Rio de Janeiro.
- POPKEN, G. J., DECHERT-ZEGER, M., Y. and P., D'ERCOLE, A. J. (2005). Brain development. *Adv Exp Med Biol.* 567:187-220.
- POURCHO, R. G. (1996) Neurotransmitters in the retina. *Curr Eye Res.* 15(7):797-803.
- RAJARAM, S., BAYLINK, D. J. and MOHAN, S. (1997). Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: Regulation and functions. *Endocrine Reviews.* 18:801-831.
- REESE, B. E and COLELLO, R. J. (1992). Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience.* 46:419-429.
- RESNITZKY, D., GOSSSEN, M., BUJARD, H. and REED, S. I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Molecular Cell Biology.* 14:1669-1679.
- RIEDEMANN, J., TAKIGUCHI, M., SOHAIL, M. U., VALENTINE, M. M. (2007). The EGF receptor interacts with the type 1 IGF receptor and regulates its stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 355:707-714.
- RINDERKNECHT, E. and HUMBEL, R. E. (1978). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *Febs Letters.* 89:283-286.
- ROSKOSKI JR, R. (2004). The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 319: 1–11.
- ROTWEIN, P., BURGESS, S., MILBRANDT, J. D., KRAUSE, J. E. (1988). Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85(1):265-269.
- ROUDABUSH, F., PIERCE, K., MAUDSLEY, S., KHAN, K., and LUTTRELL, L. (2000). Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-I stimulated Shc

phosphorylation and ERK 1/2 activation in COS-7 cells. *J.Biol.Chem.* 275:22583-22589.

ROWINSKY, E. K. (2004). The ErbB Family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annual Review of Medicine.* 55:433–57.

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

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

SCHLESSINGER, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.* 110: 669-672.

SHIMAZAKI, T., ARSENIJEVIC, Y., RYAN, A. K., ROSENFELD, M. G. R., WEISS, S. (1999). A role for the POU-III transcription factor Brn-4 in the regulation of the striatal neuron precursor differentiation . *EMBO J.* 18:444-456.

SLIEKER, L. J., MARTENSEN, T. M. and LANESLI M, D. (1986). Synthesis of Epidermal Growth Factor Receptor in Human A431 Cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 261:15233-12441.

SORKIN, A. (2001). Internalization of the Epidermal Growth Factor: role in signaling. *Biochemical Society.* 29(4): 480-484.

SRIVASTAVA, A. K. and ST-LOUIS, J. (1997). Smooth muscle contractility and protein tyrosine phosphorylation. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 176: 47–51.

STARCEVIĆ, K., KRALJ, M., ESTER, K., SABOL, I., GRCE, M., PAVELIĆ, K., KARMINSKI-ZAMOLA, G. (2007). Synthesis, antiviral and antitumor activity of 2-substituted-5-amidino-benzimidazoles. *Bioorg. Med. Chem.* 1; 15(13): 4419-26.

STIRNWEISS, J., VOLKOVA, C., ZIESCHÉ, E., DRUBE, S. and LIEBMANN, C. (2006). Muscarinic M2 receptors mediate transactivation of EGF receptor

through Fyn kinase and without matrix metalloproteases. *Cellular Signaling*. 18: 1338-1349.

TOSCHI, L. and CAPPUZZO, F. (2007). Understanding the new genetics of responsiveness to Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase inhibitors. *The Oncologist*. 12: 211-220.

TOYOSHIMA, H. and HUNTER, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 78:67-74.

UETZ, P. and STAGLJAR, I. (2006). The interactome of human EGF/ErbB receptors. *Molecular Systems Biology*. doi:10.1038/msb4100048

VERGARAJAUREGUI, S., SAN MIGUEL, A. and PUERTOLLANO (2006). Activation of p38 Mitogen-activated protein kinase promotes Epidermal Growth Factor Receptor internalization. *Traffic*. 7:686-698.

VERMEULEN, K., BOCKSTALE, D. R., VAN and BERNEMAN, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. 36: 131-149.

VERNADAKIS, A. (1996). Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog. Neurobiol.*,v.49, p. 185-214.

WALDER, S. and FERRETTI, P. (2004). Distinct neural precursors in the development human spinal cord. *The International Journal of Developmental Biology*. 48: 671-674.

WARSHAMANA-GREENE, G. S., LITZ, J., BUCHDUNGER, E., GARCIA-ECHEVERRIA, C., HOFMANN, F., KRYSTAL, G. W. (2005). The insulin-Like growth factor I receptor Kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. *Clin.Cancer Res*. 11:1563-1571.

WEINBERG, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81:323-330.

WEUSTE, M., WURM, A., IANDIEV, I., WIEDEMANN, P., REICHENBACH, A. and BRINGMANN, A. (2006). HB-EGF: increase in the ischemic rat retina and inhibition of osmotic glia cell swelling. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 347: 310-318.

WONG, R. W. C. (2006). Transgenic and knock-out mice for deciphering the roles of EGFR ligands. *Cellular and Molecular Life Science*. 60: 113-118.

WONG, R. W. C. and GUILLAUD, L. (2004). The role Epidermal Growth Factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine and Growth Factors Reviews*. 15: 147-156.

XIAN, C. J. and ZHOU, X. F. (2004). EGF family of growth factors: essential roles and redundancy in the nerve system. *Frontiers in Bioscience*. 9:85-92.

YE, P. and D'ERCOLE, A. J. (1999). Insulin-like growth factor I protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced injury. *Endocrinology*. 140, (7):3063-3072.

YE, P., XING, Y., DAI, Z., D'ERCOLE, A. J. (1996). In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res*. 95(1):44-54.

YIN, J., XU, K., ZHANG, J., KUMAR, A. and YU, F. S. X. (2007). Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. *Journal of Cell Science*. 120: 815-825.

ZHANG, L., BAI, J., UNDE, A. S., BERGDON, C. and LIDOW, M. S. (2004). D1 dopamine receptor regulation of the levels of the cell-cycle-controlling proteins, cyclin D, p27 and Raf-1, in cerebral cortical precursor cells is mediated through c-AMP-independent pathways. *Cerebral Cortex*. 15(1): 74-84.

ZHOU, H. Y., PON, Y. L., WONG, A. S. (2007). Synergistic effects of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor on human ovarian cancer cell invasion and migration: role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 148(11):5195-208.

## SITES

[http:// www.medscape.com/content/2004/004832483288art-nrc483288.fig2.jpg](http://www.medscape.com/content/2004/004832483288art-nrc483288.fig2.jpg) em 29.11.09.

[http:// www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1RMJ](http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1RMJ) em 29.11.09

<http://nobelprize.org> em 29.11.09

[http:// www.kent.ac.uk](http://www.kent.ac.uk) em 29.11.09

[http://www1.qiagen.com/GeneGlobePathwayView.aspxID=NM\\_005235](http://www1.qiagen.com/GeneGlobePathwayView.aspxID=NM_005235) em 29.11.09

[www.sigmaaldrich.com/etcm/medialib/life-science/cell-signaling-and-migrate-cells/signal1egf\\_r.Par.0001.Image.470.gif](http://www.sigmaaldrich.com/etcm/medialib/life-science/cell-signaling-and-migrate-cells/signal1egf_r.Par.0001.Image.470.gif) em 29.11.09.

# 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](#)