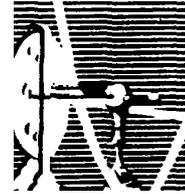




**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**



BRIAN NJAINE DE ANCHIETA RAMOS

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS
MOLECULARES ENVOLVIDOS COM A AÇÃO
DO NEUROPEPTÍDEO PACAP NO
CONTROLE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR
NA RETINA EM DESENVOLVIMENTO**

**Rio de Janeiro
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

BRIAN NJAINE DE ANCHIETA RAMOS

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS
MOLECULARES ENVOLVIDOS COM A AÇÃO
DO NEUROPEPTÍDEO PACAP NO
CONTROLE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR
NA RETINA EM DESENVOLVIMENTO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Mariana Souza da Silveira
Rafael Linden



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009**

Ramos, Brian Njaine de Anchieta Ramos.

Investigação dos mecanismos moleculares envolvidos com a ação do neuropeptídeo PACAP na retina em desenvolvimento/Brian Njaine de Anchieta Ramos. Rio de Janeiro : UFRJ, IBCCF^o, 2009.

xv, 105 f.: il 18.

Orientadores: Mariana Souza da Silveira e Rafael Linden

Tese de Doutorado-UFRJ, IBCCF, Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2009.

Referências Bibliográficas: f.81-105.

1.Retina. 2.Proliferação celular. 3.Neuropeptídeos. I. Silveira, Mariana Souza da, Linden, R. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biofísica. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurogênese do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação de Mariana Souza da Silveira e Rafael Linden e, na vigência de auxílios concedidos pela a FAPERJ, FUJB, CAPES e CNPq.

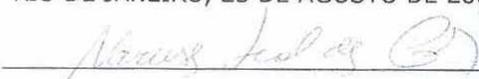
"INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS MOLÉCULARES ENVOLVIDOS COM A AÇÃO DO NEUROPEPTÍDEO PACAP NO CONTROLE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NA RETINA EM DESENVOLVIMENTO."

BRIAN NJAINE DE ANCHIETA RAMOS

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

APROVADA POR:

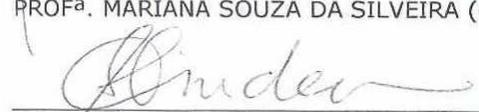
RIO DE JANEIRO, 25 DE AGOSTO DE 2009.



PROF^a. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR - UFRJ)
COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



PROF^a. MARIANA SOUZA DA SILVEIRA (DOUTOR - UFRJ) – ORIENTADORA



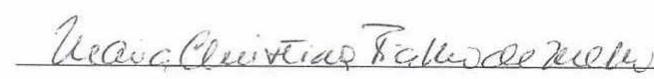
PROF. RAFAEL LINDEN (DOUTOR - UFRJ) – ORIENTADOR



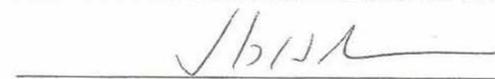
PROF^a. ANA BEATRIZ FURLANETTO PACHECO (DOUTOR – UFRJ) - REVISORA



PROF. CLAUDIO AKIO MASUDA (DOUTOR – UFRJ)



PROF^a. MARIA CHRISTINA FIALHO DE MELLO (DOUTOR – UFRJ)



PROF. STEVENS KASTRUP REHEN (DOUTOR – UFRJ)

“Quem tem filho grande é elefante”
“Quem tem que ter imagem bonita é televisão”

(Romário de Souza Faria)

Dedico esta tese a você, leitor

AGRADECIMENTOS

Foram 10 anos para este momento e gostaria de agradecer:

A minha família por ser a minha família e por serem grandes quando necessário, em especial à minha progenitora.

Aos meus amigos mais fiéis que sempre estiveram ao meu lado seja nos momentos bons ou nas turbulências (Lele e Luis).

A Mariana Souza da Silveira pelos últimos 7 anos, pela amizade, compreensão, discussões e paciência. Te desejo tudo de bom!!!!.

Ao R. Linden por também ter aceitado Mr. Brian no lab e por toda a estrutura laboratorial que foi fundamental para eu me divertir ao longo do doutorado.

Aos colaboradores, Rodrigo Martins, Marcelo Santiago, Vinícius Ribas e Luis Dione que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A Prof. Ana Beatriz por ter feito uma revisão refinada da tese. Muito obrigado por ter aceitado o convite.

Ao Leonardo Meireles, por ter me ajuda em algumas experimentações e lhe desejo tudo de bom neste novo rumo de sua vida.

A Sandrinha por ter resolvido problemas mil e por ter sido sempre exata. Agradeço a Gabi pela ajuda também.

Ao Bruno Gonçalves por ter me ajuda em vários momentos com sua expertise.

Agradeço a todos do Lab de Neurogênese em especial, a Luciana, Mona, Tati e Rachel, Nayara, Maurício e Fernanda.

A Senhorita Bado por toda a sua sabedoria sobre Ressonância Nuclear Magnética.

A todos do Lab de Neuroanatomia Celular em especial ao Leo e Anninha.

A todos do Lab de Parasitologia Molecular em especial ao Rodrigo, Renatinha e incluo nesta o DVD.

Ao Manuel Gustavo, Karine Verdoorn, Anna, Clara, Jordano, Leandro e Sheila Albert pela amizade.

A todos os neurocientistas do corredor (Andréa, Virgínia, Pedrão, Ricky, Stutz, Tiago, Marco, Vítor e outros) que sempre me ajudaram. Grato!!!!

Ao Zé Nilson, Gildão, Tibúrcio e Talita por toda a ajuda. Muito Obrigado.

A todos os funcionários, alunos de IC, mestrado, doutorado e professores que estiveram envolvidos na minha formação.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc-Adenosina monofosfato cíclico

BSA-Albumina Sérica Bovina

CMF-Calcium and magnesium free- solução livre de cálcio e magnésio

CDK-Cyclin Dependent Kinase-Cinase dependente de ciclina

cDNA- Complementar cDNA-DNA complementar

CKI-Cyclin Kinase inhibitor-Inibidor de cinase dependente de ciclina

CREB-cAMP responsive element binding-Fator de transcrição responsivo à AMPc

CRX-Cone-Rod otx-like homeobox transcription factor-Fator de transcrição de Cones e Bastonetes

CT-threshold cycle

DAB-diaminobenzindina

DAPI- 4'-6-diamino-2-phenylindole

DEPC-Dietil-pirocarbonato

DMEM-Dubelcco modified Eagle medium-Meio de Eagle modificado por Dubelcco

dNTPs- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EGF- Epidermal growth factor-Fator de crescimento epidermal

FGF-Fibroblast growth factor-Fator de crescimento de fibroblasto

GCL- Ganglion cell layer-Camada de células ganglionares

HEPES- (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IBMX-Isobutil-metil-xantina

INL- Inner nuclear layer-Camada nuclear interna

IP3-Inositol trifosfato

IPL- Inner plexiform layer-Camada plexiforme interna

iPS- induced pluripotent stem cells-células tronco pluripotentes induzidas

KLF- Kruppel like factor-Fatores de transcrição tipo Kruppel

NBL- Neuroblastic layer-Camada neuroblástica

ONL- Outer nuclear layer-Camada nuclear externa

OPL- Outer plexiform layer-Camada plexiforme externa

PACAP-Peptídeo ativador da adenilato ciclase na pituitária

PAL-Liase α -amidase de peptídeos terminados em α -hidroxiglicina

PAM-Monooxigenase α -amidase de peptídeos

PBS-Phosphate buffer saline-Salina tamponada com fosfato

PCNA-Proliferating cell nuclear antigen-antígeno nuclear de células proliferantes

PCR-reação em cadeia da polimerase

PKA-proteína cinase A

PKC-proteína cinase C

PLC-fosfolipase C

PLD-fosfolipase D

PHM-Monooxigenase α -hidroxiglicina de peptídeos

RNAi-Interferência de RNA

RNA-Ribonucleic acid-Ácido Ribonucleico

RT-PCR- Reverse transcriptase PCR-PCR com transcrição reversa

SDS-Dodecil sulfato de sódio

TBS-T-Salina tamponada com Tris suplementada com 0,1% de Tween-20

TCA- Tricloroacetic acid-Ácido tricloroacético

TGF α -Transforming growth factor-Fator de crescimento transformante

VIP-Vasoactive intestinal peptide-Peptídeo intestinal vasoativo

RESUMO

A perda da regulação da proliferação celular na retina pode causar aumento, diminuição ou perda de tipos celulares e consequentemente inadequada transdução visual. Nosso grupo tem interesse no papel de PACAP (peptídeo ativador da adenilato ciclase na pituitária) no desenvolvimento da retina e na investigação dos mecanismos envolvidos. Dados prévios do nosso grupo mostraram que neste tecido, PACAP atua como agente neuroprotetor de maneira dependente de AMPc/PKA. Mais recentemente, também foi demonstrado pelo nosso grupo que este peptídeo age como regulador negativo da proliferação celular na retina. Foram identificados alguns mecanismos associados à resposta ao PACAP. Foi confirmada a presença do receptor de PACAP, PAC1 em uma população de células progenitoras retinianas e mostraram que a ativação de ambos receptores, do tipo I e II, e o aumento dos níveis de AMPc estão envolvidos com o efeito antimitogênico de PACAP. Adicionalmente, os níveis do regulador do ciclo celular ciclina D1 são reduzidos após tratamento com PACAP. Foi demonstrada ainda a presença dos fatores de transcrição KLF4, KLF5 e KLF7 na retina, estes pertencem à família Sp/KLF de fatores de transcrição dedos de zinco e são reguladores dos efetores do ciclo celular em diferentes tecidos. Mostramos que os níveis de KLF4 estão aumentados após tratamento com PACAP por 1 hora. Foi também demonstrada por imunofluorescência confocal a presença de KLF4 em células proliferantes na fase G2-M (pH3-positivas). Por fim, foi confirmado que KLF4 tem capacidade de se ligar nos motivos sp1, identificados no promotor de ciclina D1 de ratos. Nossos resultados sugerem que PACAP possa modular a proliferação das células progenitoras da retina através da regulação dos níveis de ciclina D1 pelo fator de transcrição KLF4. Finalmente, PACAP talvez seja um fator extracelular com múltiplos papéis no controle do desenvolvimento da retina, inclusive o de regulador do ciclo celular, agindo na transição da proliferação para diferenciação celular.

ABSTRACT

Deregulation of cell proliferation may cause increase, decrease or lack of cell types, and the consequent loss of adequate visual transduction. We are interested on the role of PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) in the developing retina and the molecular mechanisms involved. Our previous results showed that in this tissue, PACAP acts as a neuroprotective agent in cAMP/PKA-dependent manner. More recently, our group also demonstrated that this peptide is a negative regulator of cell proliferation. In the present study mechanisms triggered in response to PACAP were identified. The presence of the PACAP receptor PAC1 in a population of retinal progenitor cells was confirmed. We also demonstrated that receptors of both type I and type II as well as the activation of cAMP pathway are involved in the antimitogenic effect elicited by PACAP. Moreover, the level of the cell cycle regulator cyclin D1 is reduced after PACAP treatment. The transcriptional factors KLF4, KLF5 and KLF7 which were described in retina belong to the Sp/KLF family of zinc finger transcription factors and are involved in the control of proliferation through the regulation of the level of cell cycle effectors in various tissues. We showed that KLF4 expression increased after PACAP treatment. We also demonstrated by double immunofluorescence and confocal microscopy that KLF4 is present in retinal progenitors in the G2-M phase (pH3-positive). Finally, we confirmed that KLF4 is able to bind to sp1 motifs which are present in rat cyclin D1 promoter. Our data suggest that PACAP may modulate the proliferation of progenitor cells during retinal development through the regulation of cyclin D1 level by KLF4 transcription factor. In conclusion, PACAP may be considered an extracellular factor with multiple roles in retinal development, such as cell cycle regulation, possibly acting at the transition from proliferation to neuronal differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquemas da retina neonatal e retina adulta de roedores com os tipos celulares discriminados.	4
Figura 2	O receptor PAC1 está presente em células proliferantes na retina.	43
Figura 3	Quantificação da presença do receptor PAC1 em células proliferantes na retina.	44
Figura 4	A ativação dos receptores PAC1 e VPACs de PACAP38 reduz a incorporação de [3H]-timidina na retina de ratos P1.	46
Figura 5	O bloqueio da degradação de AMPc exacerba o efeito antiproliferativo mediado pelo PACAP38.	48
Figura 6	PACAP38 reduz os níveis de RNAm de ciclina D1 na retina neonatal.	50
Figura 7	PACAP38 reduz os níveis da proteína ciclina D1 na retina neonatal.	51
Figura 8	PACAP38 reduz o número de células positivas para ciclina D1 na retina neonatal.	52
Figura 9	PACAP38 reduz os níveis de RNAm de ciclina D1 via AMPc na retina de ratos P1.	54
Figura 10	Expressão de membros da família Sp/KLFs na retina de ratos em desenvolvimento e adultos.	56
Figura 11	Expressão de KLF4 na retina de ratos em desenvolvimento.	57
Figura 12	PACAP38 induz aumento dos níveis de RNAm de KLF4 na retina neonatal.	59
Figura 13	PACAP38 induz aumento dos níveis de proteína KLF4 na retina neonatal.	60
Figura 14	PACAP38 induz aumento dos níveis de KLF4	61

Figura 15	PACAP38 induz aumento dos níveis de KLF4 na retina neonatal	62
Figura 16	KLF4 está presente em uma população de células proliferantes da retina.	64
Figura 17	A região regulatória do gene de ciclina D1 de ratos contém sítios sp1.	66
Figura 18	O fator de transcrição KLF4 presente na retina neonatal se liga ao motivo sp1	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos iniciadores e condições de RT-PCR para os fatores de transcrição da família Sp/KLF.	28
Tabela 2	Oligonucleotídeos iniciadores e as eficiências das reações de PCR em tempo real.	30

SUMÁRIO

I) INTRODUÇÃO	2
1) Retina	3
1.1) Função da retina.....	3
1.2) Estrutura da retina de roedores neonatos e adultos	3
2) Ciclo Celular	6
3) Controle da proliferação celular na retina por sinalizadores extracelulares	8
4) Peptídeo Ativador da Adenilil Ciclase na Pituitária (PACAP)	10
4.1) Receptores e Vias de Sinalização Celular Peptidérgicas	11
4.2) PACAP e receptores na retina	13
4.3) PACAP e proliferação celular	14
5) Fatores de transcrição da família Sp/KLF	16
5.1) <i>Kruppel-like factor 4</i>	18
5.2) O fator de transcrição KLF4 e o controle do ciclo celular.....	19
II) OBJETIVOS	22
III) MATERIAL E MÉTODOS	24
1) Material	24
2) Preparo dos Explantes de Retina e Histologia	24
3) Imunocitoquímica para PAC1 e PCNA ou ciclina D1	25
4) Imunohistoquímica para KLF4	26
5) Imunohistoquímica dupla para KLF4 e pH3 ou PAC1 e PCNA	26
6) Ensaio de incorporação de [³H]-timidina	27
7) RT-PCR	29
7.1) Extração de RNA total	29
7.2) PCR	30
7.3) PCR em tempo real	32
8) Sequenciamento automático	34
9) Western Blot	34
10) Hibridização <i>in situ</i>	35
10.1) Clonagem da sequência de KLF4.....	35
10.2) Transcrição das sondas.....	36
10.3) Hibridização das sondas.....	37
10.4) Revelação da hibridização <i>in situ</i>	37
11) Predição de motivos de ligação ao DNA na região regulatória dos genes	38
12) Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (EMSA)	38
12.1) Extrato de proteínas nucleares	38
12.2) Marcação radioativa dos oligonucleotídeos	39
12.3) Ligação da proteína ao oligonucleotídeo	39
12.4) Eletroforese em gel de poli(acrilamida).....	40
12.5) Análise de <i>Supershift</i>	40
13) Análise Estatística	41
14) Soluções	41
IV) RESULTADOS	46
1) O receptor PAC1 está presente em precursores retinianos	46
2) A ativação dos receptores que respondem a PACAP38 reduz a incorporação [³H]-timidina na retina neonatal	49
3) O bloqueio da degradação de AMPc exacerba o efeito antiproliferativo do PACAP38	51
4) PACAP38 reduz os níveis de ciclina D1 e não interfere com os níveis de p27^{Kip1} na retina neonatal	53
5) O bloqueio da degradação de AMPc exacerba o efeito do PACAP na redução dos níveis de ciclina D1	57
6) Presença de membros da família Sp/KLF na retina em desenvolvimento	59
7) PACAP38 induz aumento dos níveis de KLF4 na retina neonatal	62
8) O fator de transcrição KLF4 está presente em uma população de precursores retinianos neonatais	67
9) Identificação de motivos sp1 na região regulatória do gene da ciclina D1 de ratos	69
10) O fator de transcrição KLF4 presente na retina se liga ao motivo sp1 presente no gene de ciclina D1	71
V) DISCUSSÃO	73
VI) CONCLUSÕES.....	85
VII) BIBLIOGRAFIA.....	87

I) INTRODUÇÃO

A regulação do desenvolvimento do sistema nervoso têm sido alvo de intensa investigação. Isso se justifica visto que a compreensão a regulação de eventos como proliferação celular, diferenciação celular, morte celular programada, migração e sinaptogênese levam à descoberta de elementos relevantes para o desenvolvimento de diversas estruturas e, conseqüentemente, representam potenciais alvos de intervenção em terapias de doenças degenerativas e proliferativas que acometem o sistema nervoso. O Laboratório de Neurogênese do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho tem se destinado nos últimos anos a estudar a ação de fatores extrínsecos e os mecanismos intracelulares influenciados por estes fatores no desenvolvimento da retina de roedores. Nosso grupo tem se dedicado a desvendar a ação do peptídeo PACAP, dentre outros fatores extrínsecos, na regulação de eventos envolvidos com o desenvolvimento da retina. Silveira e colaboradores (2002) apresentaram diversas evidências da ação de PACAP na sensibilidade à morte celular no tecido retiniano, processo no qual AMPc é mensageiro secundário fundamental. Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que PACAP é capaz de controlar negativamente a proliferação celular na retina neonatal. (Njaine et al; 2009 submetido para publicação).

O foco atual deste estudo é desvendar quais os fatores intrínsecos envolvidos com o efeito anti-mitogênico mediado por PACAP no controle da proliferação celular na retina em desenvolvimento.

1) Retina

1.1) Função da retina

A retina é uma estrutura derivada do neuroectoderma (diencéfalo), pertencente ao sistema nervoso central e responsável pela transformação da energia eletromagnética em potenciais de ação. Estes são conduzidos aos centros superiores através do nervo óptico por axônios pertencentes a um tipo particular de neurônio retiniano, a célula ganglionar (Dowling, 1987).

Contudo, o tecido retiniano não se restringe à simples sinalização para o cérebro da presença ou ausência de luz. A competência deste tecido na modulação dos sinais neurais gerados confere uma transmissão com aspecto mais complexo. A imagem projetada sobre a retina é decomposta em diversas características físicas que serão analisadas pelos centros cerebrais para a percepção visual (Dowling, 1987).

1.2) Estrutura da retina de roedores neonatos e adultos

A retina de vertebrados tem sido extensamente usada como modelo experimental do sistema nervoso central. A sua localização permite um fácil acesso e isolamento, e sua estrutura em camadas facilita a identificação dos tipos celulares por sua localização e morfologia. O desenvolvimento da retina, como de outros tecidos neurais, ocorre em uma seqüência de eventos que muitas vezes se sobrepõem temporalmente. Estas etapas incluem: proliferação, migração, diferenciação celular, determinação da morfologia final de células,

organização tecidual, aquisição de fenótipo neuroquímico e sinaptogênese (Sharma e Ehinger, 1997).

Em roedores, a retina nos primeiros dias após o nascimento possui células proliferantes, células pós-mitóticas e células diferenciadas. Nesta etapa do desenvolvimento, o tecido retiniano está dividido em três estratos, a camada de células ganglionares (GCL, para *Ganglion Cell Layer*), camada nuclear interna (INL, para *Inner Nuclear Layer*) em formação e a camada neuroblástica (NBL, para *Neuroblastic Layer*), sendo que nesta última estão presentes células proliferantes, células recém pós-mitóticas e células em processo de diferenciação (**Figura 1A**).

Já a retina adulta dos vertebrados está organizada em camadas nucleares onde se localizam os corpos celulares dos tipos neuronais e da glia da retina. O núcleo dos fotorreceptores cones e bastonetes estão contidos na camada nuclear externa (ONL, *Outer Nuclear Layer*). Já os núcleos das células horizontais, células bipolares, células amácrinas e célula glial de Muller estão presentes na camada nuclear interna (INL, *Inner Nuclear Layer*), e células ganglionares e células amácrinas deslocadas na camada de células ganglionares (GCL-*Ganglionar Cell Layer*) (Dowling, 1987). Estas camadas celulares são intercaladas por camadas plexiformes interna e externa (IPL, *Inner Plexiform Layer* e OPL, *Outer Plexiform Layer* respectivamente), contendo prolongamentos celulares e sinapses (**Figura 1B**) (Masland, 2001)

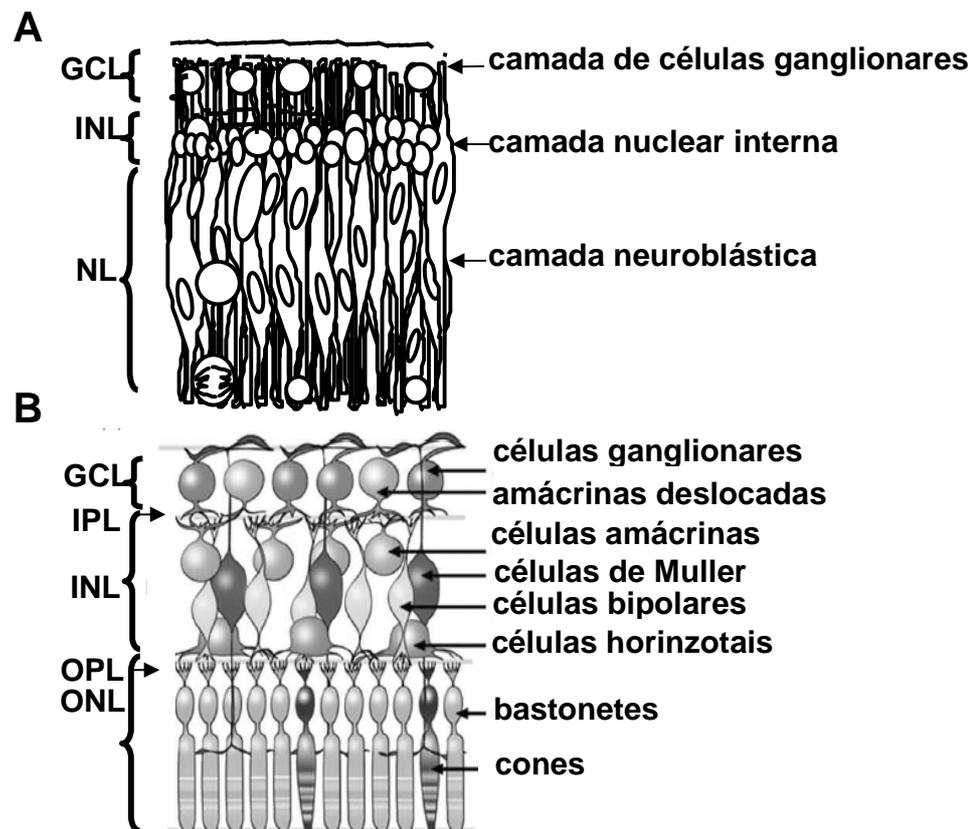


FIGURA 1: Esquemas da retina neonatal e retina adulta de roedores com os tipos celulares discriminados. (A) Retina Neonatal, GCL-camada de células ganglionares; INL-camada nuclear interna e NBL-camada neuroblástica (B) Retina madura . GCL; INL e ONL-

2) Ciclo Celular

A proliferação e diferenciação celular são reguladas por uma intrincada rede de vias de sinalização intracelular que estão ligadas ao controle do ciclo celular. A atividade dos complexos ciclina-CDK (CDK - cinase dependente de ciclina) está envolvida com a progressão do ciclo celular e é regulada por vários mecanismos como a associação das ciclinas às CDKs, fosforilação e desfosforilação das CDKs e associação do complexo com inibidores de CDK (CKIs) (Nagahama *et al.*, 2001; Pei & Xiong, 2005 para revisão).

Os complexos ciclina-CDK da fase G1 do ciclo celular são constituídos por ciclina D (D1, D2 e D3) e suas respectivas CDKs (CDK4 e CDK6), e ciclina E (E1 e E2) e CDK2. No início da fase G1, a ciclina D é expressa em níveis altos e, por conseguinte, se liga e ativa CDK4 e CDK6 (Pei & Xiong, 2005 para revisão). A formação deste complexo inicia a fosforilação da proteína retinoblastoma sobre a qual recai um papel central no controle do ciclo celular. Ciclina E associada com CDK2 também fosforila retinoblastoma no meio da fase G1 em um sítio diferente do primeiro complexo de ciclina-CDK. Uma vez fosforilada, a proteína retinoblastoma se torna inativa e perde sua função inibitória sobre E2F e histonas deacetilases, que regulam a transcrição gênica de diversos genes envolvidos com a transição entre as fases G1 e S (Pei & Xiong, 2005; Gallinari *et al.*, 2007 para revisão).

Por outro lado, existem reguladores que atuam diminuindo a atividade dos complexos ciclina-CDK, denominados CKIs. Estes estão divididos em duas famílias: Ink4 (p15^{ink4b}, p16^{ink4a}, p18^{ink4c} e p19^{ink4d}) e Cip-Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e

p57^{Kip2}). A família Ink4 regula a atividade dos complexos ciclina D/CDK4 e 6. Já a família Cip-Kip regula a atividade de ciclina E/CDK2, ciclina A/CDK2, ciclina B/CDK1 e ciclina D/CDK4 e 6 (Nagahama *et al.*, 2001; Pei & Xiong, 2005 para revisão).

No desenvolvimento da retina, a proteína ciclina D1 tem papel de destaque na progressão do ciclo celular dos progenitores retinianos. Fantl e colaboradores (1995) demonstraram em camundongos nocautes para o gene da ciclina D1 a redução das camadas celulares que compõem a retina, sendo este efeito mais evidente na camada nuclear externa, onde estão os corpos celulares dos fotorreceptores. Por outro lado, ciclina D2 não é expressa na retina, porém, de acordo com Carthon e colaboradores (2005), quando expressa em substituição à ciclina D1, esta proteína tem ação compensatória, apesar de não apresentar a mesma excelência para manter o correto desenvolvimento da retina. Já a ciclina D3, a princípio, não possui papel no controle da proliferação, e sim na diferenciação da glia de Müller no desenvolvimento pós-natal da retina (Dyer & Cepko, 2000).

Até o momento, as CKIs bem caracterizadas quanto ao controle do ciclo celular dos progenitores retinianos são as proteínas p19^{ink4d}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2} (Dyer & Cepko, 2000a; Dyer & Cepko, 2001a; Cunningham *et al.*, 2002). A proteína p19^{ink4d} é expressa em uma subpopulação de precursores retinianos da camada neuroblástica e regula a saída do ciclo celular (Cunningham *et al.*, 2002). A expressão de p27^{Kip1} ocorre durante as fases tardias de G2 e as fases iniciais de G1 do ciclo celular nos progenitores retinianos. Camundongos

deficientes em p27^{Kip1} e p19^{ink4d} exibiram aumento na proporção de células mitóticas e apoptose de modo sinérgico, particularmente durante os estágios tardios da histogênese retiniana (Dyer & Cepko, 2001a; Cunningham *et al.*, 2002). O inativação de p27^{Kip1} resgata retinas deficientes em ciclina D1 do fenótipo microftálmico (Geng *et al.*, 2001), sugerindo uma relação funcional antagonica entre estas duas proteínas no controle do ciclo celular dos progenitores retinianos.

Os níveis de p57^{Kip2} são aumentados durante a fase G1/G0 em um subtipo de precursor que deixa o ciclo celular nas idades embrionárias E14.5 e E16.5 no desenvolvimento do camundongo. Em idades pós-natais, p57^{Kip2} foi encontrada em uma subpopulação de células amácrinas e neste estágio acredita-se que p57^{Kip2} não esteja envolvida com a proliferação, e sim com direcionamento para a diferenciação deste tipo celular da retina (Dyer & Cepko, 2000a; Dyer & Cepko, 2001a).

3) Controle da proliferação celular na retina por sinalizadores extracelulares

Como em outros tecidos no sistema nervoso central, na retina fatores epigenéticos e genéticos conduzem as células progenitoras à geração do número final de cada tipo celular. A retina neural de vertebrados é um complexo tecido sensorial cuja função depende da correta e harmônica formação de sua citoarquitetura laminar (Marquardt & Gruss, 2002).

Todos os tipos celulares retinianos, exceto astrócitos e microglia, são gerados a partir das mesmas células precursoras multipotentes, em proporções características. Os tipos celulares da retina são gerados, sequencialmente, na seguinte ordem: células ganglionares, células amácrinas, fotorreceptores do tipo cone, células horizontais e, mais tardiamente, fotorreceptores do tipo bastonete, células de Müller e células bipolares. (Levine & Green, 2004; Donavan & Dyer, 2005 para revisão).

Portanto, durante o desenvolvimento da retina, é necessário que a proliferação celular seja regulada de forma que tanto os tipos celulares gerados inicialmente quanto tipos celulares tardios sejam formados nas proporções adequadas. Fatores extracelulares como glutamato, FGFs, EGF, TGF α e substância P agem nesse controle da proliferação celular na retina em desenvolvimento (Isayama *et al.*, 1991; Anchan *et al.*, 1991; Lillien & Cepko, 1992; Anchan & Reh, 1995; Martins *et al.*, 2006; Martins & Pearson, 2008 para revisão).

Os dados obtidos pelo nosso grupo demonstram também a ação de PACAP38 como regulador negativo da proliferação celular da retina em desenvolvimento (Njaine *et al.*, 2009 submetido à publicação) e a caracterização do mecanismo molecular que medeia este efeito constitui um dos objetivos centrais deste estudo.

4) Peptídeo Ativador da Adenilil Ciclase na Pituitária (PACAP)

Uma família de peptídeos neuroativos que desempenha papel importante no desenvolvimento dos mais diversos sistemas é a família dos peptídeos Secretina/Glucagon/VIP. Neste grupo estão incluídos diversos peptídeos com homologia variada entre si, dentre os quais podemos destacar, além dos citados acima, os peptídeos ativadores da adenilil ciclase na pituitária denominados PACAP (*Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide*).

O PACAP foi inicialmente isolado do hipotálamo ovino por sua potente atividade de estimulação da produção de AMPc nas células da hipófise anterior de ratos (Miyata *et al.*, 1989). Posteriormente, foi descrito que este peptídeo pode apresentar duas formas: PACAP27 e PACAP38, que compartilham os mesmos 27 aminoácidos N-terminais e são geradas a partir de um peptídeo precursor comum que sofre processamento pós-traducional (Miyata *et al.*, 1990).

Esses peptídeos estão presentes em diversas áreas do sistema nervoso central incluindo hipotálamo, córtex cerebral, hipocampo, cerebelo e retina, assim como no sistema nervoso periférico e em outros tecidos como, pulmão, testículos, pâncreas, intestino e glândula adrenal (Arimura *et al.*, 1991; Ghatei *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 2002; Fahrenkrug & Hannibal, 2004).

PACAP (nas suas duas isoformas) necessita ser amidado para se tornar biologicamente ativo. Esse processamento é realizado por uma enzima bifuncional, PAM (*peptidylglycine α -amidating monooxygenase*). O gene da PAM codifica a proteína que realiza a amidação de peptídeos em dois passos consecutivos que são realizados pelos domínios PHM (*peptidyl α -hydroxyglycine*

monooxygenase) e PAL (peptidyl - α -hydroxyglycine α -amidating lyase) (Prigge *et al.*, 2000; El Meskini *et al.*, 2003).

4.1) Receptores e Vias de Sinalização Celular Peptidérgicas

PACAP ativa receptores farmacologicamente classificados em tipo I e II, em função da afinidade relativa por PACAP e por outro membro da mesma família de peptídeos, o VIP. O receptor tipo I apresenta alta afinidade por PACAP, 100 a 1000 vezes superior em comparação a VIP sendo, portanto, considerado receptor específico de PACAP. Já aos receptores do tipo II, PACAP e VIP se ligam com afinidades semelhantes (Spengler *et al.*, 1993; Vaudry *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2007 para revisão). Para denominação desses receptores será adotada aqui a classificação definida pela União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) (Harmar *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2002). Nesta classificação os três receptores descritos são: PAC1 (receptor específico para PACAP), VPAC1 e VPAC2, codificados por genes distintos.

O receptor PAC1 pode apresentar diversas variantes geradas por processamento alternativo de RNA. Estes variantes levam à ativação de uma ou mais vias de sinalização intracelular, tais como: adenilil ciclase, fosfolipase C e/ou modulação de canais de Ca^{2+} , assim como, podem apresentar diferenças na eficiência relativa das duas isoformas de PACAP (PACAP27 e PACAP38). Uma das variações é a presença ou ausência de uma seqüência de aminoácidos no domínio N-terminal extracelular do receptor ao qual se denomina de PAC1s (*s=short* - ausência da seqüência de 21 aminoácidos) ou

PAC1_{vs} (*vs=very short* - ausência da seqüência de 57 aminoácidos), respectivamente (Pantaloni *et al.*, 1996; Dautzenberg *et al.*, 1999). A presença desses 21 aminoácidos resulta em com a redução da eficiência de ativação da PLC (fosfolipase C) o PACAP27 em comparação com o PACAP38 (Pantaloni *et al.*, 1996), apesar disso não ter se reproduzido em todos os sistemas analisados (Braas & May, 1999).

Outra região do receptor PAC1 que pode sofrer processamento alternativo de RNA é a que compreende os exons (HIP e HOP₁ ou ₂) da terceira alça citoplasmática deste receptor, região importante para interação receptor-proteína G e que atribui seletividade quanto à ativação das vias de sinalização intracelular (Pantaloni *et al.*, 1996; Spengler *et al.*, 1993). De modo pioneiro, Spengler e colaboradores (1993) começaram a desvendar a participação das diversas isoformas do receptor PAC1 na transdução de sinal por meio de sua expressão de forma isolada em células. A ausência dos dois cassetes (HIP e HOP₁ ou ₂) levou à ativação da via da adenilil ciclase ($EC_{50} < 1nM$) e PLC ($1nM < EC_{50} < 20nM$); a presença do cassete HOP teve o mesmo efeito da ausência de qualquer cassete. Por outro lado, a presença do cassete HIP implicou em ativação somente da via da adenilil ciclase ($1nM < EC_{50} < 20nM$) e a presença dos dois cassetes concomitantemente levou a um padrão intermediário, com ativação da adenilil ciclase ($1nM < EC_{50} < 20nM$) e PLC ($EC_{50} > 100nM$) (Spengler *et al.*, 1993). Posteriormente, McCulloch e colaboradores (2000) demonstraram que o cassete HOP₁ está envolvido, também, com o aumento de fosfolipase D (PLD) de modo dependente da

atividade da GTPase monomérica, ARF. No entanto, a ativação da via de PLD não se aplica a todos os modelos de estudo desenvolvidos (Braas & May, 1999; Silveira *et al*, dados não publicados).

Os receptores VPAC1 e VPAC2 são capazes de ativar a via da adenilil ciclase mediante ligação de PACAP27, PACAP38 e VIP com afinidades similares, tendo sido ainda atribuída a VPAC1 a capacidade de ativar fosfolipase C (PLC) (Van Rampelbergh *et al.*, 1997). Também foi sugerido que tanto VPAC1 quanto VPAC2 podem ativar PLD (Mcculloch *et al.*, 2000) e gerar aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (Sreedharan *et al.*, 1994; Inagaki *et al.*, 1994), apesar da maioria dos trabalhos não considerar estes efeitos (Pantaloni *et al*, 1996; Spengler *et al.*, 1993; Chatterjee *et al.*, 1997; Gourlet *et al.*, 1998; Braas & May, 1999).

4.2) PACAP e receptores na retina

Em análises de detecção de RNAm e imunorreatividade para PACAP em retina de ratos adultos, foi demonstrada a presença do peptídeo nas células ganglionares, na camada plexiforme interna, na camada nuclear interna, na camada plexiforme externa e camada nuclear externa. Na camada nuclear interna a imunorreatividade do peptídeo foi identificada nos corpos celulares e terminais axonais de células amácrinas e células horizontais (Izumi *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2000 a e b).

Foi demonstrada a presença de RNAm e imunorreatividade para o receptor PAC1 (sem discriminação das isoformas) em células ganglionares,

amácricas e na camada plexiforme interna da retina de ratos adultos (Seki *et al.*, 1997), enquanto outros trabalhos caracterizaram esses receptores como sendo dos tipos PAC1-HOP, PAC1-short, VPAC1 e VPAC2 (Onali & Orianas, 1994). Análises por hibridização *in situ* também identificaram fraca marcação para o receptor PAC1 nas camadas plexiforme externa e nuclear externa (Seki *et al.*, 1998). O receptor PAC1 também foi detectado em culturas de células de Müller de retinas de pinto com, peso molecular na faixa de 33kDa (Kubrusly *et al.*, 2005).

Na tentativa de descrever aspectos funcionais dos receptores de PACAP, foi descrito o efeito desses peptídeos como estimuladores da adenilil ciclase na retina de diversas espécies de mamíferos (Onali e Orianas, 1994; Orianas *et al.*, 1997; D'Agata e Cavallaro, 1998). Além disso, Silveira e colaboradores (2002) descreveram o efeito neuroprotetor de PACAP em modelos experimentais de morte celular induzida na retina em desenvolvimento. Neste caso, o efeito neuroprotetor envolve o acúmulo de AMPc, e não de IP₃, e depende da atividade de PKA (Proteína cinase A). Mais recentemente nosso grupo demonstrou a expressão do sistema pacapérgico em diferentes idades ao longo do desenvolvimento da retina (Njaine *et al.*, 2009 submetido à publicação).

4.3) PACAP e proliferação celular

PACAP foi implicado como fator neuroprotetor em morte celular induzida durante o desenvolvimento retiniano (Silveira *et al.*, 2002) e também na regulação de proliferação celular (Njaine *et al.*, 2009, submetido para

publicação). Em outros modelos experimentais também já foi descrita a ação deste peptídeo neuroativo na regulação da proliferação celular (Zhou *et al.*, 2002). Por exemplo, em culturas de astrócitos, PACAP tem efeito mitogênico. Este efeito proliferativo em astrócitos é mediado por PAC1, dependente da via de sinalização das MAPcinases e independente de PKC (proteína cinase C) e PKA (Moroo *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2003).

Em precursores neuronais efeitos aparentemente contraditórios também foram observados. Em culturas de neuroblastos simpáticos, PACAP aumenta a proliferação de forma dependente da ativação de PLC (Lu *et al.*, 1998; DiCicco-Bloom *et al.*, 2000). Em contraste, em precursores corticais foi sugerido por Lu e DiCicco-Bloom (1997) um efeito autócrino de PACAP na indução da saída do ciclo celular e conseqüente transição de proliferação para diferenciação neuronal. Isto foi comprovado em trabalhos posteriores, desenvolvidos pelo mesmo grupo, que demonstraram ser PACAP um agente anti-mitogênico no córtex em desenvolvimento (Suh *et al.*, 2001) em conseqüência da redução da atividade do complexo ciclina E/CDK2 por aumento nos níveis do inibidor deste complexo, a proteína p57^{Kip2} (Carey *et al.*, 2002). De forma complementar, Nicot e DiCicco-Bloom (2001) demonstraram que os efeitos dicotômicos de PACAP na proliferação celular estão relacionados, à princípio, com a isoforma do receptor PAC1 que é expressa nos neuroblastos. Por conseguinte, dependendo da isoforma de PAC1, PACAP pode induzir o aumento dos níveis de AMPc e proporcionar efeito anti-mitogênico, ou ativar PLC e aumentar a proliferação celular nos neuroblastos.

5) Fatores de transcrição da família Sp/KLF

O fator de transcrição Sp1 foi identificado no início dos anos 80, sendo um dos primeiros fatores de transcrição a ser purificado e clonado de células de mamíferos (Dyran & Tjian 1983 a; Kadonaga *et al.*, 1987). Posteriormente, foi demonstrado que a proteína Sp1 era capaz de reconhecer e se ligar em sítios ricos em nucleotídeos guanina e citosina (GC) no promotor do *simian vírus 40* (SV40) via três motivos dedos de zinco Cys2-His2 (Dyran & Tjian 1983 b). Domínios de ligação a DNA similares ao de Sp1 têm sido descobertos em diferentes proteínas reguladoras do desenvolvimento, inclusive Krüppel, um regulador do padrão embrionário de *Drosophila* (Suske, 1999; Black *et al.*, 2001; Kaczynski *et al.*, 2003 para revisão). Após a descoberta de outros fatores de transcrição que possuem motivos dedos de zinco similares ao de Sp1, foi definida a família Sp/KLF de fatores de transcrição. Esta família de fatores de transcrição compreende fatores expressos em diferentes espécies que abrangem de *Caenorhabditis elegans* a *Homo sapiens*, tendo sido identificados até o momento 25 membros desta família em humanos (Sp1-Sp8, KLF1-KLF17) (Kaczynski *et al.*, 2003; Rowland & Peeper, 2006 para revisão). A família Sp/KLF tem sido implicada no controle do crescimento e diferenciação celular em diferentes tecidos e vários dos seus componentes já foram envolvidos no desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres (Black *et al.*, 2001 para revisão).

Os membros da família Sp/KLF possuem domínios de ligação ao DNA, de localização nuclear e de regulação transcricional. Uma característica importante

que define os membros desta família é a presença de três motivos dedos de zinco Cys2-His2 na região carboxi-terminal, altamente conservados, com mais de 65% de homologia (**Figura 2**) (Kaczynski *et al.*, 2003 para revisão). Análises bioquímicas de ligação ao DNA têm demonstrado que muitos fatores de transcrição da família Sp/KLF têm afinidade similar a diferentes sítios ricos em guanina e citosina (Hagen *et al.*, 1992; Cook *et al.*, 1998) e que existe competição para a ligação nos sítios entre alguns membros, como: Sp1 e KLF9; Sp1 e KLF13; Sp1 e KLF4; KLF1 e KLF3; KLF4 e KLF5 (Suske, 1999; Dang *et al.*, 2000; Kaczynski *et al.*, 2003 para revisão). Contudo, apesar de sítios ricos em nucleotídeos GC serem os motivos padrão para ligação ao DNA, mudanças em aminoácidos chave entre os membros freqüentemente alteram a especificidade de ligação ao DNA. Por exemplo, a mudança de uma histidina por uma leucina no primeiro motivo de dedos de zinco de Sp2 proporciona o aumento da afinidade por sítios ricos em nucleotídeos GT (5'-GGTGTGGGG-3') ao invés dos motivos ricos em GC (Kingsley & Winoto, 1992, Suske, 1999 para revisão). Além disso, outros membros da família Sp/KLF se ligam com grande afinidade a motivos 5'-CACCC-3' presentes no promotor de β -globina. Isto se deve à troca de um aminoácido na região de ligação ao DNA, como ocorrido com Sp2, contudo a troca neste caso é de lisina para leucina e ocorre no terceiro motivo de dedos de zinco (Philipsen & Suske, 1999; Dang *et al.*, 2000 para revisão).

Ao contrário da região carboxi-terminal, que é altamente conservada entre os membros da família Sp/KLF, a região amino-terminal é altamente variável e

responsável pela regulação da transcrição. Dependendo do contexto celular, esta região tem a ação repressora ou ativadora da transcrição (Kaczynski *et al.*, 2003 para revisão).

5.1) *Kruppel-like factor 4*

Kruppel-like factor 4 (KLF4) foi identificado em diferentes células epiteliais do trato gastrointestinal, pele, células endoteliais vasculares, timo, tecido pulmonar, células de sertoli, conjuntiva e células da córnea, tanto ao longo do desenvolvimento como na idade adulta de mamíferos. (Shields *et al.*, 1996; Garrett-Sinha *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2006 para revisão).

A proteína KLF4 possui características em sua seqüência de aminoácidos que determinam sua função como fator de transcrição. KLF4 possui regiões de dedos de zinco, responsáveis pela ligação ao DNA, uma região de hexapeptídeos responsável pela localização nuclear e uma seqüência PEST (sítios ricos prolina, ácido glutâmico, serina e treonina) envolvida com a degradação proteica via proteassomo (Rogers *et al.*, 1986; Shields & Yang, 1997; Kaczynski *et al.*, 2003 para revisão). Jenkins e colaboradores (1998) demonstraram que KLF4 se liga ao DNA por meio de motivos 5'-CACCC-3', descritos como motivos de ligação de KLF1 e KLF2. De modo complementar, no mesmo ano, Shield e Yang propuseram que 5'-(G/A)(G/A)GG(C/T)G(C/T)-3', seria outro sítio consenso para a ligação de KLF4 ao promotor de seus genes alvos. Posteriormente, foi descoberto que KLF4 é capaz de se ligar ao sítio

consenso 5'-GGGGCGG-3', comum a Sp1, e competir com este pela ligação ao sítio alvo (Shie *et al.*, 2000a).

5.2) O fator de transcrição KLF4 e o controle do ciclo celular

Inicialmente, KLF4 foi apontado como um ativador da transcrição (Jenkins *et al.*, 1998), contudo trabalhos posteriores associaram a capacidade de supressão de crescimento com sua ação na repressão transcricional. Em dois trabalhos, Shie e colaboradores (2000 a e b) demonstraram que o aumento dos níveis de KLF4 resulta em parada do ciclo celular, por ligação do fator de transcrição ao promotor da proteína reguladora do ciclo celular ciclina D1 e inibição em torno de 55% da atividade deste promotor.

Além disso, há outras evidências de que KLF4 seja importante na regulação do ciclo celular após dano de DNA, mais precisamente, na transição G1-S. Este fenômeno, em última instância, é resultado do aumento dos níveis de KLF4 e da proteína supressora de tumor p53 e ativação, de modo sinérgico, do promotor do gene da CKI p21^{Cip1}, o que provoca a parada do ciclo celular (Zhang *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2003). Yoon e Yan (2004) sugeriram que, em linhagem de câncer de cólon, KLF4 realiza outro papel importante, contudo, através da interferência na transição G2-M. Após ensaios de dano de DNA, foi demonstrado que o aumento do nível de KLF4 reprime a expressão de ciclina B1, crucial para a transição G2-M, sendo mais um indicativo da ação de KLF4 como regulador negativo na progressão do ciclo celular e de sua ação coordenada com p53 como proteínas supressoras de tumor (Yoon & Yan, 2004).

Em ensaios com camundongos nulos para o gene KLF4 foram identificados problemas na diferenciação da pele e redução de células globosas no cólon. Isto indica que o fator de transcrição em questão está envolvido na transição da proliferação para diferenciação celular (Segre *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2005). De modo relevante, defeitos nesta transição estão frequentemente associados a câncer e inúmeros trabalhos têm demonstrado a diminuição da expressão de KLF4 em diferentes tumores humanos, sendo considerado um prognóstico ruim (Dang *et al.*, 2000 para revisão; Shie *et al.*, 2000b; Katz *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006 para revisão). A redução da expressão de KLF4 em cânceres gástricos pode ser explicada pela perda do locus gênico e pela metilação no promotor nas células presentes no perímetro tumoral (Zhao *et al.*, 2004). Mais recentemente, a associação da perda de KLF4 com o desenvolvimento da doença foi reforçada por ensaio de nocaute condicional de KLF4 em tecido gástrico (Katz *et al.*, 2005). Os camundongos nocaute desenvolveram hiperplasia e pólipos estomacais, reforçando mais uma vez a importante função do KLF4 como supressor de tumor (Katz *et al.*, 2005).

Em contraste com a ação de KLF4 como agente supressor de tumor, alguns grupo têm apresentado como oncogene. Cerca de 70% dos cânceres primários de mama apresentam níveis elevados de KLF4, o que sugere participação desta proteína na fase inicial da progressão deste tipo de câncer (Foster *et al.*, 2000). De modo elegante e esclarecedor, Rowland e colaboradores (2005) reforçaram a ação de KLF4 como oncogene. Estes pesquisadores descreveram o contexto tumorigênico como fundamental para

direcionar a ação de KLF4 como oncogene em detrimento do seu papel como supressor de tumor. Mais recentemente, foi apresentada a ação de KLF4, KLF5 e KLF2 na manutenção da pluripotência de células, sendo que somente a redução dos níveis dos 3 fatores de transcrição resulta em diferenciação celular. Isto se dá porque os referidos fatores de transcrição se ligam de modo redundante em uma sequência regulatória (*enhancer*) presente em diversos genes essenciais à pluripotência de células tronco (Jiang *et al.*, 2008). De fato, KLF4, junto com outros fatores de transcrição (Sox2, Oct4 e c-Myc), é capaz de coordenar a desdiferenciação de fibroblastos em células tronco induzidas (denominadas iPS, para *induced pluripotent stem cells*) (Takahashi & Yamanada, 2006; Qin *et al.*, 2007; Papapetrou *et al.*, 2009; Kunisato *et al.*, 2009; entre outros).

II) OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi investigar os mecanismos intrínsecos envolvidos com o efeito anti-mitogênico induzido pelo neuropeptídeo PACAP38 em progenitores retinianos.

Os objetivos específicos deste trabalho foram os seguintes:

1. Caracterizar a presença do receptor de PACAP, PAC1, em progenitores retinianos;

2. Avaliar a participação dos receptores PAC1 e VPACs no efeito antiproliferativo mediado por PACAP38;

3. Avaliar a influência de AMPc no efeito mediado por PACAP38 na proliferação celular;

4. Avaliar a correlação entre o efeito antimitogênico de PACAP38 e a modulação dos níveis de elementos chave do ciclo celular na retina, tais como ciclina D1 e o inibidor de CDK p27^{kip1};

5. Identificar a presença do fator de transcrição KLF4 e outros membros da família Sp/KLF na retina em desenvolvimento e em particular a presença de KLF4 em progenitores retinianos;

6. Avaliar se PACAP regula os níveis de KLF4 e de outros membros da família Sp/KLF;

7. Investigar a presença de potenciais motivos de ligação de componentes da família Sp/KLF no promotor do gene da ciclina D1 de ratos; e determinar se KLF4 pode se ligar a estes sítios..

III) MATERIAL E MÉTODOS

1) Material

Meio de cultura DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*), soro fetal bovino e Trizol foram obtidos da Gibco BRL/Invitrogen. PACAP38 foi obtido da Peninsula Laboratories e First Strand cDNA Kit da General Electric. Plasmídeo pGEM®-T, T7 e SP6 RNA polimerase foram obtidos da Promega. Anticorpos que identificam ciclina D1, p27^{kip1} foram obtidos da Cell Signaling e anticorpo contra α tubulina da Sigma e anticorpos contra KLF4 e Erk2 foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology. IBMX e H89 foram obtidos da Sigma. Anticorpo contra PCNA foi obtido da DAKO. O DAPI foi obtido da Sigma e o Topro3 da Molecular Probes. As soluções a serem usadas neste trabalho estão presentes no item 14.

2) Preparo dos Explantes de Retina e Histologia

Ratos da variedade Lister-Hooded foram usados neste trabalho. Os protocolos de manipulação destes animais foram aprovados pelo Comitê de Experimentação Animal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, segundo as regras internacionais. Ratos neonatos foram mortos por decapitação instantânea e seus olhos removidos. Após a remoção dos olhos, estes foram deixados em meio DMEM com soro fetal bovino a 5%, onde foi feita a dissecação das retinas. As retinas foram transferidas para uma nova placa de Petri contendo meio DMEM, penicilina / estreptomicina 1%, glutamina 1% e HEPES 20mM acrescido de soro fetal bovino a 5%, cortadas em explantes de aproximadamente 1mm² e mantidas à 37°C em agitação orbital. Ao fim do

período de incubação, os explantes foram fixados por imersão em Paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M pH7,4 por uma hora, lavados em tampão fosfato 0,1M pH7,4 e depois mantidos em sacarose a 30% para criopreservação. O material foi posteriormente orientado em OCT (Tissue-TeK) e congelado em nitrogênio líquido para o preparo de cortes transversais de 10µm de espessura a -20°C em Criostato (Criocut 1800-Leica).

3) Imunocitoquímica para PAC1 e PCNA ou ciclina D1

As retinas de ratos P1 foram lavadas uma vez com PBS e adicionou-se 300µL de tripsina 0,5% diluída em CMF 1X a 37°C. As retinas foram deixadas por 5 minutos na solução de tripsina e, posteriormente, as células foram dissociadas por homogeneização suave por 20 vezes. Após esta etapa, foi adicionado 1mL de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino a 37°C e as células foram plaqueadas em lâminas pré-tratadas com poli-L-lisina 200µg/mL. As células foram deixadas na estufa a 37°C por 30 minutos e para posterior fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos.

A imunocitoquímica para PAC1 (1:100) e PCNA (1:50) foi realizada de acordo com o item 9. As imunocitoquímicas para ciclina D1 (1:100) foram realizadas de acordo com item 9 inicialmente, contudo a revelação dos ensaios foi feita por outro método. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS (item 14) e adicionado o anticorpo secundário policlonal biotilado anti-camundongo (Vector Laboratories) por 1 hora a 37°C. Em seguida, foram adicionados os reagentes A e B (Vector ABC Elite Kit-Vector Labs) e mantidos por 30 minutos à

temperatura ambiente e a revelação a partir do reagente DAB (diaminobenzidina).

4) Imunohistoquímica para KLF4

As retinas de ratos P1 em diferentes idades foram dissecadas e fixadas de acordo com o item 2, os cortes foram lavados 3 vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) (item 14) e incubados com Triton X-100 a 0,5% em PBS por 15 minutos. Terminada esta etapa, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e efetuado bloqueio com albumina sérica bovina (BSA - Sigma) a 1% em PBS pH 7,4 por 1 hora. Os cortes foram incubados com anticorpo contra KLF4 (1:100) por 16 horas a 4°C e as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 10mM pH 7,4 antes da adição do anticorpo secundário Alexa anti-coelho ligado a sonda 555 que incubado por 2 horas à temperatura ambiente, protegido da luz. As lâminas foram montadas com n-propil-galacto 5% em glicerol.

5) Imunohistoquímica dupla para KLF4 e pH3 ou PAC1 e PCNA

Após a fixação e a realização de cortes transversais de retina de ratos P1, foi dado início à imunohistoquímica para KLF4 e pH3 (histona 3 fosforilada na serina 10 - marcador de células proliferantes na fase do G2/M do ciclo celular) ou PAC1 e PCNA (proteína envolvida na maquinaria de replicação). Dados da literatura demonstraram que microondas podem ser utilizadas na técnica de imunodeteção, a fim de melhorar a marcação, pois este tratamento expõe epítomos nucleares, facilitando a detecção pelo anticorpo primário (Brinn e

Terrell, 1986). Portanto, as lâminas com os cortes foram imersas em 10mM de tampão citrato pH 6,0 e colocadas no forno de microondas em potência alta até ferver (Dover e Patel, 1994). Em seguida, foram resfriadas em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS (item 14) e incubados com Triton X-100 a 0,5% em PBS por 15 minutos. Terminada esta etapa, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e efetuado bloqueio com albumina sérica bovina (BSA - Sigma) a 1% em PBS por 1 hora. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal contra KLF4 (1:100) e anticorpo monoclonal contra pH3 (1:100) ou anticorpo policlonal contra PAC1 (1:100) e anticorpo monoclonal contra PCNA (1:50) em 1% BSA por 16 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo anti-camundongo ligado à sonda Alexa 488, anti-coelho ligado à sonda Alexa 555 e Topro3 (Molecular Probes) por 2 horas a temperatura ambiente, protegido da luz. As lâminas foram montadas com meio de montagem n-propil-galacto 5% em glicerol.

6) Ensaio de incorporação de [³H]-timidina

Os olhos de ratos P1 foram dissecados de acordo como item 2. Posteriormente, os explantes de retina foram transferidos para um erlenmeyer com DMEM com 5% de soro fetal bovino e suplementos, como mencionado no item 2, para a realização dos ensaios. Os explantes foram incubados com PACAP38 10nM sob agitação orbital a 37°C por 24 horas. [³H]-timidina (3μL de uma solução 1mCi/mL) foi adicionada em 3mL de meio (conc. final=1μCi/mL)

nas duas últimas horas de ensaio. Terminado o período de incubação, os explantes foram lavados em PBS (item14) e homogeneizados com 500µl de NaOH 0,4N no vortex à temperatura ambiente. Para a realização do ensaio de cintilação líquida, duas réplicas de cada amostra (50µL) foram diluídas em 5mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e homogeneizadas no vortex. Este homogenato foi coletado em filtros GF/A Whatman, sendo os filtros lavados uma vez com TCA 10% e uma vez com etanol absoluto. Em seguida, os filtros foram levados à estufa de 100°C e a radioatividade das frações insolúveis em TCA foi contada num cintilador Packard modelo 1600TR.

Para normalização do ensaio de incorporação de [³H]-timidina foi feita dosagem de proteínas das amostras pelo método de Lowry (Lowry *et al.*,1951), sendo adicionados 6µl das amostras em 194µl de água deionizada. Foi utilizada albumina sérica bovina 1mg/ml para preparo de uma curva padrão.

Após a diluição das amostras e preparo da curva padrão, foram adicionados às amostras 2ml da solução RCA e após 10 minutos à temperatura ambiente foram adicionados 100µL do reativo Folin, feita homogenização em vortex e os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 30 minutos para posterior quantificação da proteína em espectrofotômetro (Hitachi U-1100) no comprimento de onda de 750nm.

7) RT-PCR

7.1) Extração de RNA total

Explantos de retinas de ratos foram obtidos de acordo com o item 2. Os explantes foram lavados com PBS (item 14) posteriormente foram adicionados 500µL da solução TRIZOL (Invitrogen) e o material foi transferido para freezer - 80°C. Foram adicionados 500µL de clorofórmio ao homogenato para posterior centrifugação. O homogenato foi centrifugado a 15000 x *g* a 4°C. Após esta etapa, foi separada a fase aquosa em outro tubo de polipropileno de 1,5mL, adicionado 1mL isopropanol e deixado à temperatura ambiente por 10min para a precipitação do RNA. O material foi centrifugado a 15000 x *g* a 4 °C e lavado com etanol 75%, centrifugado novamente, nas mesmas condições acima. Em seguida, o etanol 75% foi retirado e o material deixado à temperatura ambiente para secar e ser eluído em água. Foi feito tratamento com DNase I livre de RNase (Ambion) e posterior precipitação com 100µL de etanol 100% e 10µL acetato de sódio 3M pH 5,2. No outro dia, o material foi centrifugado a 12000 x *g* a 4°C e lavado com etanol 75%, centrifugado novamente, nas mesmas condições acima. Em seguida, o etanol 75% foi retirado e o material deixado a temperatura ambiente para secar e eluído em água. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop-Eppendorf) no comprimento de onda de 260nm. A pureza do material foi analisada através da razão DO 260nm/ DO 280nm. Por fim, o DNA complementar foi sintetizado com First-Strand cDNA Synthesis Kit (General Electric) de acordo com protocolo do fabricante.

7.2) PCR

Foi avaliada a presença de transcritos Sp1, Sp2, Sp3, Sp4, KLF3, KLF4, KLF5, KLF7 e KLF12 por RT-PCR. O ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizado com os oligonucleotídeos iniciadores listados na tabela 1.. No ensaio de PCR, 1µl do cDNA sintetizado foi adicionado a uma reação contendo 2 unidades de *Taq DNA Polimerase* recombinante (Promega), tampão de PCR 5X, MgCl₂ 2mM, 200µM de cada dNTP (Promega) e 25 pmoles dos oligonucleotídeos, em um volume final de 50µl. As reações de amplificação foram baseadas em: 95°C 10 minutos para desnaturação inicial do cDNA. Nos ciclos de amplificações, 95°C por 1 minuto e 72°C por 45 segundos para extensão na amplificação. E as temperaturas de anelamento e ciclos das diferentes reações estão apresentados na tabela 1, a seguir.

Tabela1: Oligonucleotídeos iniciadores e condições de RT-PCR para os fatores de transcrição da família Sp/KLF

Gene alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura de anelamento (°C)	Ciclos de amplificação
Sp1	5'-ACAGGTAGCAAGTGATGTTCCA-3' 5'-CACACAACCTCACAGGGTGCCAA-13'	60,3	27
Sp2	5'-TGCTCATCTGTGATCAGGCTCCA-3' 5'-AAGATGTCGTAATGAGCGGTGGGT-3'	60,3	30
Sp3	5'-TATTCCTGGCAGACCAAGAGGCA-3' 5'-TTGGCTTCTGCACAGTTAGGAGGA-3'	60,3	27
Sp4	5'-ACAGAAGGACCCACACAGGTGAAA-3' 5'-GTCCAATTAGCCCAGCCTGCAAA-3'	60,3	27
KLF3	5'-TGACCCTGGCCTCTGTTCCAGATTT-3' 5'-GTACTGGCATGCCGCTGTTTGAAT-3'	60,3	30
KLF4	5'-TGATGGGCAAGTTTGTGCTGAAGG-3' 5'-ACAGTGGTAAGGTTTCTGCCTGT-3'	56	30
KLF5	5'-TCGCCAAATATCCAACCTGTCCGA-3' 5'-TCTTGACAATCTGTACTGGGTCCT-3'	60,3	30
KLF7	5'-AGCAGGACTTTGCACACACAAGG-3' 5'-ACCCACACACATACCCACTGTTCAT-3'	56	27
KLF12	5'-TCCCTCTTGGTGGACAACCTGTGTT-3' 5'-AGGGCGTGGATCCAGTTTCATTA-3'	60,3	30
ACTINA	5'-TCATGAAGTGTGGACGTTGACATCCGT-3' 5'-CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG-3'	58	25

7.3) PCR em tempo real

O ensaio de PCR em tempo real foi usado para analisar os níveis de RNAm de KLF4, KLF5, KLF7 após tratamento com PACAP38 10nM por 30 minutos, 1, 3 e 6 horas. Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1µg de RNA, isolado total conforme apresentado no item 4.1.

As reações foram amplificadas no aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) em placas de 96 poços em um volume final de 25µL que continha 1µL de cDNA diluído 66x, 12,5µL de Power SYBR Master Mix (Applied Biosystem) e 200nM final de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2). O programa de amplificação foi de 55°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. As eficiências de amplificação de cada reação foram avaliadas a partir de diluições seriadas do cDNA e após os ensaios realizada relação das massas e dos CTs (Tabela 2). Os dados da curva de desnaturação foram usados para avaliar a especificidade das reações de RT-PCR quanto a contaminações de DNA ou amplificações a partir de dímeros de oligonucleotídeos. A variação dos níveis de RNAm foi calculada com a fórmula $2^{-(\Delta CT)}$, na qual ΔCT é a diferença entre CTs (*threshold cycle*) encontrados para KLF4, KLF5, KLF7, ciclina D1 ou p27^{Kip1} e os CTs do controle de massa actina.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores e as eficiências das reações de PCR em tempo real

Gene alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Eficiências (%)
KLF4	5'-TGATGGGCAAGTTTGTGCTGAAGG-3' 5'-ACAGTGGTAAGGTTTCTCGCCTGT-3'	99,5
KLF5	5'-TCCGATCTCCAACCTGGCCAAATA-3' 5'-TCTTGACAATCTGTAAGGTCCT-3'	99,4
KLF7	5'-AGCAGGACTTTGCACACACAAGG-3' 5'-ACCCACACACATACCCACTGTCAT-3'	99,0
CICLINA D1	5'-GAGACAAGAAACGGTCCAGGTAGT-3' 5'-GAGATTGTGCCATCCATGCGGAAA-3'	99,7
P27^{Kip1}	5'-AGCTTGCCCGAGTTCTACTACAGA-3' 5'-TTTGCCTGAGACCCAATTGAA-3'	99,2
ACTINA	5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT-3' 5'-CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG-3'	97,2

8) Sequenciamento automático

O DNA complementar referentes aos genes foi amplificado de acordo com o item 3.2 e os produtos formados foram purificados com *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (General Electric) e quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop-Eppendorf). 200ng do produto amplificado e 3,2pmols de um dos oligonucleotídeos iniciadores foram adicionados à mistura comercial contendo DNA polimerase, tampão da enzima e os dideoxi-nucleotídeos acoplados a sonda fluorescente (BigDye® XTerminator™ Kit-Applied Biosystem) para posterior sequenciamento automático (ABI Prism 3100-Applied Biosystem). O material seqüenciado foi analisado no programa GeneDoc para avaliar a qualidade da seqüência e selecionar a melhor parte para posterior alinhamento com as seqüências referência de RNAm de *Rattus norvegicus* depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=10116>).

9) Western Blot

Explantos de retinas de ratos P1, P2, P6 ou P10 foram obtidos de acordo com o item 2 e homogeneizados por vortex, 4 vezes a cada 10 minutos, em tampão de extração RIPA acrescido de inibidores de protease e fosfatase, para homogeneização completa do tecido. Logo em seguida, o homogenato foi centrifugado a 15.000 X g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante recolhido em tubo de polipropileno de 1,5mL. Após quantificação de proteínas com o método de Lowry, 30µg de proteína de cada amostra foram preparados para análise em

SDS-PAGE 12%. Os géis de poliacrilamida foram submetidos à corrente constante de 120 V, as proteínas sendo posteriormente transferidas a 200 mA por 2 horas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond, Amersham). Após a transferência, a membrana foi mantida em 5% de leite desnatado diluído em salina tamponada com Tris pH 7,6, suplementada com 0,1% de Tween-20 (Sigma) (TBS-T) sob agitação constante à temperatura ambiente por 1 hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário contra ciclina D1 (1:1000), p27^{Kip1} (1:1000), KLF4 (1:1000), Erk2 (1:5000) ou α -tubulina (1:50000), diluído em 5% de albumina sérica bovina em TBS-T pH 7,6 a 4°C sob agitação constante por 16 horas ou por 1 hora à temperatura ambiente, na reação para α -tubulina. No fim da incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes por 15 minutos com TBS-T pH 7,6 e incubada com o anticorpo secundário ligado à peroxidase (Cell Signaling) em 5% de albumina sérica bovina em TBS-T pH 7,6 por 1 hora. As membranas foram lavadas três vezes por 15 minutos em TBS-T e reveladas usando o sistema ECL-plus (General Electric).

10) Hibridização *in situ*

10.1) Clonagem da sequência de KLF4

A sequência de 400pb do gene de KLF4 obtida por PCR usando os iniciadores presente na Tabela 1 foi clonada no plasmídeo pGEM-T (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. Posterior sequenciamento foi realizado para saber a orientação do inserto e determinação das enzimas para a

linearização de plasmídeo linear. Foram usados 10µg de DNA para digestão com a enzima e tampão apropriados. Ao plasmídeo linearizado foram adicionados 20µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 em água previamente tratada com DEPC (Sigma) até completar o volume para 200µL. Posteriormente foram adicionados 500µL de álcool 100% e o DNA foi precipitado a -80°C por 30 minutos. Logo em seguida, o homogenato foi centrifugado a 15.000 X g por 15 minutos a 4°C. O material foi lavado com etanol 75%, centrifugado novamente, nas mesmas condições acima. Em seguida, o etanol 75% foi retirado e o DNA deixado à temperatura ambiente para secar e eluído em água.

10.2) Transcrição das sondas

As sondas foram transcritas a partir 1µg de plasmídeo digerido, diluído em 12µL de água tratada com DEPC, 2µL de tampão de transcrição 10X, 2µL DIG NTP mix 10X, 2µL RNAsin e 2µL da SP6 ou T7 polimerase por 2 horas a 37°C (Roche). Após a transcrição, os RNAs senso e antissenso foram tratados com 1µL de DNase I livre de RNase (Ambion) e deixados por 15 minutos a 37°C para posterior precipitação. Ao material foram adicionados 160µL de água tratada com DEPC, 20µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 500µL de álcool 100%, e deixado a -80°C por 30 minutos e centrifugado a 20000 X g por 20 minutos. Logo após, o material foi lavado com etanol 75% e centrifugado novamente. Em seguida, o etanol 75% foi retirado e RNA deixado à temperatura ambiente para secar; depois foi eluído em água tratada com DEPC e sua qualidade analisada por gel de agarose (Sambrook & Russel, 2001).\

10.3) Hibridização das sondas

As retinas de ratos P1 foram dissecadas e processadas de acordo com o item 2. As lâminas recém preparadas foram incubadas com 10 µg/mL proteinase K (Roche) por 15 minutos a 37°C e rinsadas com água tratada com DEPC por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram incubadas com TEA 0,1M pH 8 por 5 minutos para em seguida, serem incubadas com 1mL da solução TEA 0,1M pH 8 e 2,5µL de ácido anidrido acético por 10 minutos. As lâminas foram rinsadas com SSC 2X (item 14) e desidratadas com uma série de tratamentos com álcool em porcentagens crescentes por 3 minutos cada (50%, 70%, 95%, 100% e 100%). As lâminas secas, foram lavadas com o tampão Tris-glicina por 30 minutos para posterior incubação com solução de hibridização (item 14) e 1 µg/mL das sondas, a 55°-65°C por 16 horas.

10.4) Revelação da hibridização *in situ*

Após o período de hibridização, as lâminas foram lavadas por 3 vezes de 20 minutos com a solução de SSC 4X (item 14) à temperatura ambiente. Logo após, foi feito tratamento com o tampão RNase A por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, foram feitas lavagens em série com SSC 2X, SSC 1X, SSC 0,5X, SSC 0,1X, por 20 minutos cada, a 55°C e as lâminas foram rinsadas com SSC 0,1X à temperatura ambiente. Neste momento, as lâminas foram incubadas com 1% da solução de bloqueio (item 14) em 100mM de ácido maléico por 1 hora e em seguida foram incubadas com o anticorpo contra DIG (Roche) a 4°C por 16 horas. Depois da incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram

lavadas por 4 vezes de 10 minutos cada com o tampão A (item 14) para posterior lavagem por 10 minutos com Tween-20 0,1% e 0,5 mg/mL de levamisol em tampão B (item 14). A revelação se deu com a incubação das lâminas em solução de 50 mg/mL levamisol, 10% de Tween-20 e BM-purple à temperatura ambiente, protegidas da luz. A reação foi interrompida entre o período de 6 a 24h com lavagem com TE (item 14) por 5 minutos.

11) Predição de motivos de ligação ao DNA na região regulatória dos genes

As regiões dos promotores dos genes de ciclina D1 (AF148946) de *Rattus norvegicus* e ciclina D1 (AF182716) de *Mus musculus* no banco de dados do NCBI foram obtidas. Posteriormente, foi usado como a ferramenta de bioinformática, o programa TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) para a predição dos motivos na região regulatória dos genes ciclina D1. Estas sequencias foram alinhadas no programa *Mafft* (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>).

12) Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (EMSA)

12.1) Extrato de proteínas nucleares

Os explantes foram lavadas com PBS (item 14) e ressuspensos em 900µl de tampão A (item 14) gelado, acrescido do coquetel de inibidores de protease II (Calbiochem) em uma diluição de 1:1000. A suspensão foi transferida para um tubo de 1,5mL e incubada no gelo por 15 minutos. Em seguida, foram

adicionados 100 μ L de NP40 5% (v/v) e a suspensão homogeneizada por inversão do tubo. A amostra foi submetida à centrifugação a 1800 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido completamente e o precipitado descolado do fundo do tubo. Logo em seguida, foi acrescentado ao precipitado 1mL de tampão A e o material centrifugado a 4000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado para posterior ressuspensão do precipitado em 70 μ L de tampão C (item 14) e incubação no gelo por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para tubo de 1,5 mL. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -70°C.

12.2) Marcação radioativa dos oligonucleotídeos

Para a reação de marcação, 5pmols de oligonucleotídeos foram incubados com tampão da enzima T4 polinucleotídeo cinase (BioLabs) em concentração final de 1X, 20U de T4 polinucleotídeo cinase (BioLabs), 40 μ Ci γ [³²P]ATP e água para um volume final de 30 μ L. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora sendo a reação de fosforilação bloqueada com a adição de 1 μ l de EDTA 0,5M pH 8,0. Após a marcação, os oligonucleotídeos foram purificados por cromatografia de exclusão em uma coluna de Biogel 30 (Promega). A coleta das frações foi realizada por meio de eluição em 30 μ L de TE e centrifugação a 1500 X g por 1 minuto. As frações eluídas foram monitoradas com contador *Geiger*.

12.3) Ligação da proteína ao oligonucleotídeo

Para este ensaio foram misturados 10µg de extrato de proteínas nucleares previamente quantificados, 4µl de tampão de ligação 5X, 1µg de Poli - (dl-dC): Poli (dl-dC) (Amersham Pharmacia), 40.000cpm de oligonucleotídeo marcado e água deionizada para um volume final de 20µL. Essa mistura foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 4% (item 14).

12.4) Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese dos produtos da reação de ligação foi realizada em gel de poliacrilamida 4% em condições não desnaturantes (item 14). A solução do gel foi colocada rapidamente entre as duas placas de vidro, separadas por espaçadores de 1 mm de espessura. Após a polimerização completa, as placas com o gel e o tampão de corrida foram colocados na cuba de eletroforese e deixados a 4^oC. As amostras foram aplicadas e a eletroforese correu a 4^oC, por aproximadamente, 3 horas sob corrente elétrica de 6V/cm. Então, o gel foi adsorvido em papel de filtro e seco a 80^oC por 2 horas, sob pressão negativa (secador de gel, modelo SE 1160, Hoeffer Scientific Instruments). O gel desidratado foi exposto ao *PhosphorImage* (Amersham-Pharmacia) e as imagens analisadas através do *Software ImageQuant* (Amersham-Pharmacia).

12.5) Análise de *Supershift*

Para a detecção da presença do fator de transcrição KLF4, extratos de proteínas nucleares foram incubados, no gelo, por 1 hora com 2, 4 e 6µg de anticorpo contra KLF4, antes da incubação com o DNA marcado radioativamente. A corrida eletroforética foi realizada da mesma forma descrita anteriormente para o EMSA (item 14).

13) Análise Estatística

Os resultados de ensaios quantitativos foram analisados estatisticamente usando o programa Prisma, versão 4, onde foi utilizada análise de variância, seguida de comparações múltiplas, empregando o teste-t, teste One Way/Anova e o teste Two Way/Anova, de acordo com cada desenho experimental. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

14) Soluções

PBS

8 g de NaCl

0,2 g de KCl

1,44 g de Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

Acertar pH para 7,4 com HCl e completar com água destilada para 1L

Água DEPC

0,1% DEPC em água deionizada

Incubação por 12 horas sob agitação

Autoclavar

TE

100 mM de Tris.Cl pH 8,0

1 mM de EDTA pH 8,0

TBS-T 0,1%

0,1% de Tween 20
10 mM de Tris-HCl pH 7,6
150 mM de NaCl

RCA

0,01% de CuSO₄
0,02% de tartarato de Na⁺/K⁺
2% Na₂CO₃ em 0,1N de NaOH

Soluções utilizadas para EMSA**Tampão A**

10 mM de HEPES pH 7,9
10 mM de KCl
0,1mM de EDTA
0,1 mM de EGTA
1mM de DTT

Tampão C

20 mM de HEPES pH 7,9
0,4 M de NaCl
1 mM de EDTA
1 mM de EGTA
1 mM de DTT
20% (v/v) de glicerol

Tampão de ligação 5X

50 mM de HEPES pH 7,9
20% de glicerol
5 mM de DTT
5 mM de EDTA
0,5 µg/ mL de BSA

Gel de poliacrilamida 4%

3,8% de acrilamida
0,13% de bis-acrilamida
25 mM de Tris
190 mM de glicina
1mM de EDTA
0,09% de persulfato de amônia
0,08% de TEMED

Tampão de amostra

50% de glicerol;

0,25% de azul de bromofenol

Tampão de corrida

25 mM de Tris
190 mM de glicina
1mM de EDTA

Soluções utilizadas para Western blot:

Tampão de lise de proteína

10 mM Tris base-HCL
150 mM NaCl
1% de NP-40
1% de Triton x-100
5mM de EDTA
0,1% de SDS
1% de deoxicolato de sódio
1 mM de PMSF
10 µg/mL de aprotinina
1 µg/mL de leupeptina
0,5 mM de ortovanadato de sódio
50mM de NaF

Gel de corrida 12%

4 mL de acrilamida-bisacrilamida 30% (29:1)
2,5 mL de Tris 1,5M pH8,8
100 µL de SDS 10%
50 µL de persulfato de amônia 10%
5 µL de TEMED
2,5 mL de água destilada

Gel de empacotamento 5%

1,3 mL acrilamida-bisacrilamida 30% (29:1)
2,5 mL de Tris 0,5M pH 6,8
100 µL de SDS 10%
50 µL de persulfato de amônia 10%
10 µL de TEMED
6,1 mL de água destilada

Tampão de corrida Tris-glicina contendo SDS

25 mM de Tris
250 mM de glicina
0,1% de SDS

Tampão de transferência

25 mM de Tris

192 mM de glicina
20% v/v de metanol

Solução de bloqueio

5% de BSA
0,1% de Tween 20
10 mM de Tris-HCl pH 8,0
150 mM de NaCl

Hibridização *in situ*

0,001% proteinase K

25 mL de 1M Tris pH 8,0
250 µL de proteinase K (10mg/mL)
25 mL de 0,5 M EDTA pH 8,0
200 mL de água deionizada

1M Tris pH 8,0

121,1 g de Tris base

0,5M EDTA

186,1 g de EDTA

1M TEA

185,7g de TEA

20X SSC pH 7,0

175,3 g de NaCl
88,2 g de citrato de sódio
800 mL de água tratada com DEPC

Dextran sulfato

25 g de Dextran sulfato
50 mL água tratada com DEPC

Tampão de hibridização

10 mL de 4XSSC
25 mL de 50% formamida
1 mL de 1X Denhardt's
10 mL de 10% Dextran sulfato
1.5 mL de água tratada com DEPC

Solução de hibridização

4,65 mL de tampão de hibridização
250 uL de DNA simples fita
50 uL de tRNA

400 ng/mL de sonda em solução final de 5 mL

Tampão maleato pH 7,5

5,8 g de ácido maleico

4,4 g de NaCl

3,5 g de NaOH

completar para 500 mL com água tratada com DEPC

Tampão A

50 mL de 1M Tris pH 7,5

15 mL de 5M NaCl

completar para 500 mL com água tratada com DEPC

Tampão B

50 mL de 1M Tris pH 9,5

10 mL de 5M NaCl

25 mL de 1M MgCl₂

completar para 500 mL com água tratada com DEPC

Tampão RNase A

25 mL de 5M NaCl

2,5 mL de 1M Tris

500 uL de 0,5 M EDTA

completar para 250 mL com água tratada com DEPC

Solução cromógena

1 mL tampão B

4,5 uL de NBT

3,5 uL de X-fosfato

10 uL de 24 mg/mL Levamisol

IV) RESULTADOS

1) O receptor PAC1 está presente em precursores retinianos

No sentido de avaliar se PACAP38 pode agir diretamente nas células proliferantes da retina, ensaios anteriores do nosso grupo demonstraram a presença do receptor PAC1 em uma população de células proliferantes (Njaine, 2005). No presente trabalho, foram realizados ensaios adicionais de microscopia confocal e quantificação da presença de PAC1 em uma população de células proliferantes da retina de ratos neonatos.

Por meio de imunofluorescência dupla para o receptor PAC1 e PCNA, proteína envolvida com a maquinaria de replicação, foi possível determinar a presença do receptor PAC1 em uma população de células proliferantes. Em ensaios de imunofluorescência para PAC1 e PCNA em células dissociadas de retina de ratos P1 (**Figuras 2 e 3**). Observou-se através de quantificação de células positivas para PCNA que quase a totalidade das células proliferantes apresentam o receptor PAC1 (84%) (**Figura 3**). Estes resultados demonstram que as células proliferantes apresentam pelo menos um dos receptores ativados pelo peptídeo PACAP38 e levanta a possibilidade de ação direta deste peptídeo nos precursores retinianos.

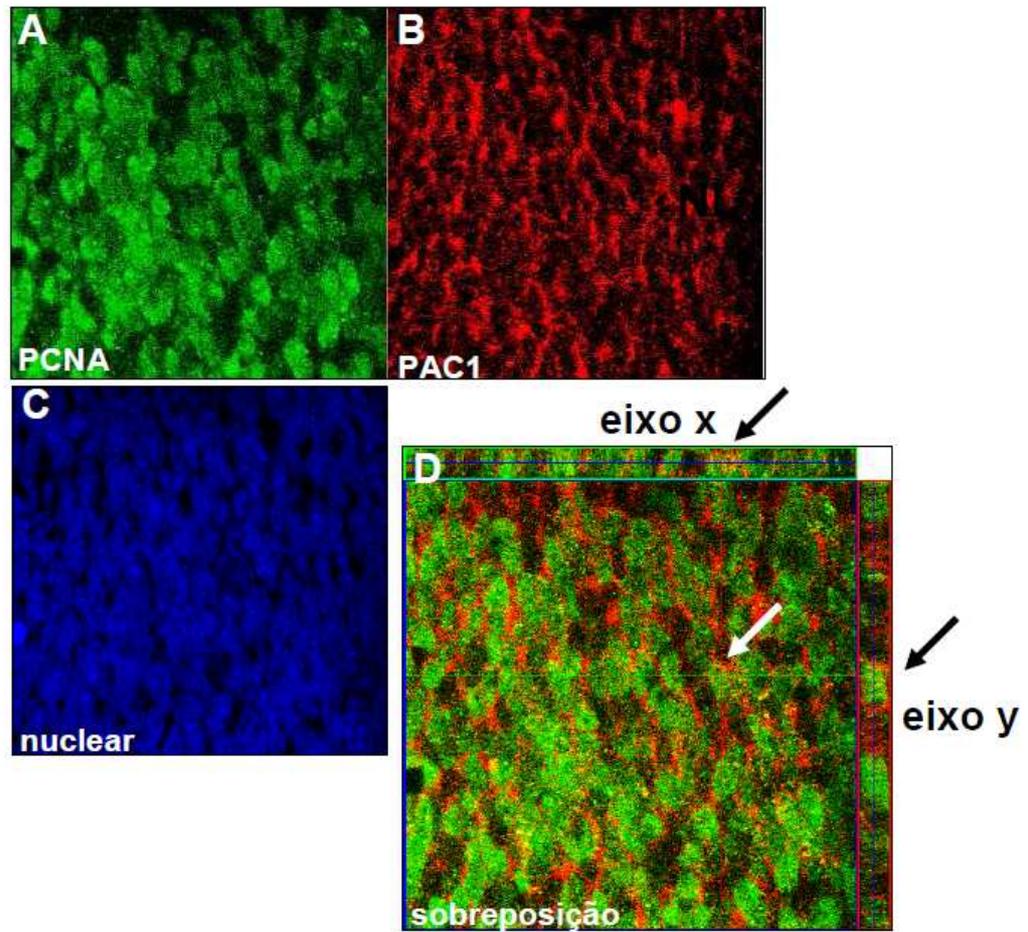


FIGURA 2. O receptor PAC1 está presente em células proliferantes na retina. Retina de ratos neonatos P1 dissecadas e fixadas. A presença de PAC1 em células proliferantes foi analisada por dupla imunofluorescência dupla para PCNA (A) e PAC1 (B) na camada neuroblástica da retina em microscopia confocal. (C) marcação nuclear com Topro 3 e (D) sobreposição. As setas indicam células duplamente marcadas.

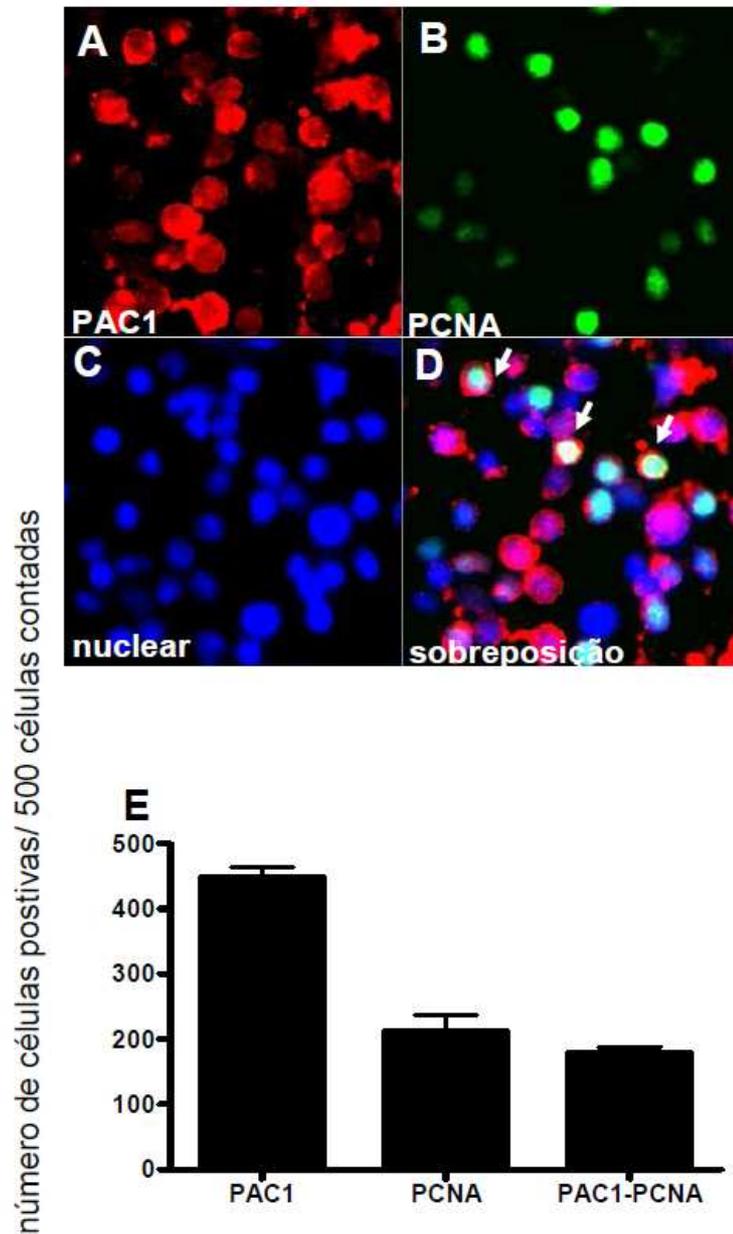


FIGURA 3. Quantificação da presença do receptor PAC1 em células proliferantes na retina. Retinas de ratos neonatos P1 foram dissecadas, dissociadas e plaqueadas. Imunocitoquímica dupla de fluorescência para PAC1 (A) e PCNA (B), marcação nuclear com DAPI (C) e sobreposição (D). (E) Quantificação do número células imunorreativas em 500 células totais n=3. As setas indicam células duplamente marcadas.

2) A ativação dos receptores que respondem a PACAP38 reduz a incorporação [³H]-timidina na retina neonatal

Para testar se o efeito de PACAP38 sobre a proliferação celular era mediado pela interação de PACAP38 com o receptor PAC1, foram usados o agonista do peptídeo maxadilan e o antagonista do peptídeo M65. Em ensaio de incorporação de [³H]-timidina, maxadilan (10nM) promoveu a redução da incorporação, no entanto, M65 (50nM) não bloqueou completamente a ação de PACAP38 (10nM) (**Figura 4A e 4B**). VIP, outro peptídeo da mesma família de PACAP que ativa os receptores VPAC1 e VPAC2, mimetizou os efeitos de PACAP38 na mesma concentração deste peptídeo (**Figura 4C**) assim como do maxadilan. Estes resultados sugerem o envolvimento dos receptores PAC1 e VPACs no efeito antimitogênico mediado por PACAP.

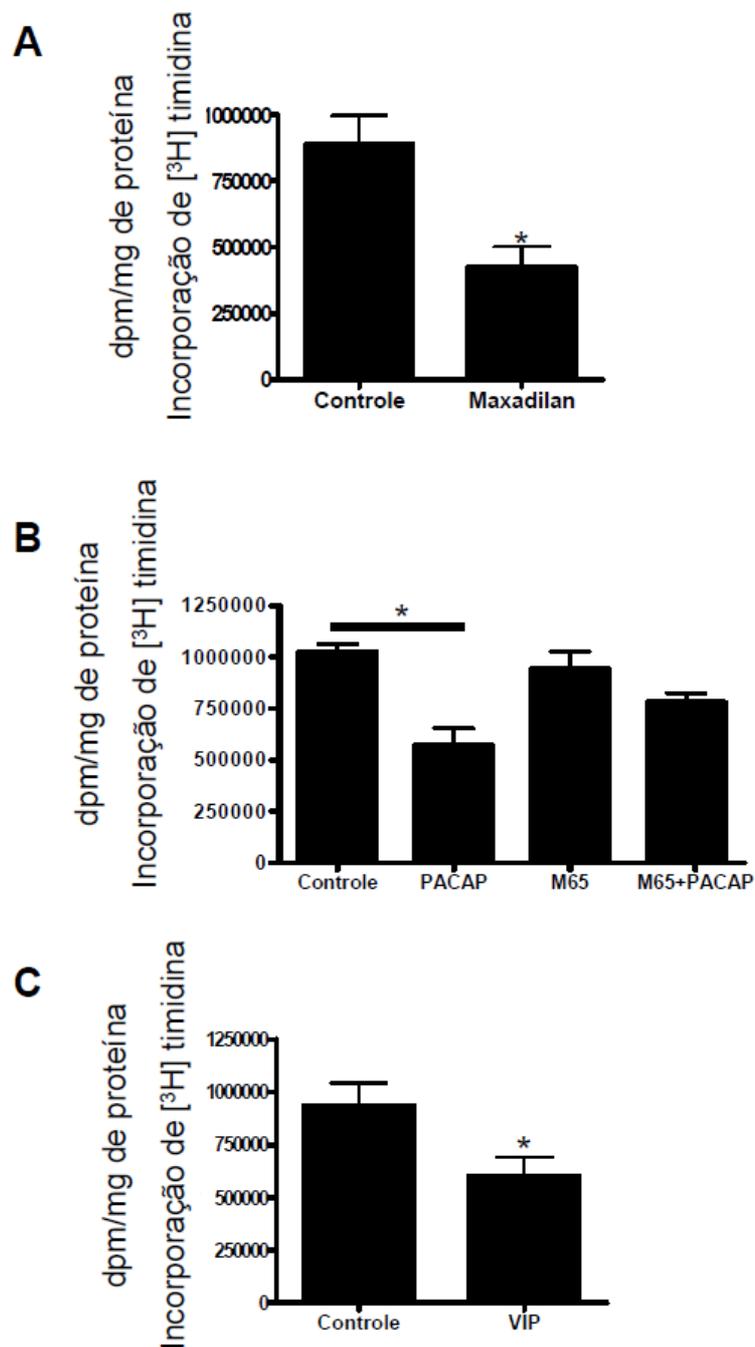


FIGURA 4 . A ativação dos receptores PAC1 e VPACs de PACAP38 reduz a incorporação de [³H]-timidina na retina de ratos P1. Explantes de retina de ratos neonatos P1 incubados na presença ou ausência de (A) maxadilan 10nM (agonista de PAC1)(n=3), (C) VIP 10nM (ativa os VPACs)(n=4) e (B) M65 50nM (antagonista de PAC1) (n=3) e PACAP38 10nM por 24 horas. [³H]-timidina (1 μ Ci/mL) foi adicionada nas 2 horas finais. Análise estatística realizada com teste-t (A e C) e teste One-way Anova com pós teste Tukey (B). * $p < 0,05$.

3) O bloqueio da degradação de AMPc exacerba o efeito antiproliferativo do PACAP38

Os receptores ativados por PACAP têm em comum a capacidade de ativar diversas vias de sinalização intracelular, como por exemplo as vias da adenilil ciclase e de fosfolipase C, contudo foi demonstrada a capacidade do peptídeo ativar somente a via de adenilil ciclase na retina neonatal (Silveira *et al.*, 2002). Além disso, o acúmulo de AMPc tem sido apontado como um regulador negativo da proliferação celular em diferentes tecidos (Fukumoto *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999; van Oirschot *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008).

A partir destas premissas, foi analisada a participação do AMPc induzido por PACAP38 na redução da incorporação de [³H]-timidina na retina de ratos neonatos. Para isso, foi usado IBMX (100µM) por 24 horas, inibidor de fosfodiesterases de AMPc. As fosfodiesterases são enzimas que degradam nucleotídeos cíclicos, portanto a inibição destas enzimas inibe a degradação destes segundos mensageiros, neste caso especificamente o AMPc.

O tratamento com IBMX (100µM) não alterou a incorporação de [³H]-timidina significativamente (**Figura 5**). Já o tratamento com PACAP38 (10nM) e IBMX (100µM) resultou em redução significativa da incorporação de [³H] timidina em comparação a redução realizada por PACAP38 sozinho (**Figura 5**). Estes resultados sugerem que PACAP38 atue como regulador negativo da proliferação celular na retina neonatal por intermédio da via de AMPc.

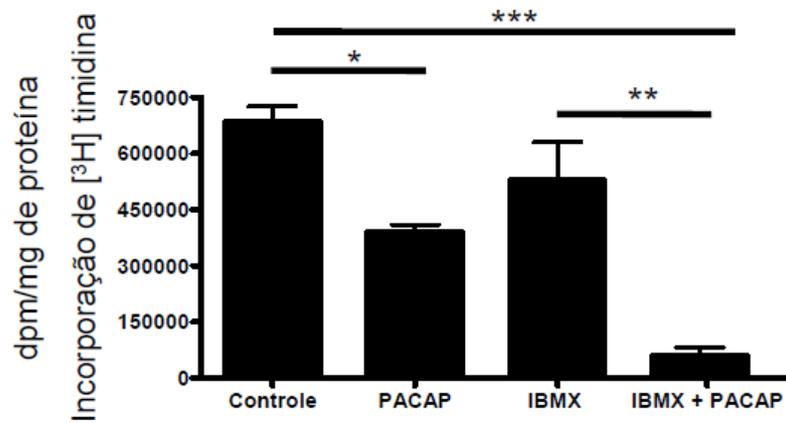


FIGURA 5. O bloqueio da degradação de AMPc exacerba o efeito antiproliferativo mediado pelo PACAP38. Explantes de retina de ratos neonatos P1 foram incubados na ausência (Controle) ou presença de PACAP38 (10nM), IBMX (100µM) e IBMX (100µM) com PACAP38 (10nM) por 24 horas. [³H]-timidina (1µCi/mL) foi adicionada nas 2 horas finais. Análise estatística de dupla variância realizada com o teste Two-Away Anova com pós teste Bonferroni. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$ e *** $p < 0.001$. (n=3).

4) PACAP38 reduz os níveis de ciclina D1 e não interfere com os níveis de p27^{Kip1} na retina neonatal

Os reguladores de proliferação celular, em última instância, controlam os níveis de diferentes efetores envolvidos com o controle do ciclo celular. Dentro do que é peculiar ao desenvolvimento da retina, ciclina D1 e p27^{Kip1} são indispensáveis para o controle da proliferação celular de vasta maioria dos progenitores (Fukumoto *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999; van Oirschot *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008). Dentro deste panorama, foi avaliada a ação do PACAP38 no controle dos níveis de ciclina D1 e p27^{Kip1}. No caso de ciclina D1 foi possível identificar redução significativa dos níveis de RNAm após 6 horas (**Figura 6A**) e dos níveis de proteína de ciclina D1 (**Figura 7A**) e também do número de células positivas para ciclina D1 (**Figura 8**) após 8 horas de incubação com PACAP38 (10nM). Os níveis de RNAm e de proteína de p27^{Kip1}, não foram alterados significativamente na presença do PACAP38 (10nM) com 6 e 8h de tratamento (**Figuras 6b e 7b**). Estes resultados apontam que a redução dos níveis de ciclina D1 está associada ao efeito antimitogênico mediado por PACAP38.

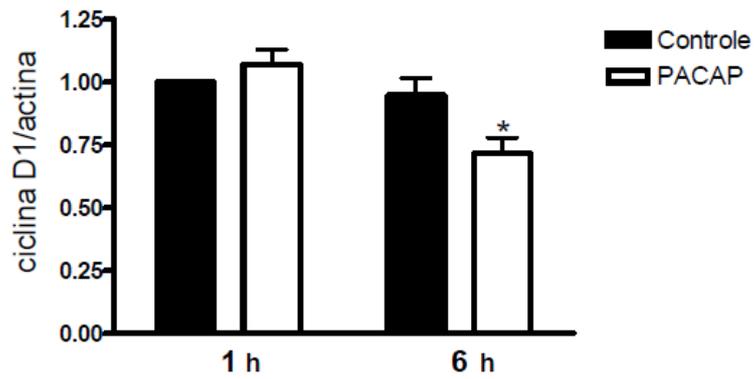
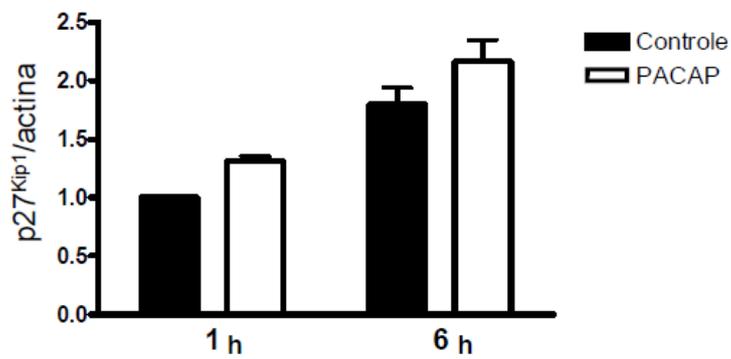
A**B**

FIGURA 6: PACAP38 reduz os níveis de RNAm de ciclina D1 na retina neonatal. Extratos de RNA total foram obtidos de retina de ratos P1 cultivadas por 1 ou 6 horas na presença de PACAP38 (10nM). PCR em tempo real para ciclina D1 (n=6) (A) e p27^{Kip1} (n=6) (B). Análise estatística de dupla variância realizada com o teste Two-way Anova e pós teste Bonferroni. * $p < 0.05$ comparado com o controle.

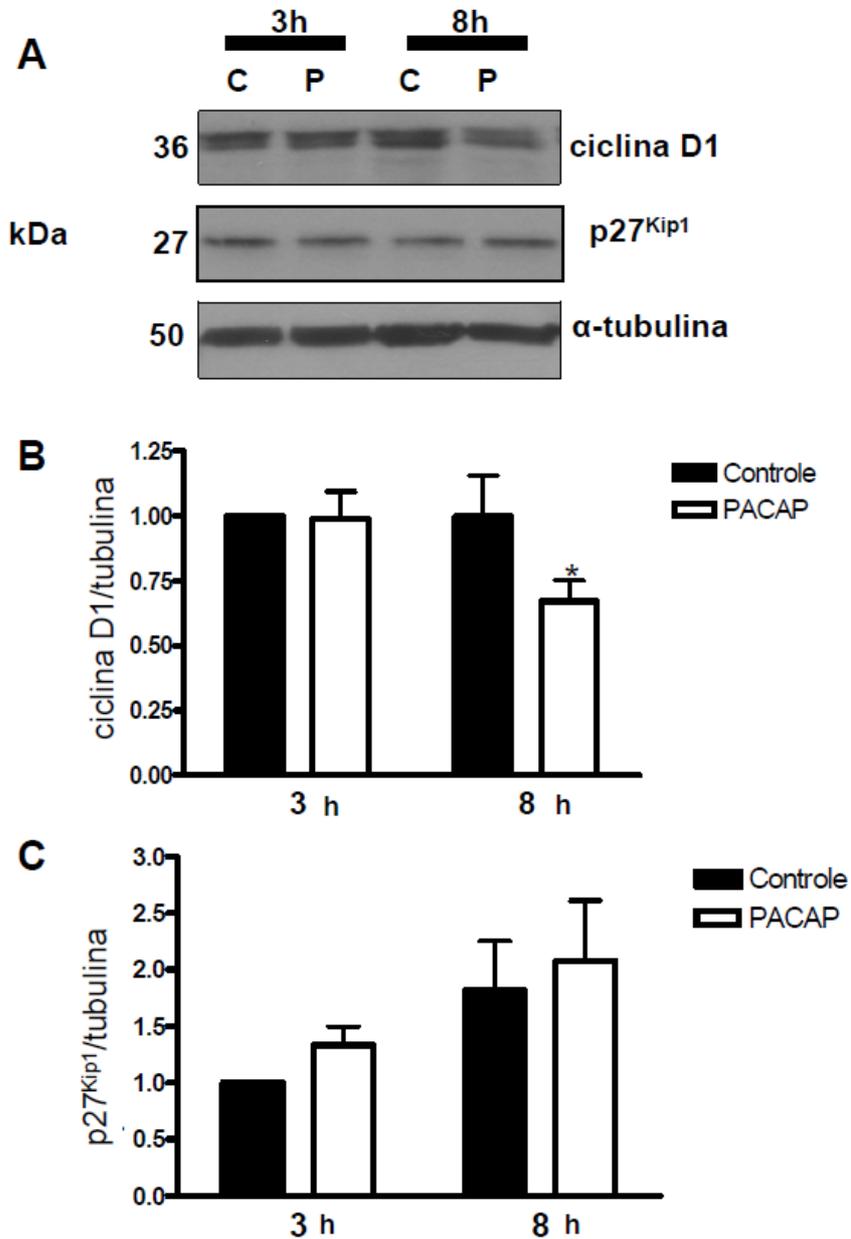


FIGURA 7: PACAP38 reduz os níveis da proteína ciclina D1 na retina neonatal. Extratos de proteína total foram obtidos de retina de ratos P1 cultivadas por 3 e 8 horas na presença de PACAP38 (10nM). Western-blot para ciclina D1, p27^{Kip1} e tubulina (A). Análise densitométrica para ciclina D1 (n=5) (B) e p27^{Kip1} (n=4) (C). Análise estatística de dupla variância realizada com o teste Two-way Anova e pós teste Bonferroni. * $p < 0.05$ comparado com o controle.

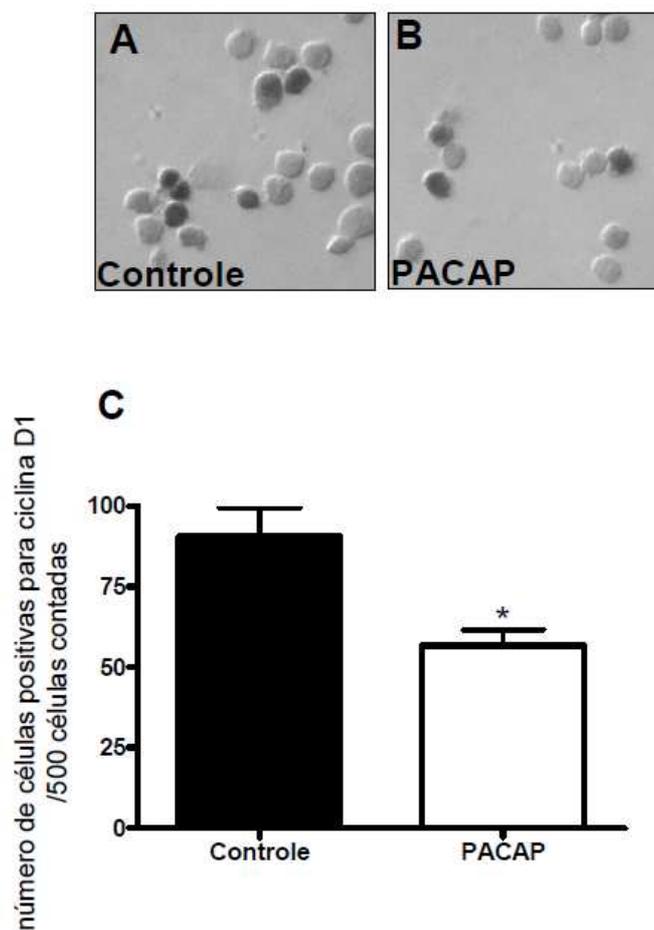


FIGURA 8. PACAP38 reduz o número de células positivas para ciclina D1 na retina neonatal. Retina de ratos neonatos P1 tratadas na presença ou não PACAP38 (10nM) por 8 horas, dissociadas e plaqueadas. Imunocitoquímica para ciclina D1 (A) e (B) na condição controle e tratada respectivamente. Quantificação do número de células imunorreativas em 500 células totais (n=3) (C). Análise estatística realizada com teste-t. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

5) O bloqueio da degradação de AMPc exacerba o efeito do PACAP na redução dos níveis de ciclina D1

A literatura apresenta a cada dia novos trabalhos nos quais o AMPc é caracterizado como regulador negativo da proliferação celular por modular efetores do ciclo celular (Fukumoto *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999; van Oirschot *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008). No presente trabalho foi observamos a participação de AMPc e de ciclina D1 no efeito anti-proliferativo mediado por PACAP38.

A partir desta premissa, foi investigada a possível participação do AMPc induzido pelo PACAP38 e da PKA, seu alvo canônico, no controle dos níveis de ciclina D1. Foram realizados ensaios farmacológicas com IBMX (100µM), inibidor de fosfodiesterases mencionado anteriormente, e H89 (1µM) que inibe a especificamente a atividade de PKA. Os ensaios de PCR em tempo real para avaliar os níveis de RNAm para ciclina D1 geraram resultados similares aos observados para a incorporação de [³H]-timidina (**Figura 5**). O fármaco IBMX potencializou a ação de PACAP38 na redução dos níveis de RNAm de ciclina D1 em comparação a redução observada para o PACAP38 (10nM) após 6 horas de incubação (**Figura 9A**). O tratamento com H89 (1µM) bloqueou o efeito de redução dos níveis de RNAm de ciclina D1 induzido por PACAP38 (10nM) (**Figura 9B**). Estes resultados reforçam a participação da via AMPc-PKA na ação antimitogênica mediada pelo peptídeo.

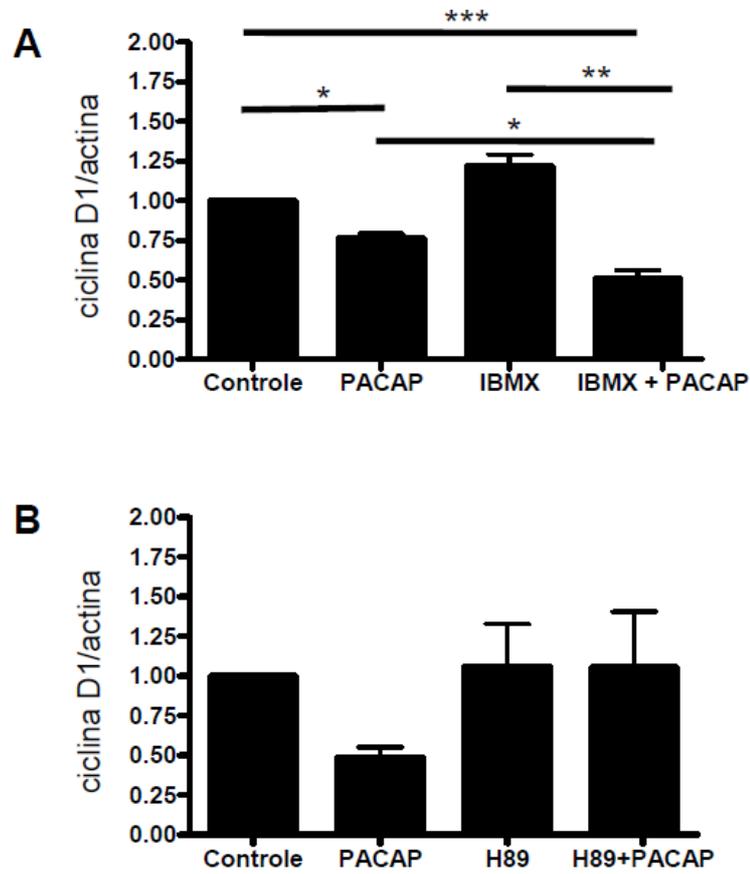
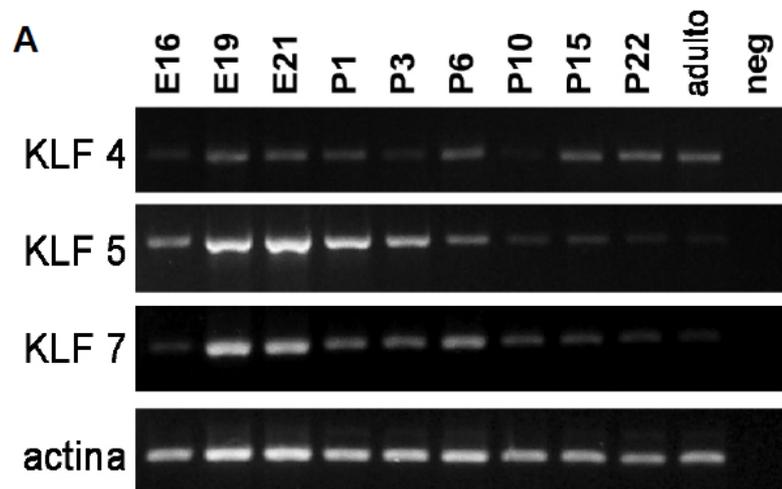


FIGURA 9 . PACAP38 reduz os níveis de RNAm de ciclina D1 via AMPc na retina de ratos P1. PCR em tempo real para ciclina D1. Explantes de retina de ratos neonatos P1 foram incubados na presença ou ausência de PACAP38 (10nM), IBMX (100µM) e PACAP38 (10nM) por 6 horas após prévia incubação IBMX (100µM) por 30 minutos (n=4) (A). Em (B) está representado o ensaio com H89 (1µM) (n=4). Análise estatística de dupla variância realizada com teste Two-Away Anova com pós teste Bonferroni. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$ e * $p < 0.001$.**

6) Presença de membros da família Sp/KLF na retina em desenvolvimento

A família Sp/KLF de fatores de transcrição está envolvida com a regulação de diferentes eventos ao longo do desenvolvimento, como proliferação e diferenciação celular. A ação de seus componentes em ativar ou reprimir a transcrição de genes depende das características de sua região não conservada, assim como da região carboxi-terminal, responsável pela ligação dos membros desta família ao DNA (Kaczynsky *et al.*, 2003 para revisão). Resultados prévios do nosso grupo apontavam para a expressão de KLF4 na retina neonatal e ação de PACAP no controle dos níveis de KLF4.

Com o objetivo de investigar a expressão de outros membros da família SP/KLF na retina de ratos, foram realizados ensaios de RT-PCR a partir de RNA total de retina de ratos de diferentes idades, que demonstraram a expressão de KLF4, KLF5 e KLF7(**Figura 10**). Nestes mesmos ensaios foi identificada a expressão de Sp1, Sp3 e Sp4 e mas não de Sp2, KLF3 e KLF12, outros membros da família Sp/KLF (**dados não apresentados**). A identidade dos produtos de amplificação dos fatores KLF4, KLF5, KLF7, Sp1, Sp3 e Sp4 foi confirmada pelo sequenciamento dos produtos amplificados. Observou-se alta similaridade com as seqüências referências de RNAm depositadas no banco de dados do NCBI para cada um destes fatores de transcrição (**Figura 10B**). A presença da proteína KLF4 foi confirmada por análise de *western-blot* (**Figura 11**).



B

sequência referência	fator de transcrição	<i>E-value</i>
ref NM_053713.1 	Klf4-rattus norvegicus	2e-169
ref NM_053394.2 	Klf5-rattus norvegicus	5e-164
ref XM_001071689.1 	Klf7-rattus norvegicus	0.0
ref NM_012655.1 	Sp1-rattus norvegicus	3e-171
ref NM_001029905.1 	Sp3-rattus norvegicus	3e-162
ref NM_012761.1 	Sp4-rattus norvegicus	0.0

FIGURA 10. Expressão de membros da família Sp/KLFs na retina de ratos em desenvolvimento e adultos. RT-PCR para KLF4, KLF5, KLF7 a partir do cDNA gerado de extratos de RNA total obtidos de retinas de ratos em diferentes idades. O controle negativo da reação de PCR está representado (neg). Os produtos para KLF4, KLF5, KLF7, Sp1, Sp3 e Sp4 foram sequenciados e foi encontrada alta similaridade de sequência em comparação com as sequências referência de RNAm de *Rattus norvegicus* (B). *E-value* é a probabilidade de reconhecimento da sequência em questão ter ocorrido ao acaso.

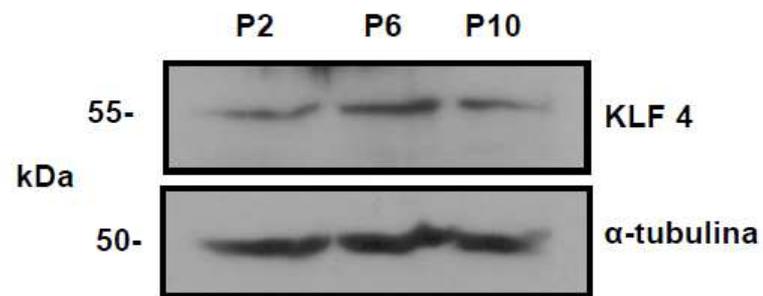


Figura 11: Expressão de KLF4 na retina de ratos em desenvolvimento. Extratos protéicos de explantes de retina de ratos neonatos em diferentes idades. Análise por *western-blot* para KLF4 e tubulina.

7) PACAP38 induz aumento dos níveis de KLF4 na retina neonatal

Em função de dados anteriores que apontavam o papel dos fatores de transcrição KLF4, KLF5 e KLF7 no controle de proliferação e diferenciação celular (Shie *et al.*, 2000 a e b; Dang *et al.*, 2000 para revisão; Laub *et al.*, 2001), procurou-se avaliar a possível ação de PACAP38 no controle dos níveis de KLF4, KLF5 e KLF7 na retina neonatal. Para tal, foram realizados ensaios de PCR em tempo real após incubação de retina de ratos P1 com PACAP38 10nM por 30 minutos, 1, 3 e 6 horas. Após a análise dos resultados foi identificado aumento nos níveis de RNAm de KLF4 de forma transiente e o mesmo não foi observado para KLF5 e KLF7 (**Figura 12**). De acordo com o resultado do ensaio anterior, PACAP38 (10nM) também foi capaz de induzir o aumento dos níveis da proteína KLF4 em análises de *western-blot* após 1 hora de incubação com o peptídeo (**Figura 13**).

Em ensaios de hibridização *in situ* e imunohistoquímica para KLF4 após incubação com PACAP38 (10nM) por 1 hora, foi identificada na condição controle a presença de RNAm e da proteína KLF4 na camada de células ganglionares e camada nuclear interna (**Figura 14 e 15**). Contudo na condição tratada com PACAP38 (10nM) foi identificada a presença de KLF4 nas camadas nucleares mencionadas acima e, também, presença na camada neuroblástica. (**Figuras 14 e 15**).

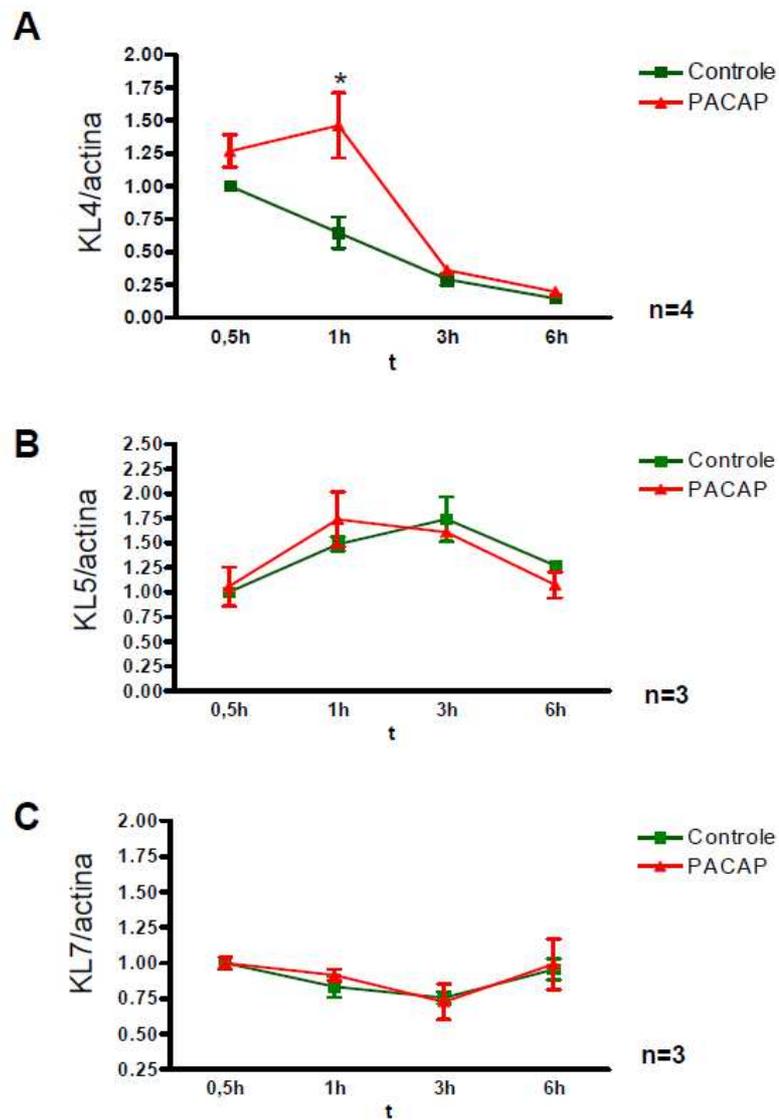


FIGURA 12: PACAP38 induz aumento dos níveis de RNAm de KLF4 na retina neonatal. Retina de ratos neonatos P1 na presença ou ausência (controle) de PACAP38 10nM tratadas por 30 minutos, 1,3 e 6 horas. Análise de PCR em tempo real para KLF4 (n=4) (A), KLF5 (n=3) (B) e KLF7 (n=3) (C). Análise estatística de dupla variância realizada com o teste Two-way Anova com pós teste Bonferroni. * $p < 0,05$.

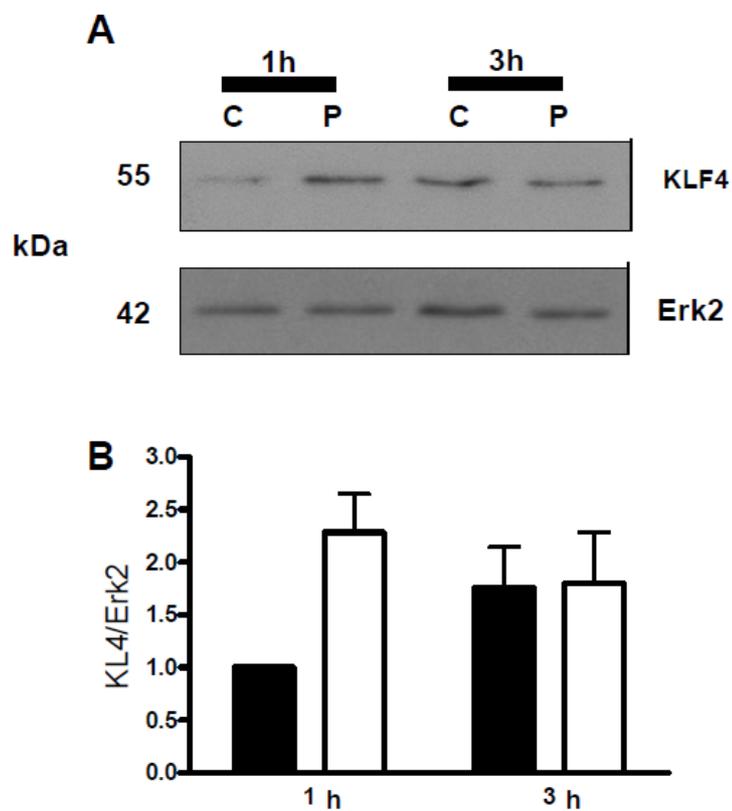


FIGURA 13: PACAP38 induz aumento dos níveis de proteína KLF4 na retina neonatal. Extratos protéicos de retina de ratos neonatos P1 foram obtidos após 1 e 3 horas de tratamento com PACAP38 (10nM). Análise de western-blot para KLF4 (A) e análise densitométrica (n=3) (B). Análise estatística de dupla variância realizada com o teste Two-way Anova com pós teste Bonferroni.

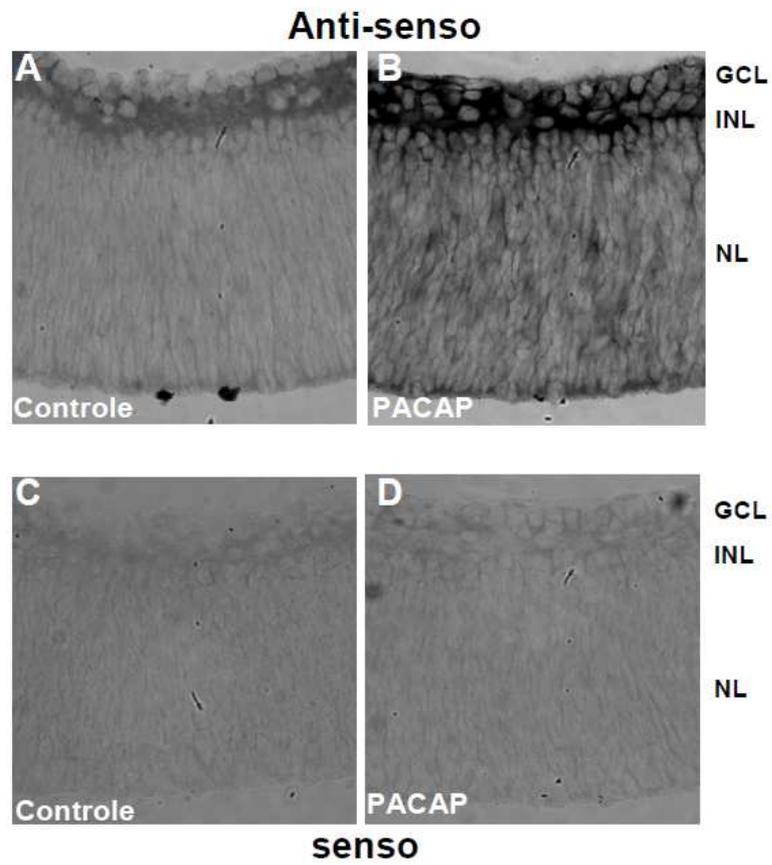


FIGURA 14: PACAP38 induz aumento dos níveis de RNAm de KLF4. Retina de ratos neonatos P1 na ausência (controle) ou presença de PACAP38 (10nM) tratadas por 1 hora. Ensaio de hibridização *in situ* para KLF4 com sonda senso (A e B) e sonda anti-senso (C e D). (GCL-ganglion cell layer), (INL-inner nuclear layer) e (NL-neuroblastic layer).

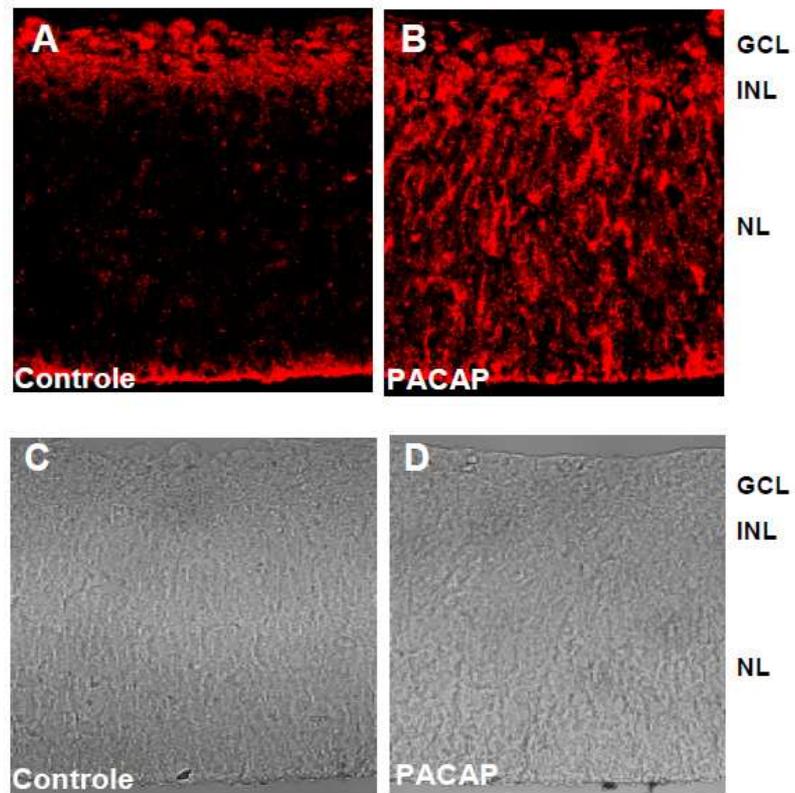


FIGURA 15: PACAP38 induz aumento dos níveis da proteína KLF4 na retina neonatal. Retina de ratos neonatos P1 na ausência (controle) presença de PACAP38 (10nM), tratadas por 1 hora. Ensaio de imunohistoquímica para KLF4 (A e B) e contraste de interferência diferencial (C e D). (GCL-ganglion cell layer), (INL-inner nuclear layer) e (NL-neuroblastic layer).

8) O fator de transcrição KLF4 está presente em uma população de precursores retinianos neonatais

No sentido de avaliar a presença de KLF4 em células proliferantes da retina foi realizada imunohistoquímica dupla para KLF4 e fosfo-histona H3 (pH3, marcador de células proliferantes na fase G2/M) e análise em microscopia confocal após incubação de explantes de retinas de ratos P1 com PACAP38 10nM por 1 hora. Após tratamento com PACAP38 10nM foi possível identificar com mais clareza a presença de KLF4 no núcleo das células positivas para pH3 (**Figura 16**). Este resultado sugere que KLF4 pode agir em células proliferantes da retina.

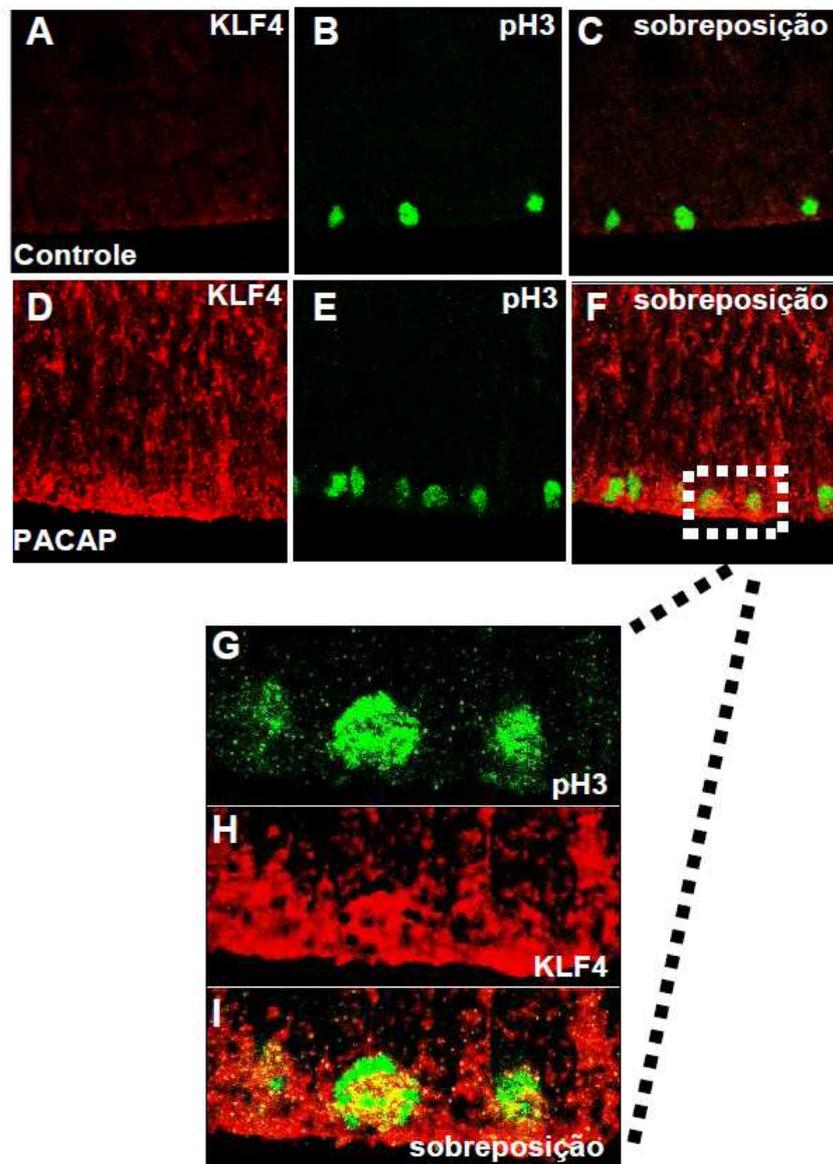


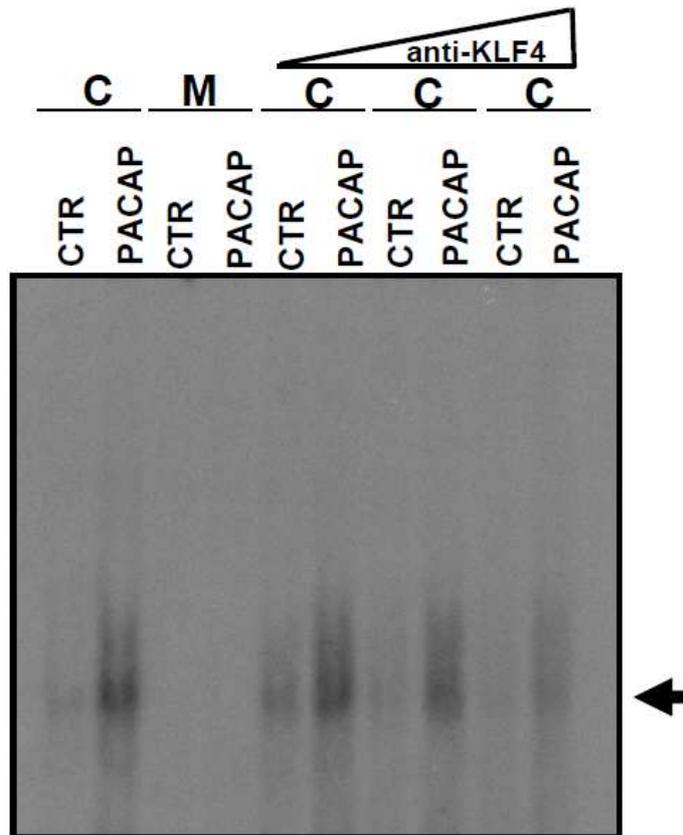
FIGURA 16: KLF4 está presente em uma população de células proliferantes da retina. Imunofluorescência dupla (KLF4 e pH3) analisada em microscopia confocal. Explantes de retina de ratos P1. (A-C) Controle; (D-F) PACAP (10nM) por 1 hora. (G-I) Imagens obtidas com objetiva de 100 x.

9) Identificação de motivos sp1 na região regulatória do gene da ciclina D1 de ratos

Shie e colaboradores (2000a) demonstraram a presença de motivos sp1 na região regulatória do gene da ciclina D1 de *Homo sapiens* à qual KLF4 se liga e atua como regulador negativo. Baseados nesta premissa fomos avaliar a presença de motivos sp1 nos promotores dos genes de ciclina D1 e p27^{Kip1} de *Rattus norvegicus*. Foi possível identificar 4 motivos sp1 no promotor de ciclina D1 (**Figura 17**) e o mesmo não foi observado para a região regulatória de p27^{Kip1} (**dados não apresentados**). Os dois primeiros motivos mais próximos à região codificante possuem a sequência CACCC que é mais específica para a associação dos fatores KLFs (**Figura 17A**) e os outros dois motivos mais a montante possuem seus cernes ricos em nucleotídeos GC que são sítios gerais de a ligação de membros da família Sp/KLFs (**Figura 17B**).

10) O fator de transcrição KLF4 presente na retina se liga ao motivo sp1 presente no gene de ciclina D1

Para testar a ligação de KLF4 aos motivos sp1 presentes na região regulatória do gene de ciclina D1 de *Rattus norvegicus* foram realizados ensaios de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA). Extratos nucleares de retinas de ratos P1, tratadas ou não com PACAP38 (10nM) por 1 hora, foram submetidos com a sonda consenso ou mutante para sp1 à migração em gel não desnaturante. Foi observada a presença de um complexo entre sonda consenso e proteínas nucleares em ambas as condições experimentais (**Figura 18**). Contudo, o mesmo não foi identificado quando foi usada a sonda mutante, um controle de especificidade de ligação das proteínas à sonda sp1 (**Figura 18**). A adição do anticorpo específico para KLF4 em concentrações crescentes a reação de ligação da sonda consenso e proteínas nucleares resultou em diminuição da marcação em comparação com as condições sem anticorpo. Este resultado aponta para a presença de KLF4 no complexo formado (**Figura 18**). Por fim, estes achados sugerem que KLF4, presente no núcleo das células retinianas, pode se ligar aos sítios sp1 presentes na região regulatória do gene de ciclina D1.



sp1 consenso (5'-ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C-3')

sp1 mutante (5'-ATT CGA TCG GTT CGG GGC GAG C-3')

FIGURA 18: O fator de transcrição KLF4 presente na retina neonatal se liga ao motivo sp1. Ensaio de Mobilidade Eletroforética (EMSA) com extratos nucleares obtidos de explantes de retina de ratos P1 na ausência (controle) tratados por 1 hora com PACAP38 (10nM) (n=3). C-sonda sp1 consenso, M-sonda mutante. A presença de KLF4 foi confirmada por pré-incubação com 2, 4 e 6µg de anticorpo específico contra KLF4.

V) DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo analisar os mecanismos envolvidos com o efeito antiproliferativo mediado por PACAP38 na retina neonatal. A compilação dos achados deste estudo apontam para o papel de PACAP38 no controle da proliferação celular por intermédio da redução dos níveis de ciclina D1 de maneira dependente da via de AMPc-PKA. Adicionalmente, foi demonstrada pela primeira vez a presença dos fatores de transcrição KLF4, KLF5 e KLF7 na retina em diferentes estágios do desenvolvimento e sugerida a participação de KLF4 na redução da transcrição de ciclina D1 nos precursores retinianos.

Durante os últimos 20 anos, o Laboratório de Neurogênese, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, tem se dedicado a estudar diferentes aspectos do desenvolvimento retiniano e aplica o modelo de cultura organotípica de explantes. Este modelo, que é base de muitos trabalhos do nosso grupo, mantém as conexões entre os diferentes tipos de populações celulares em estágios diversos do desenvolvimento retiniano e é considerado um bom modelo para estudos do desenvolvimento do sistema nervoso central (Rehen *et al.*, 1996).

O nosso grupo tem ajudado a compreender melhor a importância de fatores extrínsecos e intrínsecos que coordenam a formação da retina madura. Dentre as diversas famílias de fatores extrínsecos, nossos estudos apontam para neurotransmissores, neuropeptídeos, citocinas e sua indução de vias de transdução de sinal induzidas como agentes importantes na coordenação do

desenvolvimento retiniano (Silveira *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2005; Adão-Novaes *et al.*, 2009).

Inicialmente, nosso grupo se deteve no âmbito dos estudos dos fatores envolvidos com o controle de morte celular. Os estudos de Rehen e colaboradores (1996) apresentaram AMPc como um agente neuroprotetor em populações de células pós-mitóticas indiferenciadas. Em adição, este trabalho estabeleceu um modelo de morte celular por inibição da síntese protéica que foi e é largamente usado por nosso grupo em suas diferentes linhas científicas. Posteriormente e de maneira complementar, Varella e colaboradores (1997 e 1999), a partir de ensaios farmacológicos mais completos, ratificaram a função de AMPc no controle da morte celular e apontaram a dopamina como um mediador neuroprotetor envolvido com o aumento de AMPc na retina.

Dentre as diversas famílias de neuropeptídeos, um em especial chamou a atenção pela capacidade de induzir aumento de AMPc: o neuropeptídeo PACAP. Este foi isolado justamente por sua capacidade de induzir a produção de AMPc em cultura de células da pituitária anterior de ratos (Miyata *et al.*, 1989). O peptídeo PACAP tem sido apontado como modulador de diferentes vias intracelulares que controlam a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular e neuroquímica (Lu & DiCicco-Bloom, 1997; Lu *et al.*, 1998; DiCicco-Bloom *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2002; Borba *et al.*, 2005; Scharf *et al.*, 2008; Fila *et al.*, 2009).

Os neuropeptídeos são muito conservados evolutivamente e estão presentes no clado dos eumetazoos desde os celenterados e o PACAP não foge

a regra (Hokfelt *et al.*, 2000; Sherwood *et al.*, 2000). Estes fatores extrínsecos são encontrados em concentrações nanomolares a micromolares em diferentes tecidos e ativam seus receptores específicos em concentrações mais baixas que os neurotransmissores (Barg *et al.*, 2002). Nos últimos 30 anos, muito tem-se avançado para entender melhor a presença destes fatores extrínsecos, vias de transdução de sinal ativadas e funções no sistema nervoso central (Bagnoli *et al.*, 2003 para revisão). Os estudos de Silveira e colaboradores (2002) iniciaram as investigações da ação dos peptídeos neuroativos na retina por nosso grupo. Os achados deste estudo apresentaram o PACAP como indutor de neuroproteção na retina neonatal de maneira dependente da via de AMPc-PKA.

Durante o desenvolvimento da retina, é necessário que a proliferação celular seja regulada de forma que tanto os tipos celulares gerados inicialmente quanto tipos celulares tardios sejam formados nas proporções adequadas. A influência em proliferação celular atribuída ao PACAP não se restringe a poucos modelos. Vêm sendo demonstrados também efeitos deste peptídeo na indução da proliferação em cultura de astrócitos, de progenitores de oligodendrócitos e de células tronco neurais de cérebro adulto (Lee *et al.*, 2001; Haradaharmar *et al.*, 2003; Mercer *et al.*, 2004). Por outro lado, PACAP possui ação, também, de redução da proliferação celular nos precursores corticais, da linhagem de glioblastoma T98G e na reversão do efeito proliferativo de Sonic Hedgehog em precursores cerebelares (Vertongen *et al.*, 1996; Suh *et al.*, 2001; Nicot *et al.*, 2001; Nicot *et al.*, 2002; Carey *et al.*, 2002).

Na retina, pouco se tem descrito sobre aspectos funcionais de PACAP38, PACAP27 e VIP, particularmente, no que diz respeito ao desenvolvimento desta estrutura do sistema nervoso central. Como mencionado anteriormente, resultados de nosso grupo apresentaram PACAP como agente envolvido no controle da sobrevivência neuronal dependente da via AMPc-PKA (Silveira *et al.*, 2002). Mais recentemente, também pelo nosso grupo, foi identificada a presença de PACAP e seus receptores na retina neonatal e a presença do receptor PAC1 em células proliferantes (Njaine, 2005). Esses dados foram confirmados neste trabalho em ensaios mais robustos, apontando uma possível ação direta de PACAP nos precursores retinianos (**Figuras 2 e 3**). Nosso estudo anterior já havia apresentado PACAP como regulador negativo da proliferação celular na retina neonatal, com sugestão da participação do receptor PAC1 e do segundo mensageiro AMPc (Njaine, 2005). Ensaios mais consistentes realizados no presente trabalho mostram que o receptor tipo I (PAC1) e os receptores do tipo II (VPACs) estão envolvidos com a regulação negativa da proliferação mediada por PACAP38 (**Figura 4**).

A indução de AMPc e a ativação de dois de seus efetores PKA e EPAC têm papel fundamental no controle de diferentes eventos (Shi *et al.*, 2006; Hochbaum *et al.*, 2008; Ster *et al.*, 2009). Nas análises de Silveira e colaboradores (2002) foi observado o acúmulo de AMPc e não de IP₃, em resposta a PACAP38. Nesta tese, foi analisada a ação de AMPc induzido por PACAP38 no controle da proliferação celular na retina. Por intermédio de ensaios de proliferação celular realizados com IBMX e PACAP38 foi observada

a ação sinérgica desses fatores na redução na incorporação de [³H]-timidina em comparação à redução observada na presença somente de PACAP38 (**Figura 5**). Por conseguinte, isto sugere a participação de AMPc no efeito antimitogênico mediado por PACAP na retina neonatal e está de acordo com estudos na literatura que relatam a ação antimitogênica do AMPc (Fukumoto *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999; van Oirschot *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008).

A ação de vários fatores extrínsecos no controle da proliferação celular muitas das vezes influencia os níveis de proteínas de ciclo celular, como ciclinas e CKIs (inibidores de cinases dependentes de ciclinas) e a atividade de complexos formados por ciclinas e CDKs (cinases dependentes de ciclinas) (Pei & Xiong, 2005 para revisão). A família das CKIs é importante na regulação da proliferação durante o desenvolvimento, por bloquear a atividade dos complexos ciclinas-CDKs (Nagahama *et al.*, 2001; Dyer & Cepko, 2001). De acordo com Dyer e colaboradores (2001) as CKIs, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}, são expressas em subpopulações distintas de precursores retinianos e na retina pós-natal estas proteínas estão envolvidas com a determinação de tipos celulares da retina. Além disso, foi demonstrada a ação de PACAP na redução da proliferação celular em precursores corticais em consequência do aumento da expressão de p57^{Kip2} e consequente diminuição da atividade de CDK2 (Carey *et al.*, 2002). Contudo, o presente estudo e dados anteriores sugerem que este não é o mecanismo disparado por PACAP na retina (Njaine, 2005).

Está estabelecido na literatura que a ciclina D1 é o tipo de ciclina D mais expressa nos progenitores retinianos e que é importante para a progressão do ciclo celular neste tecido. O mesmo não acontece com ciclina D3 que é expressa na glia de Muller, e ciclina D2, que não é expressa na camada neuroblástica da retina (Dyer & Cepko, 2000; Carthon *et al.*, 2002). A expressão de ciclina D1 está presente na camada germinativa da retina em desenvolvimento e a diminuição dos níveis de ciclina D1 leva à formação de uma estrutura hipoplásica (Fantl *et al.*, 1995).

Dados não publicados de análises de micro-arranjos de nosso grupo (em colaboração com Dr Victor May, Universidade de Vermont) indicavam que PACAP38 poderia reduzir os níveis de ciclina D1 na retina neonatal. No presente trabalho foi confirmada esta hipótese, pois PACAP38 promoveu redução dos níveis de RNAm e da proteína ciclina D1, após em 6 e 8 horas de exposição respectivamente, e o mesmo não foi identificado para p27^{kip1}. (**Figuras 6-8**). Contudo, mesmo tendo observado resultados que apontam ciclina D1 como coordenador do mecanismo antimitogênico mediado por PACAP, não se pode deixar de aventar a possível ação do peptídeo sobre outros efetores do ciclo celular. Tem sido apontada a possível ação de p19^{nk4}, ciclina A e ciclina B no controle da proliferação celular na retina em desenvolvimento (Cunningham *et al.*, 2002; Barton & Levine, 2008). Tendo isto em vista, futuramente, é nosso interesse testar o efeito de PACAP sobre diferentes efetores do ciclo celular.

Mediante evidências que apontam a importância da via AMPc-PKA para os efeitos de PACAP na retina neonatal, foi avaliado se esta via de transdução

de sinal influencia os níveis de ciclina D1 em resposta a PACAP38. Após ensaios com os fármacos IBMX e H89 que afetam de maneira positiva e negativa a via de AMPc-PKA, respectivamente, foi identificado que o bloqueio da degradação de cAMP (IBMX) reduz os níveis de RNAm de ciclina D1, enquanto que a inibição de PKA (H89) tem efeito oposto. (**Figura 9**). Por conseguinte, este conjunto de resultados aponta para redução dos níveis de RNAm de ciclina D1 como um mecanismo envolvido com o efeito anti-proliferativo de PACAP38 e sugere a dependência da via de AMPc-PKA para tal. Este trabalho corrobora outros estudos na literatura que apontam AMPc como controlador negativo da proliferação celular por interferir em componentes do ciclo celular (Fukumoto *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 1999; van Oirschot *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008).

Além de sua função na proliferação celular na retina, ciclina D1 tem sido apresentada como importante elemento do controle de proliferação celular em outras estruturas do sistema nervoso central, como medula espinhal, cerebelo e córtex cerebral (Tong & Pollard, 2001; Ciemerych *et al.*, 2002; Kozar *et al.*, 2004; Pogoriler *et al.*, 2006). No cerebelo, os níveis de ciclina D1 de forma coordenada com ciclina D2 são essenciais para o controle da proliferação dos precursores granulares, pois a perda da expressão destes dois efetores do ciclo celular resulta no desenvolvimento de um cerebelo hipoplásico e quase sem as foliações características deste tecido (Ciemerych *et al.*, 2002).

Ao contrário de PACAP38, Sonic Hedgehog é um fator extrínseco que na retina regula a proliferação celular de forma positiva, por intermédio do aumento

dos níveis de ciclina D1 (Wang *et al.*, 2005). Como já mencionado anteriormente, PACAP também apresenta efeito atimitogênico no cerebelo, e nesta estrutura age de modo coordenado com Sonic Hedgehog em precursores granulares (Nicot *et al.*, 2002). A perda da expressão de PACAP ou ativação desregulada da via de Sonic Hedgehog resultam em desenvolvimento de meduloblastoma que é inibido pela supressão de ciclina D1 (Waschek *et al.*, 2006 para revisão; Pogoriler *et al.*, 2006; Lelievre *et al.*, 2008). Na retina a relação destes dois fatores extrínsecos necessita ainda ser investigada e é interesse do nosso grupo avaliar a ação coordenada destes dois fatores extrínsecos no controle da proliferação celular. De fato, a literatura tem apresentado a via AMPc-PKA como reguladora negativa da via induzida por Sonic Hedgehog (Noveen *et al.*, 1996; Hammerschmidt *et al.*, 1996; Nicot *et al.*, 2002; Waschet *et al.*, 2006 para revisão). Resultados preliminares do nosso grupo sugerem PACAP38 capaz de regular de forma negativa componentes da via de Sonic Hedgehog na retina neonatal. Na presença de PACAP38 os níveis de RNAm de genes alvo da via de transdução de sinal mediada por Sonic Hedgehog ,como Gli1 e Ptc1, são reduzidos em 55% e 35%, respectivamente, em relação ao controle.

Os fatores de transcrição da família Sp/KLF estão implicados no controle de diferentes eventos como proliferação e diferenciação celular e a perda da regulação dos níveis destes fatores de transcrição pode resultar no desenvolvimento de câncer. Muitos dos membros da família Sp/KLF são ubíquos, como Sp1, KLF5 e KLF7 e necessários para o desenvolvimento de

diferentes tecidos (Kaczynski *et al.*, 2003 para revisão). No entanto, outros membros estão restritos a alguns tecidos, como KLF1 e KLF2, que estão presentes nos eritrócitos e linfócitos T, respectivamente (Kaczynski *et al.*, 2003 para revisão). Mais recentemente, alguns membros da família Sp/KLF ganharam grande notoriedade no campo de estudos de células tronco. Os fatores de transcrição KLF2, KLF4 e KLF5 têm sido apontados como agentes importantes na manutenção da pluripotência de células tronco (Jiang *et al.*, 2008). E uma série de trabalhos, KLF4, em conjunto com Sox2, c-myc e Oct4, foram usados na desdiferenciação de fibroblastos em células tronco pluripotentes induzidas (iPS) (Takahashi & Yamanada, 2006; Qin *et al.*, 2007; Papapetrou *et al.*, 2009; Kunisato *et al.*, 2009).

KLF4 está presente em diferentes tecidos do aparelho digestivo, tecido mamário e também no sistema nervoso central (Dang *et al.*, 2000; Katz *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009). O aumento dos níveis de KLF4 pode resultar em parada do ciclo celular, por ligação do fator de transcrição ao promotor da proteína reguladora do ciclo celular ciclina D1 (Shie *et al.*, 2000 a e b). Outras evidências apontam, também, que KLF4 é uma proteína importante na regulação do ciclo celular após dano de DNA. E neste caso isto se daria por aumento dos níveis de KLF4 e da proteína supressora de tumor p53 e ativação do promotor do gene da CKI p21^{Cip1}, o que provoca a parada do ciclo celular (Zhang *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2003).

Em contraste à ação de KLF4 como agente supressor de tumor, alguns grupos têm descrito KLF4 como oncogene. Em um contexto de inativação de

p21^{Cip1}, a ação citostática de KLF4 foi reduzida e este fator de transcrição agiu no direcionamento para a transformação oncogênica (Rowland *et al.*, 2005). Neste mesmo trabalho, foi também apresentada o efeito ação de KLF4 na redução dos níveis de p53, ao se ligar diretamente ao promotor do gene p53, ação inversa ao que a literatura apresentara até então. Este conjunto de dados aponta o contexto tumorigênico como fundamental para direcionar a ação de KLF4 como oncogene, em detrimento do seu papel como supressor de tumor (Rowland *et al.*, 2005).

Inicialmente, dados preliminares do nosso grupo apontaram a presença de KLF4 na retina neonatal e a possível ação de PACAP38 no aumento dos níveis de RNAm de KLF4 neste tecido. Em adição a estes dados preliminares, a literatura apresenta KLF4 como fator de transcrição envolvido com a inibição da atividade do promotor de ciclina D1. Este contexto nos instigou a perguntar se KLF4 poderia ter participação no efeito antimitogênico de PACAP38 na retina. No presente trabalho, além de ter sido ratificada a presença de KLF4 na retina, foi, também, demonstrada a presença de KLF5, KLF7, Sp1, Sp3 e Sp4 na retina (**Figura 10 e 11B**).

Na retina, PACAP é agente antimitogênico e foi capaz de induzir aumento dos níveis de KLF4 na camada neuroblástica (**Figura 14 e 15**), com imunomarcção no núcleo de uma população de células proliferantes (pH3 positivas) (**Figura 16**). Adicionalmente, foi demonstrado que KLF4 obtido de extratos nucleares de retinas de ratos P1 pode se ligar a motivos sp1 (**Figura 18**) que foram identificados no promotor do gene de ciclina D1 de ratos (**Figura**

17). Em conjunto, estes dados sustentam a hipótese de ligação de KLF4 no promotor do gene de ciclina D1 (**Figuras 12-18**). Entretanto, teremos que identificar a função de KLF4 no controle da proliferação celular e a importância deste fator de transcrição como mediador da ação de PACAP na proliferação celular na retina. Para tal, temos como perspectivas futuras a aplicação de ensaios de superexpressão e de interferência de RNA (RNAi) com KLF4.

A partir dos dados gerados por este trabalho, é sugerido a ação de KLF4 na regulação dos níveis de ciclina D1 como mecanismo envolvida no efeito anti-proliferativo mediado por PACAP38. Além disso, como o segundo mensageiro AMPc parece estar envolvido com os efeitos mediados por PACAP na retina, AMPc poderia influenciar a regulação da transcrição de KLF4, por exemplo via ativação de CREB, visto que foram identificados potenciais sítios de ligação deste fator responsivo ao AMPc na região regulatória de KLF4 (dados não apresentados). Dados anteriores mostraram a indução rápida de fosforilação de CREB na camada neuroblástica em resposta ao tratamento com PACAP (Silveira *et al.*, 2002 e Njaine *et al.*, 2009 submetido a publicação).

Além da ação no controle da proliferação celular, KLF4 já foi descrito como essencial para o desenvolvimento final das células globosas no lúmen intestinal e a perda da expressão de KLF4 gera uma diminuição do número deste tipo celular. Por outro lado, KLF5 está presente em células proliferantes na base das criptas intestinais e tem efeito oposto ao do KLF4 no controle da homeostase intestinal (Katz *et al.*, 2005; Mcconnel *et al.*, 2007)

A ação de KLF4, KLF5 e KLF7 na diferenciação celular na retina necessita ser mais bem estudada. O presente trabalho demonstrou a presença de KLF4 em células ganglionares, amácrinas e em células da camada neuroblástica. Resultados preliminares do nosso grupo apontam que PACAP38 está envolvido com a diferenciação celular ao induzir o aumento dos níveis de Crx, fator de transcrição envolvido com a diferenciação final de fotorreceptores. Na retina, Lerner e colaboradores (2005) apresentaram o membro da família Sp/KLF, Sp4, como parceiro de Crx, na diferenciação de fotorreceptores. Portanto, sugerimos a possível participação dos fatores da família Sp/KLF no controle da diferenciação da retina e que PACAP38 possa ter KLF4, como um fator intrínseco mediador da transição entre proliferação e diferenciação.

Concluimos, por fim, que os resultados do presente estudo nos ajudam a compreender melhor os mecanismos envolvidos com a proliferação celular e nos apontam possíveis terapias para o controle de doenças proliferativas retinianas. Além do mais, descreve, pela primeira vez, a expressão de membros da família Sp/KLF e sugere a participação do fator de transcrição ,KLF4, no controle da proliferação celular na retina.

VI) CONCLUSÕES

A partir destes dados sugerimos que PACAP38 exerce ação antiproliferativa na retina de ratos neonatos da seguinte forma:

1. Os receptor, do peptídeo PACAP, PAC1, está presente em uma população de células proliferantes;

2. A ativação dos receptores PAC1 e VPACs por PACAP38 induz redução da proliferação celular neste tecido;

3. AMPc está envolvido com o efeito antimitogênico mediado por PACAP38;

4. PACAP38 reduz os níveis de ciclina D1 na retina neonatal de ratos com envolvimento da via de AMPc;

5. Os fatores de transcrição KLF4, KLF5 e KLF7 estão presentes na retina neonatal de ratos;

6. PACAP38 induz aumento dos níveis de KLF4 neste modelo;

7. KLF4 está presente em uma população de células proliferantes na retina neonatal;

8. A região regulatória no promotor do gene de ciclina D1 contém sítios sp1 para ligação dos fatores de transcrição Sp/KLF e KLF4 presente no núcleo de células da retina neonatal se liga aos motivos sp1 identificados no promotor de ciclina D1.

VII) BIBLIOGRAFIA

ADÃO-NOVAES, J., GUTERRES, C. C., DA SILVA, A.G., CAMPELLO-COSTA, P., LINDEN, R., SHOLL-FRANCO, A. Interleukin-4 blocks thapsigargin-induced cell death in rat photoreceptors:involvement of cAMP/PKA pathway. *J Neurosci Res.*87(9):2167-74, 2009.

ANCHAN, R.M., REH, T.A., ANGELLO, J., BALLIET, A., WALKER, M. EGF and TGF-alpha stimulate retinal neuroepithelial cell proliferation in vitro. *Neuron.* 6(6):923-36, 1991.

ANCHAN, R.M & REH, T.A. Transforming growth factor-beta-3 is mitogenic for rat retinal progenitor cells in vitro. *J Neurobiol.* 28(2):133-45, 1995.

ARIMURA, A., SOMOGYVÁRI-UIGH, MIYATA, A., MIZUNO, K., COY, D.H. & KITADA, C. Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology.* 129(5): 2787-2789, 1991.

BAGNOLI, P., DAL MONTE, M., CASINI, G. Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol.* 18(4):1219-42, 2003.

BARG, S., OLOFSSON, C.S., SCHRIEVER-ABELN, J., WENDT, A., GEBRE-MEDHIN, S., RENSTRÖM, E., RORSMAN, P. Delay between fusion pore

opening and peptide release from large dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *Neuron*.33(2):287-99, 2002.

BARTON, K.M & LEVINE, E.M. Expression patterns cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1 and phosphorylated histone H3 in the development. *Dev Dyn*. 237(3):672-82, 2008.

BLACK, A.R., BLACK, J.D., AZIZKHAN-CLIFFORD, J. *J CELL PHYSIOL*. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer.188(2):143-60, 2001.

BORBA, J.C., HENZE, I.P., SILVEIRA, M.S., KUBRUSLY, R.C., GARDINO, P.F., DE MELLO, M.C., HOKOÇ, J.N., DE MELLO, F.G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) can act as determinant of the tyrosine hydroxylase phenotype of dopaminergic cells during retina development. *Brain Res Dev Brain Res*.156(2):193-201, 2005.

BRAAS, K.M. & MAY, V. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides directly stimulate sympathetic neuron neuropeptide Y release through PAC1 receptor isoform activation of specific intracellular signaling pathways. *J. Biol. Chem*. 274(39):27702-27710, 1999.

BRINN, N & TERRELL, W. Selected enzyme histochemical techniques facilitated by the microwave oven. *J. Histotechnol.* 9: 231-237, 1986.

CAREY, R.G., LI, B., DICICCO-BLOOM, E. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide anti-mitogenic signaling in cerebral cortical progenitors is regulated by p57Kip2-dependent CDK2 activity. *J Neurosci.* 22(5):1583-91, 2002.

CARTHON, B.C., NEUMANN, C.A., DAS, M., PAWLYK, B., LI, T., GENG, Y., SICINSKI, P. Genetic replacement of cyclin D1 function in mouse development by cyclin D2. *Mol Cell Biol.* 25(3):1081-8, 2005.

CIEMERYCH, M.A., KENNEY, A.M., SICINSKA, E., KALASZCZYNSKA, I., BRONSON, R.T., ROWITCH, D.H., GARDNER, H., SICINSKI, P. Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev.* 16(24):3277-89, 2002.

CHATTERJEE, T.K., LIU, X., DAVISSON, R.L., FISHER, R.A. Genomic organization of the rat pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor gene. *J. Biol. Chem* 272(18): 12122-12131, 1997.

COOK, T., GEBELEIN, B., MESA, K., MLADEK, A., URRUTIA, R. Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J Biol Chem.* 273(40):25929-36, 1998.

CUNNINGHAM, J.J., LEVINE, EM., ZINDY, F., GOLOUBEVA, O., ROUSSEL, M.F., SMEYNE RJ. Mol Cell Neurosci. The cyclin-dependent kinase inhibitors p19(Ink4d) and p27(Kip1) are coexpressed in select retinal cells and act cooperatively to control cell cycle exit. 19(3):359-74, 2002.

D'AGATA, V. & CAVALLARO, S. Functional and molecular expression of PACAP/VIP receptors in the rat retina. Mol. Brain Res. 54:161-164, 1998.

DANG, D.T., PEVSNER, J., YANG, V.W. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. Int J Biochem Cell Biol. 32(11-12), 2000.

DAUTZENBERG, F.M., MEVENKAMP G, WILLE, S., HAUGER, R.L. J NEUROENDOCRINOL.. N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. J Neuroendocrinol. (12):941-9, 1999.

DICICCO-BLOOM, E., DEUTSCH, P.J., MALTZMAN, J., ZHANG, J., PINTAR, J.E., ZHENG, J., FRIEDMAN, W.F., ZHOU, X., ZAREMBA, T.. Autocrine expression and ontogenetic functions of the PACAP ligand/receptor system during sympathetic development. . 219(2):197-213, 2000.

DONOVAN, S.L & DYER, MA. Regulation of proliferation during central nervous system development. *Semin Cell Dev Biol.* 16(3):407-21, 2005.

DOWLING, J.E. Retinal cells and information processing. In: *The retina: an approachable part of the brain.* London, The Belknap Press of Harvard University Press, 1 ed., chap. 2, 1987.

DOVER, R & PATEL, K. Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochemistry* 102: 383-387, 1994.

DYER, M.A & CEPKO, C.L. p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development.* 127(16):3593-605, 2000.

DYER, M.A & CEPKO, C.L. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci.* 3(9):873-80, 2000.

DYER, M.A & CEPKO, C.L. p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J Neurosci.* 21(12):4259-71, 2001.

DYNAN, W.S. & TJIAN, R. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell*. 32(3):669-80, 1983.

DYNAN, W.S & TJIAN, R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*. 35(1):79-87, 1983.

EL MESKINI, R., CULOTTA, V.C., MAINS, R.E., EIPPER, B.A. Supplying copper to the cuproenzyme peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *J Biol Chem*. 278(14):12278-84, 2003.

FANTL, V., STAMP, G., ANDREWS, A., ROSEWELL, I., DICKSON, C. Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev*. 9(19):2364-72, 1995.

FAHRENKRUG, J & HANNIBAL, J. Neurotransmitters co-existing with VIP or PACAP. *Peptides*. 25(3):393-401, 2004.

FILA, T., TRAZZI, S., CROCHEMORE, C., BARTESAGHI, R., CIANI, E. Lot1 is a key element of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/cyclic AMP pathway that negatively regulates neuronal precursor proliferation. *J Biol Chem*. 284(22):15325-38, 2009.

FOSTER, K.W., FROST, A.R., MCKIE-BELL, P., LIN, C.Y., ENGLER, J.A., GRIZZLE, W.E., RUPPERT, J.M. Increase of GKLf messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res.* 60(22):6488-95, 2000.

FUKUMOTO, S., KOYAMA, H., HOSOI, M., YAMAKAWA, K., TANAKA, S., MORII, H., NISHIZAWA, Y. Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells: cGMP delays cell cycle transition through suppression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 activation. *Circ Res.* 2685(11):985-91,1999.

GALLINARI, P., DI MARCO, S., JONES, P., PALLAORO, M., STEINKÜHLER, C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res.*17(3):195-211, 2007.

GARCIA, C., PAEZ, P., DAVIO, C., SOTO, E.F., PASQUINI, J.M. Apotransferrin induces cAMP/CREB pathway and cell cycle exit in immature oligodendroglial cells. *J Neuros. Res.* 78 (3): 338-46.

GARRETT-SINHA, L.A., EBERSPAECHER, H., SELDIN, M.F., DE CROMBRUGGHE, B. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem.* 271(49):31384-90, 1996.

GENG, Y., YU, Q., SICINSKA, E., DAS, M., BRONSON, R.T., SICINSKI, P. Proc Natl Acad Sci U S A. Deletion of the p27Kip1 gene restores normal development in cyclin D1-deficient mice. 98(1):194-9, 2001.

GHATEI, M.A., TAKAHASHI, K., SUZUKI, Y., GARDINER, J., JONES, P.M. & BLOOM, S.R. Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. J. Endocrinol. 136:159-166, 1992.

GOURLET, P., VANDERMEERS-PIRET, M., RATHÉ, J., DE NEEF, P., CNUUDE, J., ROBBERECHT, P. & WAELBROECK, M. Vasoactive intestinal peptide modification at position 22 allows discrimination between receptor subtypes. Eur. J. Pharmacol. 348: 95-99, 1998.

HAGEN, G., MÜLLER, S., BEATO, M., SUSKE, G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. Nucleic Acids Res. 20(21):5519-25, 1992.

HAMMERSCHMIDT, M., BITGOOD, M.J & MCMAHON, A.P. Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo Genes Dev. 10(6):647-58, 1996.

HARADAHARMAR, A.J., ARIMURA, A., GOZES, I., JOURNOT, L., LABURTHE, M., PISEGNA, J.R., RAWLINGS, S.R., ROBBERECHT, P., SAID, S.I., HASHIMOTO, H., KUNUGI, A., ARAKAWA, N., SHINTANI, N., FUJITA, T., KASAI, A., KAWAGUCHI, C., MORITA, Y., HIROSE, M., SAKAI, Y., BABA, A. Possible involvement of a cyclic AMP-dependent mechanism in PACAP-induced proliferation and ERK activation in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 311(2):337-43, 2003.

HARMAR, A.J., ARIMURA, A., GOZES, I., JOURNOT, L., LABURTHE, M., PISEGNA, J.R., RAWLINGS, S.R., ROBBERECHT, P., SAID, S.I., SREEDHARAN, S.P., WANK, S.A., WASCHEK, J.A. International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of Receptors for Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50(2): 265-270, 1998.

HATAKEYAMA, J., TOMITA, K., INOUE, T., KAGEYAMA, R. Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development.* 128(8):1313-22, 2001.

HÖKFELT, T., BROBERGER, C., XU, Z.Q., SERGEYEV, V., UBINK, R., DIEZ, M. Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology.* 39(8):1337-56, 2000.

HOCHBAUM, D., HONG, K., BARILA, G., RIBEIRO-NETO, F., ALTSCHULER, D.L. Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis. *J Biol Chem.* 283(8):4464-8, 2008.

INAGAKI, N., YOSHIDA, H., MIZUTA, M., MIZUNO, N., FUJII, Y., GONOI, T., MIYAZAKI, J. & SEINO, S. Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2679-2683, 1994.

ISAYAMA, T., MCLAUGHLIN, P.J, ZAGON, I.S. Endogenous opioids regulate cell proliferation in the retina of developing rat. *Brain Res.* 544(1):79-85, 1991.

IZUMI, S., SEKI, T., SHIODA, S., ZHOU, C.J., ARIMURA, A., KOIDE, R. Ultrastructural localization of PACAP immunoreactivity in the rat retina. *Ann N Y Acad Sci.* 921:317-20, 2000.

JENKINS, T.D., OPITZ, O.G., OKANO, J., RUSTGI, A.K. Transactivation of the human keratin 4 and Epstein-Barr virus ED-L2 promoters by gut-enriched Krüppel-like factor. *J Biol Chem.* 273(17):10747-54, 1998.

JENSEN, A & WALLACE, V. Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development.* 124(2):363-71, 1997.

JIANG, J., CHAN, Y.S., LOH, Y.H., CAI, J., TONG, G.Q., LIM, C.A., ROBSON, P., ZHONG, S., NG, H.H. A core KLF circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 10(3):353-60, 2008.

KACZYNSKI, J., COOK, T., URRUTIA, R. Sp1-and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biol.*4(2):206, 2003.

KADONAGA, J.T., CARNER, K.R., MASIARZ, F.R., TJIAN, R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.*51(6):1079-9, 1987.

KATZ, J.P., PERREAULT, N., GOLDSTEIN, B.G., ACTMAN, L., MCNALLY, S.R., SILBERG, D.G., FURTH, E.E., KAESTNER, K.H. Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach. *Gastroenterology.* 128(4):935-45, 2005.

KINGSLEY, C & WINOTO, A. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol.*12(10):4251-61, 1992.

KIERMAYER, S., BIONDI, R.M., IMIG, J., PLOTZ, G., HAUPENTHAL, J., ZEUZEM, S., PIIPER, A. Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Mol Biol Cell*.16(12):5639-48, 2005.

KOZAR, K., CIEMERYCH, M.A., REBEL, V.I., SHIGEMATSU, H., ZAGOZDZON, A., SICINSKA, E., GENG, Y., YU, Q., BHATTACHARYA, S., BRONSON, R.T., AKASHI, K., SICINSKI, P. Mouse development and cell proliferation in absence of D-cyclins. *Cell*. 118 (4):477-91, 2004.

KUNISATO, A., WAKATSUKI, M., KODAMA, Y., SHINBA, H., ISHIDA, I., NAGAO, K. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells*. 2009. Epub ahead of print.

KUBRUSLY, R.C., DA CUNHA, M.C., REIS, R.A., SOARES, H., VENTURA, A.L., KURTENBACH, E., DE MELLO, M.C., DE MELLO, F.G. Expression of functional receptors and transmitter enzymes in cultured Muller cells. *Brain Res*. 21;1038(2):141-9, 2005.

LAUB, F., ALDABE, R., FRIEDRICH, V. J.R., OHNISHI, S., YOSHIDA, T., RAMIREZ, F. Developmental expression of mouse Kruppel-like transcription factor KLF7 suggests a potential role in neurogenesis. *Dev Biol*. May 15;233(2):305-18, 2001.

LEE, M., LELIEVRE, V., ZHAO, P., TORRES, M., RODRIGUEZ, W., BYUN, J.Y., DOSHI, S., IOFFE, Y., GUPTA, G., DE LOS MONTEROS, A.E., DE VELLIS, J., WASCHEK, J. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide stimulates DNA synthesis but delays maturation of oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci.* 21(11):3849-59, 2001.

LELIEVRE, V., SEKSENYAN, A., NOBUTA, H., YONG, W.H., CHHITH, S., NIEWIADOMSKI, P., COHEN, J.R., DONG, H., FLORES, A., LIAU, L.M., KORNBLUM, H.I., SCOTT, M.P., WASCHEK, J.A. Disruption of the PACAP gene promotes medulloblastoma in *ptc* mutant mice. *Dev Biol.* 313(1):359-7, 2008.

LEVINE, E.M & GREEN, E.S. Cell-intrinsic regulators of proliferation in vertebrate retinal progenitors. *Semin Cell Dev Biol.* 15(1):63-74, 2004.

LERNER, L.E., PENG, G.H., GRIBANOVA, Y.E., CHEN, S., FARBER, D.B. Sp4 is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes and synergizes with Crx. *Development.* 132(21):20642-50, 2005.

LILLIEN, L & CEPKO, C. Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha. *Development.* 115(1):253-66, 1992.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75, 1951.

LU, N. & DICICCO-BLOOM, E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:3357-3362,1997.

LU, N., ZHOU, R., DICICCO-BLOOM, E. Opposing mitogenic regulation by PACAP in sympathetic and cerebral cortical precursors correlates with differential expression of PACAP receptor (PAC1-R) isoforms. *J Neurosci Res.* 53(6):651-62, 1998.

MARQUARDT, T. & GRUSS, P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci.* 25(1):32-8, 2002.

MARTINS, R.A., SILVEIRA, M.S., CURADO, M.R., POLICE, A.I., LINDEN, R. NMDA receptor activation modulates programmed cell death during early post-natal retinal development: a BDNF-dependent mechanism. *J Neurochem.* 95(1):244-53, 2005.

MARTINS, R.A., LINDEN, R & DYER, M.A. Glutamate regulates retinal progenitors cells proliferation during development. *Eur J Neurosci.* 24(4):969-80, 2006.

MARTINS, R.A., PEARSON, R.A. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* 4;1192:37-60, 2008.

MASLAND, R.H. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci.* 4(9):877-86, 2001.

MERCER, A., RONNHOLM, H., HOLMBERG, J., LUNDH, H., HEIDRICH, J., ZACHRISSON, O., OSSOINAK, A., FRISEN, J., PATRONE, C. PACAP promotes neural stem cell proliferation in adult mouse brain. *J Neurosci Res.*76(2):205-15, 2004.

MCCONNELL, B.B., GHALEB, A.M., NANDAN, M.O., YANG, V.W. The diverse functions of Kruppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays.* 29(9):946, 2007.

MCCULLOCH, D.A., LUTZ, E.M., JOHNSON, M.S., MACKENZIE, C.J., MITCHELL, R. Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors. *Ann N Y Acad Sci.*921:175-85, 2000.

MIYATA, A., ARIMURA, A., DAHL, R.R., MINAMINO, N., UEHARA, A., JIANG, L., CULLER, M.D. & COY, D.H. Isolation of a novel 38-residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:567-574, 1989.

MIYATA, A., JIANG, L., DAHL, R.R., KITADA, C., KUBO, K., FUJINO, M., MINAMINO, N. & ARIMURA, A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:643-648, 1990.

MOROO, I., TATSUNO, I., UCHIDA, D., TANAKA, T., SAITO, J., SAITO, Y., HIRAI, A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* 795(1-2):191-6, 1998.

NAGAHAMA, H., HATAKEYAMA, S., NAKAYAMA, K., NAGATA, M., TOMITA, K., NAKAYAMA, K. Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 during mouse development. *Anat Embryol.* 203(2):77-87, 2001.

NICOT, A & DICICCO-BLOOM, E. Regulation of neuroblast mitosis is determined by PACAP receptor isoform expression. *Proc Natl Acad Sci.* 98(8):4758-63, 2001.

NICOT, A., LELIEVRE, V., TAM, J., WASCHEK, J.A., DICICCO-BLOOM, E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and sonic hedgehog interact to

control cerebellar granule precursor cell proliferation. *J Neurosci.* 1;22(21):9244-54, 2002.

NJAINE, B. Tese de Mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2005.

NOVEEN, A., JIANG, T.X & CHUONG, C.M. cAMP, an activator of protein kinase A, suppresses the expression of sonic hedgehog. *Biochem Biophys Res Commun.* 219(1):180-5, 1996.

OLIANAS, M.C., INGIANNI, A., SOGOS, V. & ONALI, P. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors and PACAP in human retina. *J. Neurochem.* 69:1213-1218, 1997.

ONALI, P. & OLIANAS, M.C. PACAP is a potent and highly effective stimulator of adenylyl cyclase activity in the retinas of different mammalian species. *Brain Res.* 641:132-134, 1994.

PANTALONI, C., BRABET, P., BILANGES, B., DUMUIS, A., HOUSSAMI, S., SPENGLER, D., BOCKAERT, J. & JOURNOT, L. Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP27 and PACAP38 in phospholipase C activation. *J. Biol. Chem.* 271(36):22146-2215, 1996.

PAPAPETROU, E.P., TOMISHIMA, M.J., CHAMBERS, S.M., MICA, Y., REED, E., MENON, J., TABAR, V., MO, Q., STUDER, L., SADELAIN, M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci.* 2009.

PEI, X.H. & XIONG, Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene.* 24(17):2787-95, 2005.

PHILIPSEN, S & SUSKE, G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/KLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 27(15):2991-3000, 1999.

POGORILER, J., MILLEN, K., UTSET, M., DU, W. Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation.. *Development.*133(19):3929-37, 2006.

PRIGGE, S.T., MAINS, R.E., EIPPER, B.A., AMZEL, L.M. New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell Mol Life Sci.* 57(8-9):1236-59, 2000.

QIN, D., LI, W., ZHANG, J., PEI, D. Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4. *Cell Res.*17(11):959-62, 2007.

RAO, S., GRAY-BABLIN, J., HERLICZEK, T.W., KEYOMARSI, K. The biphasic induction of p21 and p27 in breast cancer cells by modulators of cAMP is posttranscriptionally regulated and independent of the PKA pathway. *Exp Cell Res.* 10;252(1):211-23,1999.

REHEN, S.K., VARELLA, M.H., FREITAS, F.G., MORAES, M.O., LINDEN, R. Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cyclic AMP on apoptosis in the developing retina. *Development.* 122(5):1439-48, 1996.

ROCHA, A.S., PATERNOT, S., COULONVAL, K., DUMONT, JE., SOARES, P., ROGER, P.P. Cyclin AMP inhibits the proliferation of thyroid carcinoma cell lines through regulation of CDK4 phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 19(11):4814-25, 2008.

ROGERS, S., WELLS, R., RECHSTEINER, M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 234(4774):364-8, 1986.

ROWLAND, B.D., BERNARDS, R., PEEPER, D.S. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol.* (11):1074-82, 2005.

ROWLAND, B.D & PEEPER, D.S. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6(1):11-23, 2006.

SCHARF, E., MAY, V., BRAAS, K.M., SHUTZ, K.C., MAO-DRAAYER, Y. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate murine neural progenitor cell survival, proliferation, and differentiation. *J Mol Neurosci.* 36(1-3):79-88, 2008.

SEGRE, J.A., BAUER, C., FUCHS, E. KLF4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat.Genet.* 22(4): 356-60, 1999.

SEKI, T., SHIODA, S., OGINO, D., NAKAI, Y., ARIMURA, A. & KOIDE, R. Distribution and ultrastructural localization of a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its mRNA in the rat retina. *Neurosci. Lett.* 238: 127-130, 1997.

SEKI, T., SHIODA, S., NAKAI, Y., ARIMURA, A. & KOIDE, R. Distribution and ultrastructural localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat retina. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865: 408-411, 1998.

SEKI, T., SHIODA, S., IZUMI, S., ARIMURA, A., KOIDE, R. Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina. *Peptides.* 21(1):109-13, 2000.

SEKI, T., IZUMI, S., SHIODA S, ZHOU CJ, ARIMURA A, KOIDE R. Gene expression for PACAP receptor mRNA in the rat retina by in situ hybridization and in situ RT-PCR. *Ann N Y Acad Sci.* 921:366-9, 2000.

SHARMA, K.R & EHINGER, B. Mitosis in developing rabbit retina: An immunohistochemical study. *Exp. Eye Res.* 64: 97-106, 1997.

SHERWOOD, N.M., KRUECKL, S.L., MCRORY, J.E. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr Rev.* 21(6):619-70, 2000.

SHI, G.X., REHMANN, H., ANDRES, D.A. A novel cyclic AMP-dependent Epac-Rit signaling pathway contributes to PACAP38-mediated neuronal differentiation. *Mol Cell Biol.*26(23):9136-47, 2006.

SHIE, J.L., CHEN, Z.Y., FU, M., PESTELL, R.G., TSENG, C.C. Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res.* 28(15):2969-76, 2000.

SHIE, J.L., CHEN, Z.Y., O'BRIEN, M.J., PESTELL, R.G., LEE, M.E., TSENG, C.C. Role of gut-enriched Krüppel-like factor in colonic cell growth and differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(4):G806-14, 2000.

SHIELDS, J.M., CHRISTY, R.J., YANG, V.W. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem.* 16;271(33):20009-17, 1996.

SHIELDS, J.M & YANG, V. Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Krüppel-like factor define a subfamily of closely related Krüppel proteins. *J Biol Chem.* 272(29):18504-7, 1997.

SHIELDS, J.M & YANG, V.W. Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched Krüppel-like factor. *Nucleic Acids Res.* 26(3):796-802, 1998.

SILVEIRA, M.S., COSTA, M.R., BOZZA, M, LINDEN, R. Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 277(18):16075-80, 2002.

SPENGLER, D., WAEBER, C., PANTALONI, C., HOLSBER, F., BOCKAERT, J., SEEBURG, P.H. & JOURNOT, L. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature.* 356:170-175, 1993.

SREEDHARAN, S.D., PATEL, D.R., MENGHANG, X., ICHIKAWA, S., GOETZL, E.J. Human vasoactive intestinal peptide 1 receptors expressed by stable

transfectants couple to two distinct signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203(1):141-148, 1994.

SUH, J., LU, N., NICOT, A., TATSUNO, I., DICICCO-BLOOM, E. PACAP is a anti-mitogenic signal in developing cerebral cortex. *Nature Neurosci.* 4(2): 1-2, 2001.

SUSKE, G. The Sp-family of transcription factors. *Gene.* 238(2):291-300, 1999.

STER, J., DE BOCK, F., BERTASO, F., ABITBOL, K., DANIEL, H., BOCKAERT, J., FAGNI, L. Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. *J Physiol.*587(Pt 1):101-13, 2009.

TAKAHASHI, K & YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast. *Cell.* 25;126(4):663-76, 2006.

TONG, W & POLLARD, J.W. Genetic evidence for the interactions of cyclin D1 and p27KIP1. *Mol. Cell. Biol.* 21(4):1319-28.

YOON, H.S., CHEN, X., YANG, V.W. Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 278(4):2101-5, 2003.

YOON, H.S & YANG, V.W. Requirement of Krüppel-like factor 4 in preventing entry into mitosis following DNA damage. *J Biol Chem.* 279(6):5035-41, 2004.

WANG, Y., DAKUBO, G.D., THURIG, S., MAZEROLLE, C.J., WALLACE, V.A. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development.* 132(22):5103-13, 2005.

WASCHEK, J.A., DICICCO-BLOOM, E., NICOT, A., LELIEVRE, V. Hedgehog signaling: new targets for GPCRs coupled to cAMP and protein kinase A. *Ann N Y Acad Sci.* 1070:120-8, 2006.

WATANABE, J., NAKAMACHI, T., MATSUNO, R., HAYASHI, D., NAKAMURA, M., KIKUYAMA, S., NAKAJO, S., SHIODA, S. Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides.* 28(9):1713-1719, 2007.

.

WEI, D., GONG, W., KANAI, M., SCHLUNK, C., WANG, L., YAO, J.C., WU, T.T., HUANG, S., XIE, K. Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res.* 65(7):2746-54, 2005.

WEI, D., KANAI, M., HUANG, S., XIE, K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*. 27(1):23-31, 2006.

VAN OIRSCHOT, B.A., STAHL, M., LENS, S.M., MEDEMA, R.H. Protein kinase A regulates expression of p27(kip1) and cyclin D3 to suppress proliferation of leukemic T cell lines. *J Biol Chem*. 276(36):33854-60, 2001.

VARELLA MH, CORREA DF, CAMPOS CB, CHIARINI LB, LINDEN R. Protein Kinases selectively modulate apoptosis in the developing retina in vitro. *Neurochem Int*. (2):217-27, 1997.

VARELLA, M.H., DE MELLO, F.G & LINDEN R. Evidence for antiapoptotic role of dopamine in developing retinal tissue. *J Neurochem*. 73(2):485-92, 1999.

VAUDRY, D., GONZALEZ, B.J., BASILLE, M., YON, L., FOURNIER, A. & VAUDRY, H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to function. *Pharmacol. Rev*. 52(2): 269-324, 2000.

VERTONGEN, P., CAMBY, I., DARRO, F., KISS, R., ROBBERECHT, P. VIP and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) have an antiproliferative effect on the T98G human glioblastoma cell line through interaction with VIP2 receptor *Neuropeptides*. 30(5):491-6, 1996.

ZHANG, W., GEIMAN, DE., SHIELDS, J.M., DANG, D.T., MAHATAN, C.S., KAESTNER, K.H., BIGGS, J.R., KRAFT, A.S., YANG, V.W. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem.*275(24):18391-8,2000.

ZHAO, W., HISAMUDDIN, I.M., NANDAN, M.O., BABBIN, B.A., LAMB, N.E., YANG, V.W. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene.* 23(2):395-402, 2004.

ZHOU, C.J., SHIODA, S., YADA, T., INAGAKI, N., PLEASURE, S.J., KIKUYAMA, S. PACAP and its receptors exert pleiotropic effects in the nervous system by activating multiple signaling pathways. *Curr Protein Pept Sci.* 3(4):423-39, 2002.

ZHU, S., TAI, C., MACVICAR, B.A., JIA, W., CYNADER, M.S. Glutamatergic stimulation triggers rapid Kruppel-like factor 4 expression in neurons and the overexpression of KLF4 sensitizes neurons to NMDA-induced caspase 3 activity. *Brain Res.*1250:49-62, 2009

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](#)