

GUILHERME RAPOZEIRO FRANÇA

**Participação de IGF-I na proliferação celular
induzida por ATP de progenitores da retina de
galinha em cultura**

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

Orientadora: Ana Lúcia Marques Ventura



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

GUILHERME RAPOZEIRO FRANÇA

**Participação de IGF-I na proliferação celular
induzida por ATP de progenitores na retina de
galinha em cultura**

UFRJ

2010

S França, Guilherme Rapozeiro

Participação de IGF-I na proliferação celular induzida por ATP de progenitores na retina de galinha em cultura / Guilherme Rapozeiro França. Rio de Janeiro. 2010. xxi, 116 f.: II.

Tese (Doutorado em Ciências - Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), 2010.

Orientador: Ana Lúcia Marques Ventura

1. Retina. 2. Proliferação. 3. ATP. 4. IGF-I – Teses.
I. Ventura, Ana Lúcia Marques (Orient.). II. – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), 2010. III. Título.

CDD:

Trabalho desenvolvido no laboratório de Neuroquímica, departamento de Neurobiologia, instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, sob a orientação da Dra. Ana Lúcia Marques Ventura. Financiado por: CNPq, FAPERJ, PRONEX, CAPES.

GUILHERME RAPOZEIRO FRANÇA

**Participação de IGF-I na proliferação celular
induzida por ATP de progenitores na retina de
galinha em cultura**

Rio de Janeiro, 09/03/2010

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Ana Lúcia Marques Ventura – Orientadora, UFF

Dr. Roberto Paes de Carvalho, UFF

Dra. Patrícia Franca Gardino, UFRJ

Dr. Ricardo Augusto de Melo Reis, UFRJ

Dra. Elizabeth Giestal de Araújo – Revisora, UFF

Dr. Alfred Sholl Franco – Suplente Interno, UFRJ

Dra. Karin da Costa Calaza – Suplente Externo, UFF

Dedico esta tese aos que vieram antes de mim.

Agradecimentos

Chegou o grande momento, o momento de agradecer. E em relação a isso, eu não tenho a menor dificuldade.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe Neide, aos meus avós Haraldo e Lucy, e principalmente aos meus irmãos Gustavo e Glauber. Vocês sempre me apoiaram, sempre acreditaram em mim. Muito mais do que simplesmente irmãos, somos amigos, companheiros de estrada, confidentes. A nossa amizade hoje é maior do que ontem. Como é importante pra mim a existência de vocês, às vezes me pergunto o que seria de mim sem vocês? Eu amo vocês!

Amigos + ciência + cervejas estranhas + pimenta, quero dizer, muita pimenta = momentos inesquecíveis... Aos amigos Pablo, Aninha, Erick e Isis. Vivemos grandes momentos juntos, é ou não é?! Caímos no mundo, fomos parar nos Estados Unidos, conhecemos a terra do tio Sam juntos (rs). Do Smithsonian ao Guggenheim, do Subway ao Epic burger, do Central Park à Madureira (rs), desenrolamos o inglês, descobrimos o peso das neurociências, evoluímos como seres humanos... Então digam aí, quantas pessoas tem a sorte de ir a um congresso internacional com os amigos? Não tem nada que pague este momento que vivemos, isso vai ficar pra sempre em nossas vidas! Entendam que para mim vocês são seres humanos maravilhosos que deixaram suas marcas em minha alma e o significado disso não pode ser expresso por palavras.

Ao amigo Paulo Emílio. Cara, eu queria ter lhe conhecido antes. Você é uma pessoa muito especial. Amigo de verdade. Tem o dom de convencer qualquer um a fazer as coisas mais absurdas, e porque não, interessantes (rsrs). Paulo, existe um líder dentro de você. Governe-o, faça-o falar!

À minha orientadora Ana. Obrigado por permanecer ao meu lado, acreditar em mim, confiar no meu trabalho. Obrigado pelas discussões científicas, pelo brilho nos olhos quando os resultados apareciam, por me encorajar nos momentos em que me sentia pequenino demais. Obrigado por me mostrar meus defeitos, isso me fez amadurecer muito. Sei que nos últimos dias desta jornada deixei você de cabelo em pé, espero que tenha valido a pena, para mim valeu cada segundo.

Ao professor Fernando Garcia de Mello pela oportunidade em realizar o doutorado e pelos conselhos acerca deste trabalho.

Aos professores do departamento de neurobiologia, em especial à Paulinha e Priscilla. Obrigado pelo incentivo e credibilidade dedicados a mim, vocês são um ESPETÁCULO!

Ao professor Cláudio Serfaty, pela amizade e senso de humor sagaz. Acabamos descobrindo algo em comum, o gosto pela arte de fotografar! Um grande abraço ao nosso “leader”.

À professora Elizabeth! Como agradecer a você, Beth. Acho que é impossível. Se hoje esta defesa está acontecendo, é devido à sua determinação como revisora. Não só como revisora, mas como conselheira científica. Foi graças às nossas discussões sobre os efeitos do IGF na retina que grande parte desta tese foi feita. E para finalizar com chave de ouro, em um momento em que tinha a nítida impressão de que o mundo virara as costas pra mim, você me estendeu a sua mão! Obrigado.

Ao professor Fabio, pela amizade, conselhos, apoio e compreensão durante minha jornada em Nova Friburgo. Fabão, você é um ser iluminado, o nosso querido holy blessed man! Eu tive muita sorte em tê-lo conhecido.

Aos amigos que passaram e aos que ainda estão no lab. de neuroquímica, Beto, Haline, Joyce, Laura, Liana, Paty, Rhalene e Thayane. A amizade de vocês transformou nosso ambiente de trabalho em minha segunda morada.

Ao grande amigo Rodrigo, pelas conversas sobre ciência, política, religião, comportamento humano e animal, e tudo mais. E aí cara, existe ou não um Deus, ou deuses? Somos seres livres para decidir nosso caminho, ou de alguma forma somos influenciados, mesmo de forma inconsciente, a tomar nossas próprias decisões? Existe amor incondicional, ou a própria palavra já determina uma condição? Nossa amizade foi construída na dúvida e não na certeza. Dizem por aí que a certeza é o escudo dos covardes e a fé a espada dos cegos... Então eu pergunto: e aí cara, o que você acha disso?

Às minhas alunas de iniciação científica Tatiana, Karina e Mariana. Meninas, sem vocês, uma boa parte desta tese não teria saído. Obrigado pela confiança e dedicação. Saibam que pra mim foi muito gratificante ter trabalhado com vocês.

À amiga Roxana por sua sinceridade e conselhos em momentos difíceis de minha vida, obrigado por colocar os meus pés no chão, quando a minha mente queria voar.

Ao grande amor de minha vida, Ivana. Amor, essa vida de doutorando nos levou à beira da loucura, não é? Obrigado por suportar minhas manias, minhas paranóias, minha ansiedade, minha dificuldade de encontrar a carteira todos os dias... Obrigado pelos momentos apolíneos e dionisíacos (rs). Obrigado por ser quem você é! Obrigado por acreditar em mim, pelo apoio nos momentos em que pensei que não iria suportar, nos momentos em que o ar parecia não preencher os meus pulmões. Companheira de conversas intermináveis sobre o mundo e as coisas, foi este olhar desinteressado e sem preconceitos sobre a realidade, que nos permitiu contemplar a complexidade do

universo, que nos permitiu deixar a mente livre de convenções, que nos permitiu alimentar a alma. Amo você!

Em que medida a verdade é suscetível de materialização? – essa é a questão, este é o experimento.

Nietzsche

RESUMO

Por muito tempo, o ATP foi considerado apenas como uma molécula capaz de fornecer energia química para reações metabólicas nas células. Entretanto, receptores para nucleotídeos vêm sendo demonstrados em vários sistemas biológicos, como, por exemplo, a retina. Em trabalhos anteriores, nosso grupo observou que, pelo menos um dos receptores purinérgicos envolvidos na proliferação celular na retina de galinha em desenvolvimento é o receptor P2Y₁. Quando ativado, este receptor dispara, de forma independente, pelo menos duas vias de transdução de sinal que levam ao aumento na incorporação de [³H]-timidina. Uma delas é a ativação sequencial da PLC, PKC e MAPK e a outra é a ativação da PI3K/AKT. Os resultados apresentados aqui mostram que o antagonista do receptor de IGF-I/Insulina, IOME AG-538, inibe completamente a proliferação celular induzida por ATP ou ADP. A ativação de receptores P2Y por ATP promove um aumento de ~2.1 x na forma fosforilada do receptor de IGF-I/Insulina, de ~6.3 x na fosforilação da ERK e de ~2.0 x na fosforilação da AKT. Estes efeitos foram inibidos por IOME AG-538. Recentemente, nós demonstramos que a proliferação celular induzida por ATP ocorre de forma concomitante com a dessensibilização da formação de [³H]-fosfoinosítídeos induzida por receptores P2. Neste trabalho, nós mostramos que o tratamento das culturas de retina com os inibidores de endocitose mediada por clatrina monodansil-cadaverina e clorpromazina bloqueou completamente tanto a proliferação celular induzida por ATP quanto a fosforilação de receptores para IGF-I/Insulina, do IRS-I, da ERK e da AKT, sugerindo que a transativação de receptores IGF-I/Insulina por receptores P2 seja uma etapa necessária para a indução de proliferação celular mediada por ATP. A relação entre receptores tirosina cinase para IGF-I/In e a proliferação em culturas de células de retina foi observada somente em fases precoces do desenvolvimento de culturas de retina, uma vez que em culturas mais diferenciadas submetidas à lesão mecânica, nenhum efeito do antagonista de IGF-I foi observado na proliferação e crescimento celular induzido por ATP, sugerindo que a transativação de receptores para IGF-I/In por receptores P2 ocorra apenas em progenitores gliais em desenvolvimento precoce, mas não em células gliais mais diferenciadas.

ABSTRACT

For a long time, ATP was considered only as a molecule capable of providing chemical energy for cell metabolic reactions. However, receptors for nucleotides have been demonstrated in various biological systems, for example, the retina. In previous work, our group observed that at least one of the purinergic receptors involved on chick retinal cell proliferation is the P2Y₁ receptor. When activated, this receptor triggers independently at least two pathways leading to increased incorporation of [³H]-thymidine. One of them is the sequential activation of PLC, PKC and MAPK and the other is PI3K/AKT pathway. The results presented here show that the antagonist of the IGF-I/Insulin receptor, IOME AG-538, completely inhibits cell proliferation induced by ATP or ADP. The activation of P2Y receptors by ATP increase phosphorylated IGF-I/Insulin receptor by ~ 2.1 x, the phosphorylation of ERK by ~ 6.3 x and of AKT by ~ 2.0 x. These effects were inhibited by IOME AG-538. Recently, we have shown that cell proliferation induced by ATP occurs concomitantly with the desensitization of the formation of [³H]-phosphoinositides induced by P2 receptors. Here, we show that the treatment of retinal cultures with the inhibitors of clathrin-mediated endocytosis, monodancyl-cadaverine and chlorpromazine, blocked both cell proliferation induced by ATP as well as the phosphorylation of IGF-I/Insulin receptor, IRS-I, ERK and AKT, suggesting that trans-activation of IGF-I/Insulin receptors by P2 receptors is a necessary step for cell proliferation induced by ATP. The relationship between IGF-I/Insulin tyrosine kinase receptors and proliferation in cultured retinal cells was observed only during early phases of the developing retinal cultures, since in more differentiated cultures submitted to mechanical injury, no effect of the IGF-I antagonist was observed in ATP-mediated cell proliferation and growth, suggesting that trans-activation of IGF-I/Insulin receptors by P2Y receptors occurs only in early developing glial progenitors, but not in more differentiated glial cells.

Abreviaturas

- AMPC - 3`5`-adenosina monofosfato cíclico
- AP-2 – complexo adaptador da membrana plasmática
- ATP – adenosina trifosfato
- ADP – adenosina bifosfato
- UTP – Uridina trifosfato
- UDP – Uridina difosfato
- BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro
- BrdU – bromodeoxiuridina
- BSA - albumina de soro bovino
- CaMK - proteína cinase dependente de Ca^{2+} / calmodulina
- CHO – célula de ovário de hamster chinês
- CMF - solução salina sem cálcio e magnésio
- CNI - camada nuclear interna
- CNE - camada nuclear externa
- CFTR - condutância transmembrana da fibrose cística
- CPE- camada plexiforme externa
- CPI – camada plexiforme interna
- CPZ - clorpromazina
- DAG - diacilglicerol
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- E2 - segundo dia embrionário
- EGF – Fator de crescimento epidermal
- EP - epitélio pigmentado
- ERK – Cinase reguladas por sinais extracelulares
- Fase S – síntese de DNA da interfase
- SFB - soro fetal bovino
- FGF – fator de crescimento de fibroblastos
- FGFb - fator de crescimento de fibroblasto básico
- GABA – ácido gama amino butírico
- G1 - Fase da interfase; primeiro intervalo, após a mitose
- G2 – Fase da interfase; segundo intervalo, antes da próxima mitose
- Grb2 – Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento

GRK – cinase do receptor acoplado a proteína G
IGF-I – fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IGF-II -fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2
IGFR-I – receptor para IGF do tipo 1
IP₃ – Inositol trifosfato
IRS - substrato responsivo à insulina
MAPK - proteína cinase ativadora de mitose
MDC – monodancil-cadaverina
MEK – Cinase ativadora da MAP cinase
NGF - fator de crescimento do nervo
PACAP - polipeptídeo ativador de adenilil ciclase produzido pela pituitária
PC12 – linhagem de células derivadas de feocromocitoma da medula adrenal de rato
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K – cinase do fosfatidilinositol na posição 3
PIP2 - fosfatidilinositol bi-fosfato
PKA - proteína cinase A
PKB - proteína cinase B
PKC - proteína cinase C
PLD-2 – fosfolipase D2
PPADS - Piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato
Pyk2 – tirosina cinase rica em prolina 2
Raf – cinase que ativa a MEK
Rap-1 – proteína ativadora de repressão
Ras – proteína de um sarcoma de rato
RB-2 – Reactive Blue - 2
RBL-2H3 – células leucêmicas basofílicas de rato
RE - retículo endoplasmático
RGC – células ganglionares da retina
RPTG – receptor acoplado a proteína G
Sh2 – domínio de homologia src
Shc - proteína semelhante ao colágeno com homologia src
SN - sistema nervoso
SNC - sistema nervoso central
SOS – “son of sevenless”

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

TCA - ácido tricloroacético

Trk – cinase relacionada a tropomiosina

ZV – zona ventricular

Lista de figuras e tabelas

Fig. 1	A) Representação esquemática da retina, mostrando suas diferentes camadas e tipos celulares. B) Curso temporal da neurogênese na retina embrionária de pinto.....	02
Fig. 2	Famílias de receptores purinérgicos P2.....	08
Tab.I	Principais agonistas, antagonistas e vias de transdução de sinal para receptores P2Y.....	10
Fig. 3	Mecanismos moleculares envolvidos na dessensibilização e internalização de RPTG dependente de GRKs e β -arrestina.....	12
Fig. 4	Diagrama esquemático ilustrando as possíveis ações do ATP identificadas até o momento.....	16
Fig. 5	Ativação da Pi3K/PKB mediada por receptores P2Y ₁₂	23
Tab. II	Modulação da expressão de receptores P2Y durante lesão no sistema nervoso central.....	29
Fig. 6	Efeito de inibidores de tirosina cinases sobre a proliferação celular induzida por ADP e sobre a viabilidade celular.....	39
Fig. 7	Efeito de IGF-I sobre a proliferação celular induzida por ADP na presença e ausência de soro fetal bovino.....	41
Fig. 8	Efeito de IGF-I sobre a fosforilação do receptor para IGF-I/Insulina, IRS-1, ERK e AKT.....	43
Fig. 9	Efeito de ATP sobre a fosforilação do receptor para IGF-I, ERK e AKT.....	45
Fig. 10	Efeito de ADP sobre a fosforilação da ERK e AKT durante intervalos de tempo crescentes.....	47

Fig. 11	Efeito de IOME AG-538 sobre a fosforilação do receptor para IGF-I, ERK e AKT induzida por ADP.....	49
Fig. 12	Efeito de concentrações crescentes de IOME AG-538 sobre o acúmulo de [³ H]-fosfoinosítídeos induzido por ADP.....	51
Fig. 13	Efeito de inibidores da Src sobre a proliferação celular induzida por ADP.	
Fig. 14	Efeito de concentrações crescentes de MDC e CPZ sobre a incorporação de [³ H]-timidina (A e C) induzida por ADP 500 μM e sobre a viabilidade celular (B e D).	
Fig. 15	Efeito de MDC sobre o acúmulo de [³ H]-fosfoinosítídeos induzido por ADP em culturas de células de retina em E7.	
Fig. 16	Efeito de MDC e CPZ sobre a fosforilação da AKT e da ERK induzida por ADP.	
Fig. 17	Efeito de MDC sobre a fosforilação do receptor de IGF-1/In e do fator responsivo à insulina (IRS-1) induzida por ADP.	
Fig. 18	Efeito de MDC sobre a fosforilação do receptor de IGF-I/In, da AKT e da ERK induzida por IGF-I.	
Fig. 19	Cinética de recobrimento da área livre de células após lesão da monocamada em cultura de retina com diferentes estágios de diferenciação.	
Fig. 20	Características morfológicas das células na área de lesão em culturas lesadas em E8C1 e E8C7.	
Fig. 21	Imunofluorescência para o antígeno glial 2M6 e para o marcador de precursor neuronal TUJ 1 em culturas de células submetidas à lesão em E8C7.	

- Fig. 22 Incorporação de BrdU em culturas de células de retina com lesão da monocamada.
- Fig. 23 Efeito de apirase 5 U/mL sobre o crescimento celular induzido por lesão.
- Fig. 24 Efeito de antagonistas purinérgicos de receptores P2 sobre o crescimento celular induzido por lesão.
- Fig. 25 Efeito de RB-2 sobre a proliferação celular induzida por lesão mecânica em culturas de retina.
- Fig. 26 Imunofluorescência para o receptor P2Y₁ e para o antígeno glial 2M6 em culturas pouco diferenciadas de células de retina.
- Fig. 27 Imunofluorescência para o receptor P2Y₁ e 2M6 em cultura de células de retina com lesão mecânica de monocamada.
- Fig. 28 Efeito de IOME AG-538 sobre o crescimento celular induzido por lesão.
- Fig. 29 Efeito de IOME AG-538 sobre a proliferação celular induzida por lesão mecânica em culturas de retina.
- Fig. 30 Modelo esquemático de proliferação celular induzida por ATP/ADP em culturas de retinas em E7C1.
- Fig. 31 Modelo esquemático da proliferação celular induzida por lesão em culturas de retinas em E8C7.

Sumário

1- Introdução.....	1
1.1 - Estrutura e neurogênese da retina de galinha.....	1
1.2- Caracterização do ATP como neuromodulador: um breve histórico.....	3
1.3- Liberação de nucleotídeos.....	5
1.4- Receptores purinérgicos.....	7
1.5 – Dessensibilização de receptores acoplados à proteína G.....	9
1.6 – Dessensibilização de receptores P2Y.....	13
1.7- Vias de transdução de sinal ativadas por receptores de nucleosídeos e nucleotídeos.....	14
1.8 – Expressão e importância fisiológica de receptores P2 na retina.....	18
1.9 - Transativação de receptores para fatores tróficos por receptores acoplados à proteína G: Importância na proliferação e sobrevivência celular.....	20
1.10 - Receptores e vias de sinalização para IGF-I.....	22
1.11 - IGF-I na retina.....	24
1.12- Gliose reativa em células de Müller.....	25
2 – Objetivos.....	30
3- Materiais e Métodos.....	31
3.1- Materiais.....	31
3.2- Culturas de retina.....	31
3.3- Lesão mecânica da monocamada de culturas de retina e determinação do crescimento celular.....	32
3.4- Acúmulo de [³ H]-fosfoinositídeos.....	33
3.5- Incorporação de [³ H]-timidina.....	34

3.6- Ensaio de Viabilidade Celular.....	34
3.7- Imunocitoquímica para BrdU e 2M6 em culturas de retinas que sofreram lesão de monocamada celular.....	35
3.8- Imunocitoquímica para P ₂ Y ₁ e 2M6 em cultura de retina.....	36
3.9- Western Blotting.....	37
3.10- Análises estatísticas.....	38
4- Resultados.....	39
4.1- <i>Proliferação celular induzida por ADP depende da participação de receptores tirosina cinase.....</i>	39
4.2- <i>Envolvimento da dessensibilização de receptores P2Y e endocitose mediada por clatrina na resposta proliferativa do ADP.....</i>	54
4.3- <i>Efeito de ATP sobre a proliferação celular em culturas de células de retina mais diferenciadas submetidas à lesão mecânica.....</i>	63
5- Discussão.....	81
6- Conclusão.....	91
7- Referências Bibliográficas.....	94
Anexo I.....	107

1-Introdução:

1.1 – Estrutura e neurogênese da retina de galinha.

O olho dos vertebrados origina-se da vesícula óptica, formada pela invaginação do tubo neural, formando uma estrutura de duas camadas, o copo óptico. A camada interna dá origem aos neurônios e a glia radial da retina neural, enquanto que a monocamada externa de células epiteliais forma o epitélio pigmentado da retina (EPR) (para revisão, Polyak, 1957; Cogan, 1966).

O tecido retiniano é especializado em converter a energia luminosa do ambiente em sinais químicos e elétricos neurais, que são processados e interpretados pelo cérebro. Durante a formação da retina neural, o processo de mitose é confinado à camada de células progenitoras imediatamente adjacente ao epitélio pigmentado da retina, a zona ventricular (ZV). Os núcleos dos progenitores da retina se movimentam por migração nuclear intercinética, movendo-se da ZV em direção à camada de células ganglionares (CCG) durante a fase G1 do ciclo celular. Após a duplicação do DNA na fase S, os núcleos retornam a ZV durante a fase G2 para finalizar o ciclo com a mitose (Pearson *et al.*, 2002).

À medida que as células vão saindo do ciclo celular, o tecido retiniano vai adquirindo uma morfologia em camadas que podem ser basicamente divididas em camadas de corpos celulares (camadas nucleares) e camadas de prolongamentos (camadas plexiformes). Do epitélio pigmentado em direção ao vítreo, a retina é composta pela camada dos fotorreceptores (camada nuclear externa, CNE), seguida pela camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI) e pela camada das células ganglionares (CCG) (Figura 1A).

Histologicamente existem 6 tipos de neurônios e 1 tipo celular glial na retina (para revisão: Rodieck, 1998). Na retina de galinha, a diferenciação das primeiras

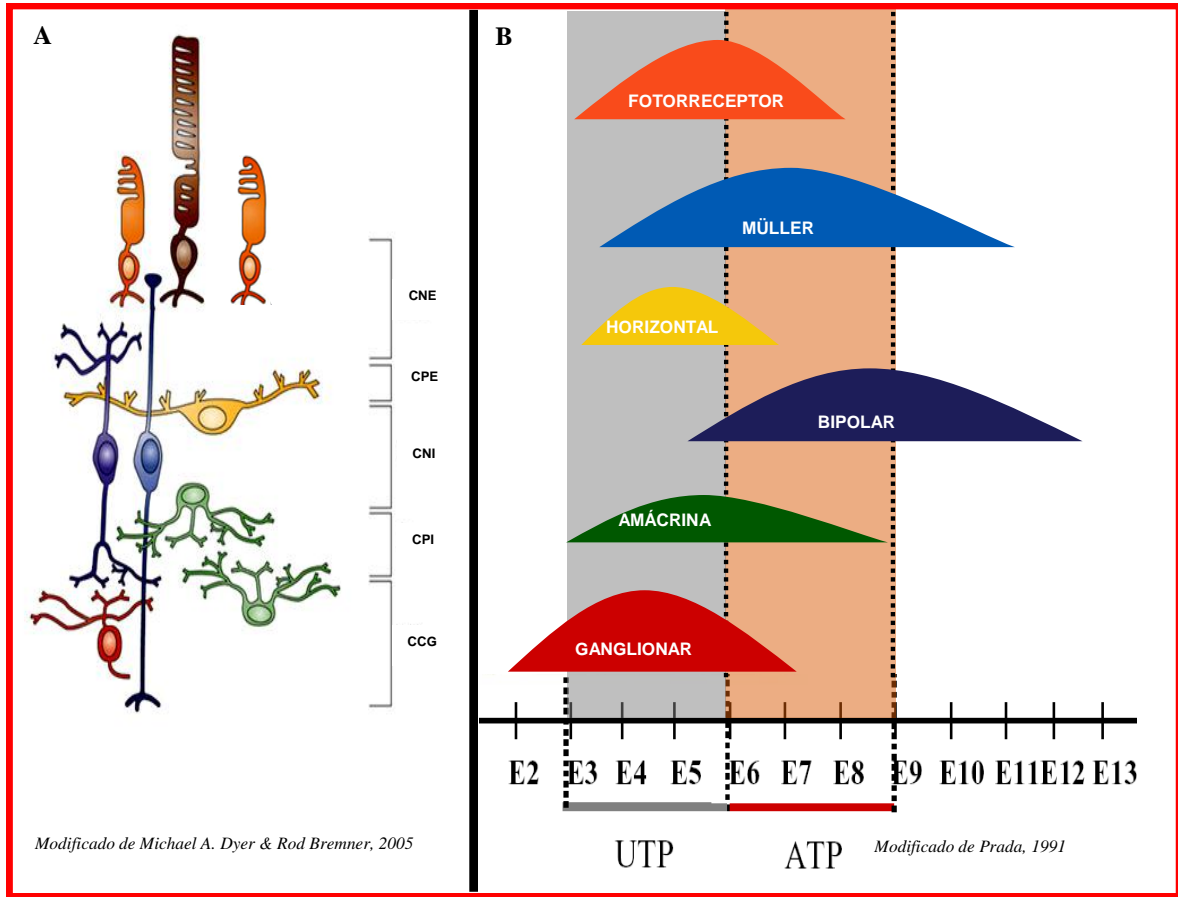


Figura 1: A) Representação esquemática da retina, mostrando suas diferentes camadas e tipos celulares. B) Curso temporal da neurogênese na retina embrionária de pinto. Em **A**, as células desenhadas representam: laranja, fotorreceptores cones; marrom, bastonetes; Amarelo, horizontais; Azul escuro, bipolares; Verde, amácrinas; Vermelho, ganglionares; Azul claro, glia de Muller (Dyer e Bremner, 2005). Em **B**, as barras cinza e vermelho representam as idades embrionárias onde o UTP e o ATP induzem proliferação na retina embrionária de galinha, respectivamente (Pearson *et al.*, 2002; Sanches *et al.*, 2002). CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares.

células ocorre a partir do segundo dia embrionário (E2), do centro para a periferia, começando pelas células ganglionares, seguidas pelos fotorreceptores e pelas células amácrinas e horizontais (Fujita e Hori, 1963; Morris, 1973; Spence e Robson, 1989; Prada *et al.*, 1991). As últimas células a saírem do ciclo celular são as células bipolares e a glia de Müller, havendo o término de divisões celulares em E12 (Kahn, 1974; Prada *et al.*, 1991) (Figura 1B).

Nesta tese, estudamos a proliferação celular induzida por nucleotídeos na retina em duas situações específicas. A primeira parte será focada no mecanismo deflagrado por ATP, ADP e IGF-I para a indução de proliferação celular em culturas mistas de retina, utilizando para isto, embriões com sete dias de desenvolvimento (E7). Na segunda etapa, iremos estudar o papel do ATP na proliferação e migração celular, em culturas de retinas mais diferenciadas (E8C7), submetidas à lesão mecânica.

1.2- Caracterização do ATP como neuromodulador: um breve histórico.

Durante o início do século XX, Drury e Szent Györgyi demonstraram pela primeira vez que o ATP e a Adenosina quando administrados por injeção intravenosa, poderiam agir sobre a fisiologia cardíaca, levando a diminuição da pressão arterial e redução da força de contração.

Os efeitos de nucleotídeos extracelulares no sistema nervoso foram primeiramente demonstrados por Emmelin e Feldberg em 1948, que ao injetar ATP na corrente sanguínea de gatos, verificaram como resposta fisiológica fraqueza muscular, ataxia e sonolência. Ao mesmo tempo, Buchthal e Folkow (1948) reconheceram o papel fisiológico do ATP na junção neuromuscular, mostrando que a contração da fibra muscular esquelética induzida por acetilcolina era potencializada por ATP em sapos. Em seguida, Holton (1959) mostrou a ação neurotransmissora do ATP utilizando

terminais sensoriais como modelo e, Galindo e colaboradores (1967), aplicando ATP na medula espinhal de gatos, observaram que este nucleotídeo produzia mudanças eletrofisiológicas excitatórias.

Nos últimos trinta anos, o papel da adenosina e do ATP como neurotransmissor e neuromodulador no sistema nervoso central, periférico e entérico foi determinado (Burnstock, 1993). Além disso, receptores específicos para ATP (Abbracchio e Burnstock, 1994) e adenosina (Fredholm e Dunwiddie, 1988) foram identificados. A ativação destes receptores pode promover efeitos tróficos incluindo eventos plásticos envolvidos na memória e aprendizado, crescimento de processos nervosos, neuroproteção contra estímulos tóxicos, regulação do número de células através de indução de morte celular e proliferação celular (Ralevic e Burnstock, 1998; Rathbone *et al.*, 1999; Khakh, 2001; Burnstock, 2004). As purinas também regulam a contração muscular lisa, a agregação plaquetária e a mobilidade gastrintestinal, assim como participam na fisiologia respiratória e renal (Burnstock, 1991). No sistema nervoso, a ativação dos receptores purinérgicos pode regular o crescimento de neuritos (Gysbers e Rathbone, 1996), modular a proliferação de células gliais (Rathbone *et al.*, 1991; Abbracchio e Burnstock, 1994; Ciccarelli *et al.*, 1994; Neary *et al.*, 1996), de progenitores retinianos tardios (Sanches *et al.*, 2002; França *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007) e de células do endotélio capilar cerebral (Rathbone *et al.* 1992). As purinas também podem participar na síntese e liberação de neurotrofinas (Ciccarelli *et al.*, 1997), ativação de microglia e formação de escara glial (Neary *et al.*, 1996).

1.3- Liberação de nucleotídeos.

A concentração extracelular de purinas depende de uma série de fatores que incluem: o quanto é liberado para o meio extracelular, o volume de líquido extracelular no local de liberação, além dos mecanismos de captação de purinas e enzimas extracelulares que as metabolizam. No cérebro, as fontes de purinas extracelulares são as células neuronais, a glia, a microglia, células endoteliais e o sangue (Fields e Burnstock, 2006).

Múltiplos mecanismos de liberação para nucleotídeos de adenina em neurônios e astrócitos têm sido discutidos até o momento. No primeiro deles, o ATP seria liberado no espaço extracelular através da lesão da membrana plasmática. Num segundo mecanismo, o ATP passaria pela membrana plasmática intacta através de hemicanais formados por conexinas (Cotrina *et al.*, 2000) ou através de transportadores ligados a canais iônicos (Abdipranoto *et al.*, 2003; Darby *et al.*, 2003). Num terceiro mecanismo, o ATP seria liberado pela exocitose de vesículas sinápticas de neurônios ou de grânulos intracelulares de células não neuronais, de maneira dependente de Na^+ e Ca^{2+} (Richardson e Brown, 1987; Pintor *et al.*, 1992). Neste mecanismo, ATP seria co-liberado com neurotransmissores clássicos como adrenalina, acetilcolina, GABA, dopamina e glutamato no sistema nervoso central por mecanismos envolvendo a despolarização da membrana, podendo a concentração de ATP chegar a 100 μM após estimulação elétrica contínua (para revisão: Fields e Burnstock, 2006). Os mecanismos mais recentes descritos para a liberação de ATP para o espaço extracelular envolvem a glicoproteína P e o regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) (Ballerini *et al.*, 2002) bem como o óxido nítrico (NO) (Burnstock, 2004).

No sistema nervoso central, os neurônios têm sido tradicionalmente considerados como a principal fonte de liberação de ATP. Segundo Zimmermann (1994), o ATP pode

ser liberado na fenda sináptica em conjunto com outros neurotransmissores, ativando receptores purinérgicos específicos e funcionando como um neuromodulador na fisiologia do SNC. Além disso, o ATP liberado para as sinapses pode ser metabolizado em adenosina por ectonucleotidases (Ceballos *et al.*, 1994). A adenosina, por sua vez, é um potente modulador inibitório, aumentando a condutância de canais de potássio pós-sinápticos e diminuindo a condutância de canais de cálcio pré-sinápticos (Zimmermann, 1994; Cunha, 2001). Por outro lado, outros estudos demonstraram que as células gliais também possuem a habilidade de liberar ATP (Wang *et al.*, 2000), sugerindo que elas possam modular a atividade neuronal pela ativação de receptores purinérgicos.

Na retina de coelho, foi demonstrado que o ATP é a principal purina endógena, sendo a [³H]-adenosina incorporada, rapidamente fosforilada em nucleotídeos de adenina neste tecido (Perez *et al.*, 1986). Na retina de ratos, Newman (2001) mostrou que o estímulo de astrócitos e células de Müller resulta na liberação de ATP seguida da propagação de ondas de cálcio. Outros estudos ainda mostraram que o ATP pode ser liberado de células do epitélio pigmentado via hemicanais do tipo “gap junctions”, modulando a proliferação de progenitores (Pearson *et al.*, 2005). Na retina de galinha, observamos que o meio condicionado obtido de cultura de células em estágios avançados do desenvolvimento possui quantidade de ATP suficiente para promover a dessensibilização de receptores P2Y, um efeito que é revertido tanto por diálise do meio utilizando uma membrana permeável a moléculas menores do que 12KDa quanto pela incubação com PPADS 100 µM, um antagonista de receptores P2Y (figura 7 do artigo em anexo: França *et al.*, 2007).

1.4- Receptores purinérgicos.

Receptores distintos para ATP, UTP e seus derivados e para adenosina, foram descritos pela primeira vez por Burnstock (1972, para revisão). Recentemente, Abbracchio e Burnstock (1994) classificaram os receptores purinérgicos como pertencentes a duas grandes famílias: 1- receptores acoplados à proteína-G (metabotrópicos) e 2- receptores diretamente ligados a canais iônicos (ionotrópicos) (Di Virgilio, 2001; Abbracchio e Burnstock, 1994) (Figura 2).

Com base na fisiologia, no perfil farmacológico, na seletividade de acoplamento com vias de segundos mensageiros e na clonagem molecular, Abbracchio e Burnstock (1994) descreveram múltiplos membros destas duas classes de receptores purinérgicos. Assim, os receptores para adenosina (P_1) e ATP (P_2Y) foram classificados como metabotrópicos e os receptores para ATP do tipo P_2X foram classificados como ionotrópicos. Enquanto a maioria dos receptores P_2 é ativada por ATP e em menor escala por ADP, algumas subclasses desses receptores podem ser ativadas por pirimidinas como UTP e UDP (Lazarowski e Harden, 1994). De acordo com estes estudos, a ordem de potência do agonista para os receptores purinérgicos P_1 foi definida por adenosina > AMP > ADP > ATP. Já no grupo de receptores purinérgicos P_2 , o ATP é o principal agonista, sendo a ordem de potência do ligante ATP > ADP > AMP > adenosina (Abbracchio e Burnstock, 1994). Além disto, outros estudos com base na estrutura molecular, distribuição nos tecidos, características farmacológicas (Abbracchio e Burnstock, 1994) e vias de sinalização específicas (Palmer e Stiles, 1995), estabeleceram que os receptores P_1 de adenosina podem ser divididos em quatro subtipos, A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , todos associados à proteína G.

Os receptores P_2X apresentam baixa afinidade para o ATP e são responsáveis pela neurotransmissão excitatória rápida já que, quando ativados, permitem a passagem de

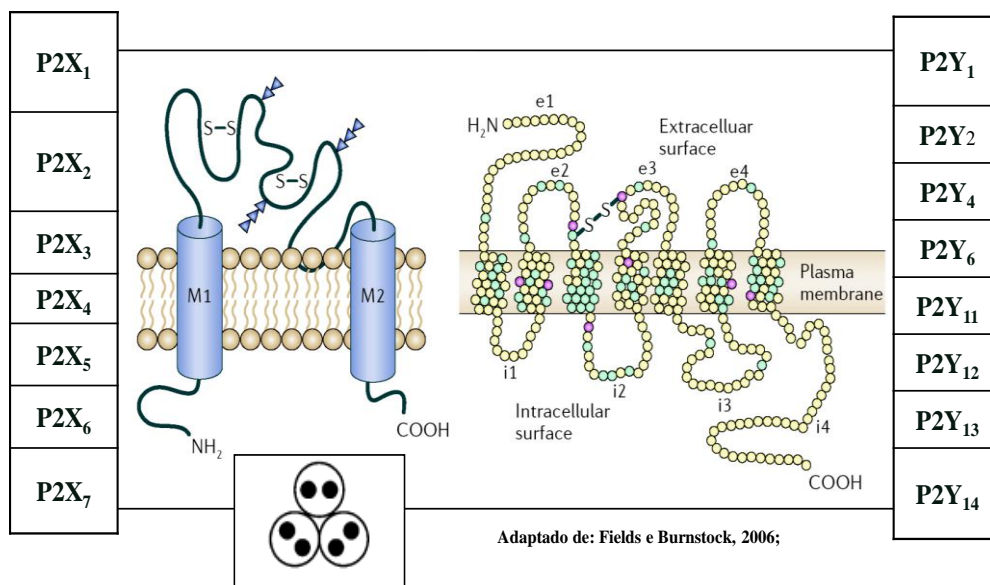


Figura 2: Famílias de receptores purinérgicos P2. A direita, estão representados os receptores metabotrópicos P2Y, que são estruturalmente compostos por 7 domínios transmembrana, uma porção c- e n- terminal localizadas no meio intra e extracelular, respectivamente. A esquerda, estão representados os receptores ionotrópicos P2X, caracterizados por possuírem suas regiões carboxi e amino-terminais localizadas intracelularmente e exibirem uma alça extracelular onde se ligam os agonistas. São formados por hetero- ou homotrímeros que, ao serem ativados, permitem a passagem de cátions tais como Ca²⁺, Na⁺ e K⁺ (Fields e Burnstock, 2006).

cátions tais como Ca^{2+} , Na^+ e K^+ . Até o momento, já foram descritos sete subtipos: $\text{P2X}_{(1-7)}$ (Ralevic e Burnstock, 1998; Illes *et al.*, 2000; Burnstock, 2004), todos caracterizados por possuírem suas regiões carboxi- e amino-terminais localizadas intracelularmente e exibindo uma alça extracelular onde se ligam agonistas, antagonistas e moduladores (Khakh *et al.*, 1999).

Os receptores metabotrópicos P2Y são estruturalmente compostos por sete domínios transmembrana, tem a porção C-terminal localizada no meio intracelular e a porção N-terminal localizada extracelularmente. Até o momento foram identificados oito subtipos, podendo estar acoplados a proteína- $\text{G}_{q/11}$ (receptores P2Y_1 , $\text{P2Y}_{2/4}$, P2Y_6 , P2Y_{11} e P2Y_{14}), a proteína G_s (P2Y_{11}) e a proteína G_i (P2Y_{12} e P2Y_{13}). Enquanto os receptores $\text{P2Y}_{1, 11, 12, 13}$ são ativados seletivamente por nucleotídeos de adenina (von Kügelgen e Wetter, 2000; Hollopeter *et al.*, 2001; Fields e Burnstock., 2006), os receptores P2Y_4 humano, P2Y_6 e P2Y_{14} são estimulados por nucleotídeos de pirimidinas. Já o receptor P2Y_2 responde igualmente bem a ATP e UTP (Fields e Burnstock., 2006). A tabela I sintetiza algumas das características dos receptores P2Y.

1.5 – Dessensibilização de receptores acoplados à proteína G.

A resposta celular de receptores acoplados à proteína G ao agonista, geralmente, pode ser rapidamente atenuada. Os mecanismos que atenuam a sinalização destes receptores são considerados de grande interesse, uma vez que fornecem subsídios à célula para responder adequadamente a hormônios e neurotransmissores.

O fenômeno de dessensibilização de receptores acoplados a proteína G (RPTG) envolve pelo menos dois processos principais, a fosforilação da alça carboxi-terminal do receptor e a internalização (endocitose) do receptor. Diversas proteínas cinases possuem como alvo os RPTGs. O principal alvo de proteínas cinases como a PKA, PKC e GRKs nos RPTGs são os resíduos serina e treonina localizados na cauda C-terminal (para

Receptor	Agonista	Antagonista	Sinalização
P2Y ₁	2MeSADP > ADP > ATP	MRS2179, PPADS	G _q / PLCβ / Ca ²⁺ / PKC
P2Y ₂	UTP = ATP	Suramina > RB-2	G _q / PLCβ / Ca ²⁺ / PKC
P2Y ₄	UTP > ATP	RB-2 > Suramina	G _q / G _o / PLCβ / Ca ²⁺ / PKC
P2Y ₆	UDP >> UTP > ATP	MRS2578, PPADS, Suramina	G _q / PLCβ / Ca ²⁺ / PKC
P2Y ₁₁	ATP	Suramina > RB-2	G _q / PLCβ / Ca ²⁺ / PKC G _s / AC / cAMP
P2Y ₁₂	ADP >> ATP	Clopidogrel	G _i / AC / cAMP G _{12/13} / Rho A
P2Y ₁₃	ADP	MRS2211	G _{i/o} / AC / cAMP
P2Y ₁₄	UDP-glicose	-	G _q / G ₁₁

Tabela I: Principais agonistas, antagonistas e vias de transdução de sinal pra receptores P2Y. (adaptado de Fields e Burnstock, 2006 e Erb *et al.*, 2006).

revisão: Barki-Harrington e Rockman, 2008). A fosforilação do receptor acaba por diminuir o acoplamento com a proteína G e, conseqüentemente, diminuir os efeitos biológicos clássicos gerados pela ativação do receptor. Geralmente a fosforilação do receptor por PKA e PKC não ocorre de maneira específica, levando a fosforilação de outros receptores. Este tipo de dessensibilização é conhecido como heteróloga (Koenig e Edwardson, 1997). Já a fosforilação dos RPTGs pelas GRKs afeta em sua maioria os receptores ligados ao agonista culminando na dessensibilização homóloga. Os resíduos fosforilados pelas GRKs são diferentes daqueles que são alvos de outras cinases (Krupnick e Benovic, 1998). Além disso, as GRKs promovem a ligação de arrestinas, que são proteínas intracelulares que bloqueiam a interação do receptor com as proteínas G e facilitam a endocitose (Figura 3). Durante a endocitose, as moléculas de β -arrestina podem servir como proteínas acessórias adaptadoras, fazendo com que proteínas como a Raf e ERK sejam ativadas durante o processo (Ferguson, 2001).

Células eucarióticas possuem duas vias bioquímicas distintas para realização de endocitose: uma via dependente e outra independente de clatrina. A formação de vesículas recobertas por clatrina ocorre através da interação de proteínas do citoplasma com componentes da superfície interna da membrana plasmática (para revisão: Mousavi *et al.*, 2004). Neste caso, os fosfoinosítídeos, especialmente $(4,5)P_2$ e $(3,4,5)P_3$, que são formados e metabolizados de maneira regular na superfície interna da membrana interagem com as proteínas adaptadoras capazes de promover o recobrimento de vesículas com clatrina, incluindo a proteína adaptadora heterotetramérica AP-2 (Ford *et al.*, 2001).

A via de endocitose dependente de clatrina foi claramente caracterizada nos terminais sinápticos, onde participa como o principal mecanismo para reciclagem de

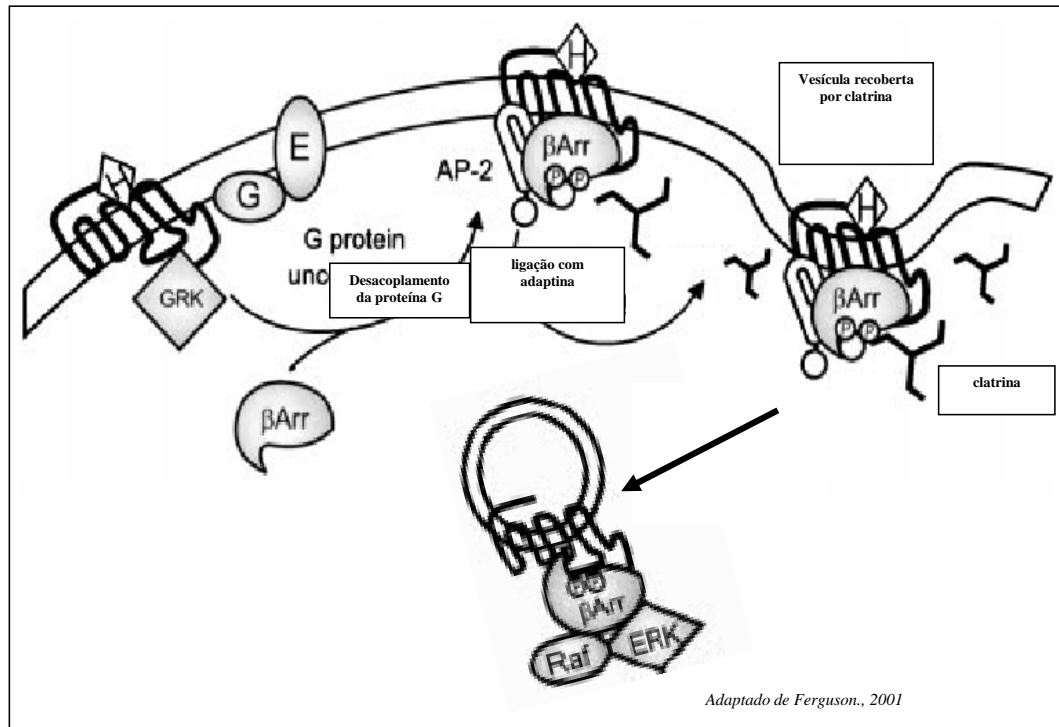


Figura 3: Mecanismos moleculares envolvidos na dessensibilização e internalização de RPTG dependente de GRKs e β-arrestina. A ativação de RPTG leva a fosforilação do receptor na alça carboxi-terminal mediada por GRKs ou PKC ou PKA. Este fenômeno facilita a ligação de β-arrestina ao receptor. β-arrestinas, através da associação com a β2-adaptina do complexo adaptador AP-2, fixam os RPTGs em regiões recobertas por clatrina. Estas regiões sofrem internalização durante a qual moléculas de β-arrestina funcionam como adaptadores, fazendo com que proteínas como a Raf e ERK sejam ativadas (adaptado de Ferguson, 2001).

vesículas sinápticas após a liberação de neurotransmissores em resposta a despolarização da membrana. De maneira geral, a endocitose mediada por clatrina pode ser morfológicamente definida por três estágios distintos: 1- recrutamento de moléculas de clatrina para a membrana plasmática, formando regiões recobertas por clatrina; (2) invaginação destas regiões recobertas; (3) rompimento das vesículas da membrana plasmática (para revisão: Schmid, 1997). A endocitose dependente de clatrina ocorre normalmente em sítios especializados da membrana e as proteínas mais abundantes encontradas nestas regiões são a clatrina e a AP-2 (Owen *et al.*, 2000).

1.6 – Dessensibilização de receptores P2Y.

O papel da dessensibilização e endocitose de receptores purinérgicos vem sendo caracterizado. Hardy e colaboradores (2005), utilizando plaquetas humanas, mostraram que a ativação de receptores P2Y₁ com ADP é capaz de induzir ou favorecer a agregação plaquetária. Este fenômeno é dependente da dessensibilização destes receptores, indicando a importância deste mecanismo para a resposta fisiológica.

Mundell e colaboradores (2006), utilizando células de astrocitoma 1321N1 transfectadas com receptores P2Y₁ associados à hemaglutinina, mostraram pela primeira vez que as isoformas α e γ da PKC são capazes de fosforilar o receptor P2Y₁ de maneira dependente ou independente de sua ativação. Suspeita-se que este receptor possa ser fosforilado na alça C-terminal, uma vez que esta região possui sítios passíveis de tal reação, incluindo a treonina 339. A cinética de reciclagem destes receptores na membrana foi estabelecida por Baurand e colaboradores (2005) utilizando células plaquetárias humanas. Estes receptores são rapidamente retirados da membrana plasmática por endocitose, cerca de 45 segundos após o estímulo com ADP, só retornando para a membrana 15 minutos após a retirada do agonista. Recentemente,

Barton e colaboradores (2008) mostraram que o pré-tratamento de plaquetas com ADP pode promover a dessensibilização heteróloga de receptores para tromboxano de maneira dependente de cálcio e independente de PKC.

No sistema dopaminérgico, foi demonstrado que a fosforilação da ERK é dependente da internalização dos receptores de dopamina induzida por agonistas. Kim e colaboradores (2004), utilizando células CHO transfectadas com plasmídeos para os receptores dopaminérgicos D2L e D2S, mostraram que a estimulação do receptor D2L, mas não do receptor D2S, induz a ativação da via da MAPK através da transativação do receptor tirosina cinase para PDGF. Por outro lado, a ativação da via da MAPK por D2S foi dependente da internalização destes receptores mediada por clatrina e dependente também de β -arrestina / dinamina. Recentemente, o nosso grupo demonstrou que a proliferação celular induzida por ATP na retina de galinha é dependente da ativação da via das ERKs (Sanches *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2007) e ocorre simultaneamente com a dessensibilização de receptores P2 induzida por agonista, sugerindo a importância deste fenômeno durante o desenvolvimento da retina “*in vitro*” (França *et al.*, 2007).

1.7- Vias de transdução de sinal ativadas por receptores de nucleosídeos e nucleotídeos.

Receptores A_1 são classicamente envolvidos com a inibição da adenil ciclase (para revisão: Rathbone *et al.*, 1999) através da ativação da proteína- $G_{i\alpha 1}$ sensível à toxina pertussis. Além da adenil ciclase, outros efetores podem estar envolvidos na ativação de receptores A_1 . Estes incluem a guanilil ciclase, além de canais de potássio e de cálcio dependentes de voltagem (Collis e Hourani, 1993) e da fosfolipase C (Salter e Hicks, 1995).

Receptores A_1 podem estar também ligados à fosfolipase A_2 (Collis e Hourani, 1993). Diferentemente dos receptores A_1 , os receptores A_2 estimulam a adenil ciclase acoplando-se à proteína G_s e provocando o aumento da concentração de cAMP intracelular (Olah e Stiles, 1990). O receptor A_3 foi o último subtipo a ser caracterizado, exibindo um perfil farmacológico da ativação e distribuição nos tecidos distintos nas diferentes espécies. Em células RBL-2H3, a ativação dos receptores A_3 promove um aumento da concentração de Ca^{2+}_i através do aumento da formação de inositol trifosfato (Parekh e Penner, 1995).

Classicamente, os receptores P2 da família P2X regulam as funções celulares através da abertura de canais de cátions (Abbracchio e Burnstock, 1994) (Figura 4). Em geral, estes canais iônicos mostram seletividade para cátions monovalentes como Na^+ , K^+ (Harden *et al.*, 1995) e em alguns casos para o Ca^{2+} (Cloues, 1995).

O subtipo P2X₇ difere dos demais receptores P2X em suas propriedades farmacológicas, sensibilidade à voltagem e condutância. Além disso, funções distintas dos demais subtipos de receptores desta família foram detectadas, uma vez que estes sítios possuem a habilidade de formar poros na membrana celular. A ativação de receptores P2X₇ aumenta a permeabilidade da membrana para a passagem de cátions e ânions, bem como para moléculas com até 900 Da (Ballerini *et al.*, 1995). Ballerini e colaboradores (1996) relataram a presença de receptores P2X₇ em culturas de astrócitos de rato sendo a sua ativação capaz de aumentar a liberação de purinas destas culturas.

Por outro lado, os receptores metabotrópicos P2Y_{1, 2, 4, 6, 11} estão acoplados a família de proteínas $G_{q/11}$ e estimulam a fosfolipase C, resultando na formação de inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) com subsequente mobilização de estoques intracelulares de cálcio (Abbracchio e Burnstock, 1994; von Kügelgen e Wetter, 2000) (Figura 4). Esta via de sinalização foi demonstrada em astrócitos corticais

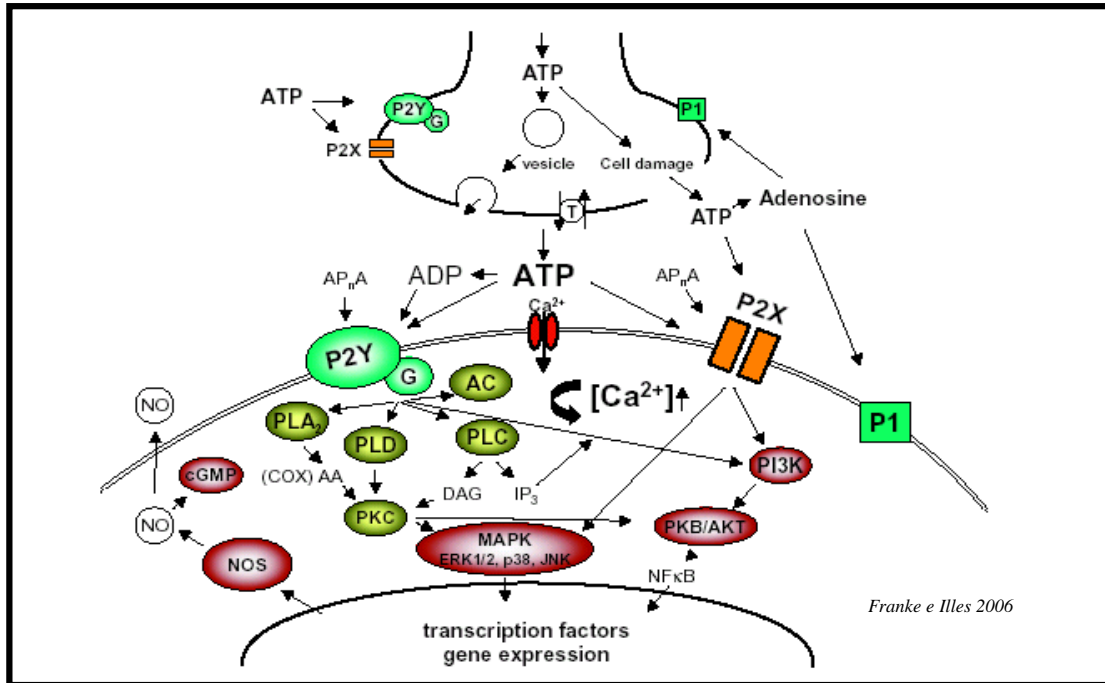


Figura 4: Diagrama esquemático ilustrando as possíveis ações do ATP identificadas até o momento. Estão representados a liberação de ATP, o metabolismo, a ativação de receptores ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y e algumas interações com vias de segundos mensageiros. A ativação destes receptores é capaz de promover a transcrição de genes, resultando em diversas respostas biológicas (Franke e Illes, 2006).

(Neary *et al.*, 1988; Kastritsis *et al.*, 1992), medula de ratos (Salter e Hicks, 1995; Ho *et al.*, 1995) e retina embrionária de galinha (Sanches *et al.*, 2002; França *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007).

O ATP e outros agonistas seletivos para receptores P2Y, adicionados a culturas de astrócitos de rato ativam a fosfolipase C e aumentam a concentração de Ca^{2+} interno (Ballerini *et al.*, 1995), sendo este aumento inibido por tapsigargina, uma droga que leva ao esvaziamento dos estoques de cálcio do retículo (Ballerini *et al.*, 1995). Em conjunto com esses dados, Chen e Chen (1996) mostraram que a toxina pertussis inibe o acúmulo de $[H^3]$ -fosfoinosítídeos induzido por ATP, UTP e 2-metil-tio-ATP em culturas de astrócitos. Estes experimentos sugeriram que, nestas células, receptores P2Y são capazes de se acoplar com a PCL_{b3} ou PCL_{b2} através da proteína G_i sensível a esta toxina.

A ativação de receptores P2Y também foi relacionada com mudanças nos níveis intracelulares de AMPc (Figura 4). Em alguns tipos celulares, a ativação de receptores P2Y aumenta o acúmulo de AMPc (Gailly *et al.*, 1993). Porém, este efeito poderia estar ocorrendo de forma indireta, uma vez que o ATP causa a liberação de transmissores que aumentam a atividade da adenil ciclase. Por outro lado, a ativação de receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ promovem a inibição da adenil ciclase através da ativação da proteína $G_{i/o}$ (para revisão: Franke e Illes, 2006) e o P2Y₁₁ está envolvido tanto com a ativação da adenil ciclase quanto com o aumento de IP₃ (Abbracchio *et al.*, 2003).

A ativação de receptores P2Y em cultura de astrócitos pode ativar a via das proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) (Neary *et al.*, 1996). Membros clássicos da família MAPK, como as proteínas cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs), estão envolvidas no crescimento, diferenciação e proliferação celular (Neary *et al.*, 1996; Neary *et al.*, 1999). A ativação da cascata das MAPKs mediada por receptores

P2Y, em particular as ERK1/2 ou a cinase do N-terminal do c-Jun (JNKs), foi relacionada com a ativação da caspase-3 e apoptose (Neary *et al.*, 1999; Sellers *et al.*, 2001). Além disso, outros estudos sugerem que a ativação do receptor P2Y acoplado a PLA₂ seja acompanhada por um aumento na expressão da ciclooxigenase-2 (Abbracchio *et al.*, 1999; Brambilla *et al.*, 2002).

1.8 – Expressão e importância fisiológica de receptores P2 na retina.

Os fotorreceptores, a maioria dos neurônios, células de Müller e o epitélio pigmentado expressam receptores P2. Na retina adulta, a ativação de receptores P2X contribui com a neurotransmissão excitatória rápida e os receptores P2Y possuem funções neuromodulatórias (Housley *et al.*, 2009, para revisão).

Em ratos, os receptores P2X encontram-se distribuídos por diversas células retinianas. Nos fotorreceptores, o receptor P2X₂ encontra-se presente no soma e segmentos externos com funções fisiológicas ainda não esclarecidas (Greenwood *et al.*, 1997). Já o receptor P2X₇ participa no aumento da amplitude da onda A do eletroretinograma derivada de fotorreceptores, reduzindo de forma transitória as respostas pós-sinápticas derivadas de fotorreceptores (Puthussery e Fletcher, 2006). Em células bipolares, foram detectados os receptores P2X_{3, 4, 5}. Porém suas respectivas funções fisiológicas ainda não foram determinadas (Housley *et al.*, 2009, para revisão). Em células ganglionares, foram detectados os receptores P2X_{2, 3, 4, 5, 7}. Até o momento, as funções fisiológicas para estes receptores foram estudadas somente para o receptor P2X₇. Estes, por sua vez, são responsáveis pelo aumento sustentado de cálcio intracelular, pela ativação de canais de cálcio do tipo L, seguido pela ativação de caspases e morte celular (Zhang *et al.*, 2006). Em células amácrinas, foram detectados os receptores P2X_{1, 2, 3, 5, 7}, sendo os receptores P2X₂ localizados com maior frequência

em células amácrinas GABAérgicas. Entretanto, nenhuma correlação fisiológica foi encontrada até o momento para estes receptores (Housley *et al.*, 2009, para revisão). Em células horizontais, somente os receptores P2X₇ foram detectados até o momento (Puthussery e Fletcher, 2006), porém sua função fisiológica também não foi ainda determinada. Finalmente, na glia de Müller e astrócitos de humanos o receptor P2X₇ promove um aumento no influxo de cálcio, despolarização, ativação de canais de K⁺ estimulados por Ca²⁺ e proliferação celular (Pannicke *et al.*, 2000).

Na retina adulta, os receptores P2Y_{1, 2, 4 e 6} encontram-se distribuídos nos segmentos internos de fotorreceptores, células bipolares, ganglionares, astrócitos e células de Müller (Ward e Fletcher, 2008; Ward e Fletcher, 2009; Housley *et al.*, 2009, para revisão). Em astrócitos e células de Müller, a ativação destes receptores está correlacionada com a propagação de ondas de Ca²⁺ geradas por estímulo glutamatérgico, elétrico ou por lesão mecânica (Newman e Zarhs, 1997). Estes estímulos levam a liberação de ATP no espaço extracelular, que ativa os receptores P2Y. Além disso, o ATP pode sofrer hidrólise e ser convertido a adenosina, que através da ativação de receptores A1 presente em células ganglionares, resulta na diminuição da atividade espontânea destas células (Newman., 2003).

Durante o desenvolvimento da retina, os receptores P2Y foram os mais estudados. Em retinas de camundongos em P0, ATP endógeno pode ativar o receptor P2Y₁. A ativação deste receptor induz progenitores tardios a progredir no ciclo celular durante as fases G1 e S por um mecanismo que combina um aumento na expressão de ciclina D1 e uma diminuição na expressão de p27^{kip1}, resultando em um aumento da proliferação celular, restrito a uma janela específica do desenvolvimento situada entre P0 e P2 (Sholl-Franco *et al.*, 2010). Na retina de galinha, ATP e UTP, através de receptores P2Y_{2/4}, estimulam a proliferação de progenitores retinianos do 3º (E3) ao 5º (E5) dia de

desenvolvimento embrionário. Já em fases mais tardias do desenvolvimento (E7 a E9), somente o ATP estimula a proliferação de precursores de células bipolares e gliais, através do receptor P2Y₁ (Sanches, *et al.*, 2002; Nunes, *et al.*, 2007).

1.09 – Transativação de receptores para fatores tróficos por receptores acoplados à proteína G: Importância na proliferação e sobrevivência celular.

A proliferação celular induzida por ATP em células gliais pode ocorrer de maneira dependente da transativação de receptores tirosina cinase, como o receptor para PDGF e EGF. Milenkovic e colaboradores (2003) demonstraram este fenômeno utilizando culturas purificadas de glia de Müller obtidas de retinas de cobaias. Seus experimentos demonstraram que a ativação de receptores P2Y induz um aumento no influxo de cálcio intracelular que, por sua vez, ativa a PKC, promovendo a ativação da via das MAPKs, ou, de maneira ainda não muito bem esclarecida, leva a liberação de PDGF. Este fator, através da ativação de seu receptor, induz a ativação da via da PI3K e de uma metaloprotease que, por sua vez, cliva o EGF ancorado na face extracelular da membrana plasmática, promovendo então a transativação destes receptores. Uma vez ativados, estes receptores promovem a ativação da via das MAPKs, culminando em aumento da síntese de DNA.

Duas classes de receptores para neurotrofinas foram identificadas: os receptores de alta afinidade, que compreendem os receptores relacionados à tropomiosina Trk A, B e C, e o receptor p75 de baixa afinidade. Cada um destes receptores se liga a um ou mais membros da família de neurotrofinas (Patapoutian e Reichardt, 2001). Lee e Chao (2001), utilizando cultura de células PC12 transfectadas com o receptor Trk A ou culturas de células de hipocampo de rato com 17 dias de desenvolvimento embrionário, mostraram que o estímulo de receptores A2a com adenosina é capaz de promover a

fosforilação de receptores Trk na tirosina 99. Além disso, neste trabalho os autores verificaram que o tratamento das culturas com adenosina e BDNF promove um aumento de sobrevivência celular, um fenômeno que é bloqueado por K252a e LY294002, sugerindo que o mecanismo de ação da adenosina sobre o resgate da morte celular de neurônios hipocâmpais de rato necessita da transativação de receptores do tipo Trk por receptores A2a e da ativação da PI3K/Akt. Posteriormente, Lee e colaboradores (2002) mostraram que receptores para PACAP (Polipeptídeo Pituitário Ativador da Adenilato Ciclase), também são capazes de promover transativação de receptores Trk A e B, resultando em aumento de sobrevivência de neurônios. Recentemente, utilizando a técnica de imunoprecipitação, Rajagopal e Chao (2006) mostraram que a proteína tirosina cinase solúvel Fyn, pertencente à família da Src, participa como intermediário entre a transativação do receptor A2a com receptores Trk A e B.

Ligantes para receptores acoplados à proteína G, além de modular vias clássicas envolvendo adenil ciclase e PLC, são capazes de ativar a via das MAPKs. Como exemplificado acima, a ativação de receptores do tipo tirosina cinase pode ocorrer através da sinalização de receptores acoplados a proteína G. Em particular, receptores para EGF (Daub *et al.*, 1996), PDGF (Linseman *et al.*, 1995) e IGF-I (Rao *et al.*, 1995), podem ser transativados por receptores acoplados a proteína G. Recentemente, McCusker e colaboradores (2006) mostraram que receptores de IGF-I potenciam as ações tróficas do BDNF em neurônios corticais de ratos através da transativação destes receptores. Especificamente, ao tratar as culturas de células com IGF 50ng/mL durante 24 horas, os autores observaram um aumento na fosforilação dos receptores Trk B e uma potenciação na ativação da via das MAPK. Além disso, a associação entre receptores P2Y e IGF-I vem sendo demonstrada em culturas de glioma C6 (van Kolen *et al.*, 2006). Neste trabalho os autores mostraram que o receptor P2Y₁₂ quando ativado

por ADP é capaz de promover a ativação do complexo Pyk2/Src/PLD-2 através da subunidade $\beta\gamma$ da proteína G e influxo de cálcio extracelular. Uma vez ativado, este complexo promove a ativação de receptores para IGF-I localizados em cavéolas, ativando a Rap-1 e a via da PI3K/PKB (Figura 5).

Dalle e colaboradores em 2001 mostraram que o tratamento de culturas de fibroblastos de ratos com IGF-I é capaz de estimular a síntese de DNA sendo este mecanismo mediado por proteínas G. Eles mostraram que o receptor de IGF-I se associa à $G_{i\alpha}$, liberando assim as subunidades β e γ , sendo esse acoplamento do receptor de IGF com a proteína G essencial para a sinalização mitogênica desse fator. Estes autores igualmente demonstraram que os receptores de insulina e de IGF apresentam diferenças no acoplamento à proteína G. Essas diferenças podem explicar parcialmente as diferentes potências entre esses dois receptores com relação à sinalização mitogênica versus a resposta metabólica (Dalle *et al.*, 2001).

Nesta tese, pretendemos estudar a participação de fenômenos de transativação de receptores tirosina cinase do tipo IGF-I por receptores P2Y₁.

1.10 - Receptores e vias de sinalização para IGF-I.

Em vertebrados, os fatores de crescimento relacionados à insulina incluem a insulina, seu precursor, a pró-insulina e os fatores de crescimento relacionados a insulina I e II (IGF-I e IGF-II). A maior parte dos efeitos biológicos do IGF é devido a ativação de receptores de IGF-I. O receptor para IGF-II é composto por uma cadeia polipeptídica com um pequeno domínio citoplasmático que não possui atividade catalítica (Russo *et al.*, 2005). Já o receptor de IGF-I é estruturalmente homólogo ao receptor de insulina, apresentando-se como um heterotetrâmero glicosilado, composto por duas subunidades α e duas subunidades β . Localizadas na porção extracelular, as

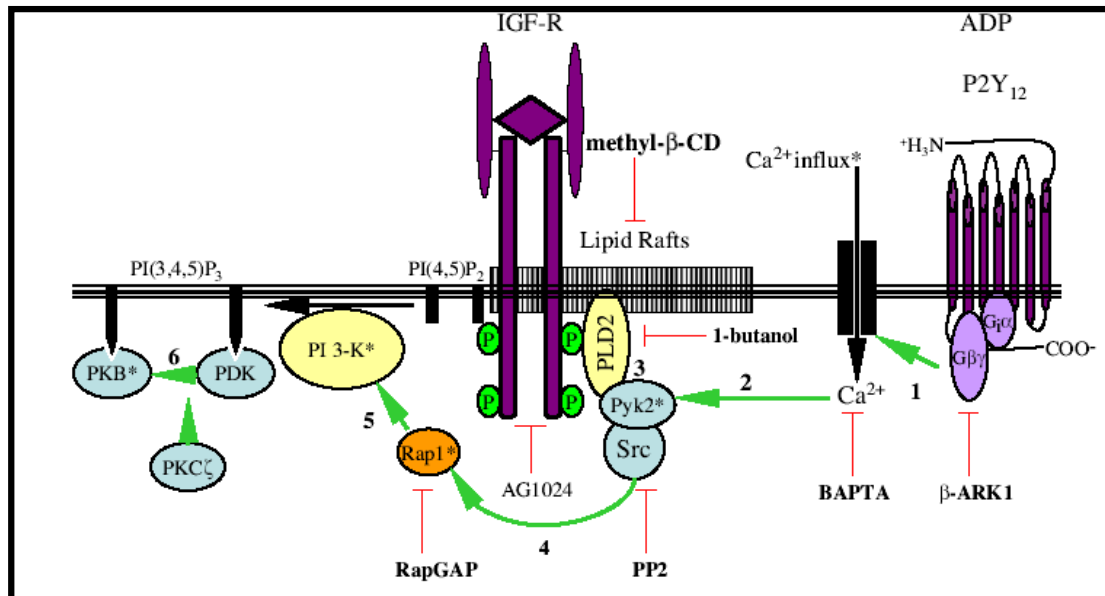


Figura 5: Ativação da PI3K/PKB mediada por receptores P2Y12. A ativação de receptores P2Y12 induz a mobilização de cálcio mediada pela subunidade $\beta\gamma$ da proteína G (1) levando a uma rápida ativação de Pyk2/Src (2). A via de sinalização da Pyk2/Src exige a participação da PLD2 encontrada em cavéolas e que está associada com a atividade autócrina e constitutiva de receptores para IGF-I servindo como uma plataforma para facilitar a interação entre componentes de sinalização (3). Uma vez associadas, Pyk2/Src/PLD2 são capazes de induzir a ativação da Rap1 (4) que, por sua vez, ativa a via da PI3-K/PKB (5 e 6) (van Kolen *et al.*, 2006)

subunidades α são domínios protéicos ricos em cisteína, sendo esta a região responsável pela interação com o IGF. As subunidades β possuem grande parte de sua estrutura localizada na porção intracelular, sendo esta a região que apresenta atividade tirosina cinase (Butt *et al.*, 1999, para revisão).

As vias de sinalização desencadeadas pela ativação de receptores para IGF-I em diversos tipos celulares já foi caracterizada. A ativação deste receptor leva à sua autofosforilação com subsequente acúmulo de [3 H]-fosfoinosítídeos (Thakker *et al.*, 1989; Guse *et al.*, 1992). Além disso, a ativação de receptores de IGF-I envolve a fosforilação do substrato responsivo a insulina (IRS). Através de uma proteína adaptadora, a Grb2, ocorre o recrutamento da SOS formando um complexo IRS-1-Grb2-SOS que ativa a Ras. A partir dessa associação, ocorre a estimulação da Raf que resulta na fosforilação e ativação das ERKs (Johnson-Farley *et al.*, 2006). Ambos os receptores estão envolvidos também na ativação da via da PI3K, que pode ser estimulada pelo IRS-1 fosforilado. Um outro evento observado com a autofosforilação do receptor de IGF-I é a associação direta com a subunidade p85 da PI3K de forma independente de IRS-1 (Jones e Clemmons, 1995).

1.11 - IGF-I na retina.

A presença de receptores para IGF-I foi detectada tanto no cristalino e epitélio pigmentado quanto na retina embrionária de galinha (Bassnett e Beebe, 1990). A expressão de receptores para IGF-I neste tecido é regulada durante o desenvolvimento (Waldbillig *et al.*, 1991). Retinas com 6 dias de desenvolvimento apresentam uma ampla distribuição de receptores de insulina (IR) e IGF-I. Além disso, o produto de amplificação do gene para pró-insulina é mais abundante em E6, com posterior diminuição (de la Rosa *et al.*, 1994), enquanto que a amplificação do gene para IGF-I

aumenta de E6 para E7 e segue aumentando ainda mais em estágios embrionários tardios (Hernandez-Sánchez *et al.*, 1995). Já os níveis de expressão dos receptores de insulina e IGF-IR mRNAs são praticamente constantes entre E6 e E8.

Receptores de IGF, quando ativados por insulina e IGF na retina, previnem a morte celular programada induzida por caspase 3 em células ganglionares através da via da PI3 cinase (Wu *et al.*, 2003). O tratamento de culturas de células de retina de ratos neonatos com IGF-I 10ng/mL, por 24 e 48 horas, induz um aumento dose- e tempo-dependente de aproximadamente 50% na proliferação celular (Medina, 2008). Em culturas de explantes de retinas de embrião de galinha (E7-E9), o tratamento com IGF-I 40 e 100 ng/mL por 48 horas promove um aumento na incorporação de [³H]-timidina de 20% e 45% acima do nível basal, respectivamente. Além disso, o tratamento com IGF-II em concentrações elevadas (200ng/mL) também aumenta a proliferação na retina (Calvaruso *et al.*, 1996).

1.12- Gliose reativa em células de Müller

No sistema nervoso central, a ativação de astrócitos acontece em resposta a diversas formas de lesão ou doenças, gerando efeitos protetores e/ou prejudiciais que em conjunto recebem o nome de gliose reativa. Acredita-se que a gliose reativa represente uma tentativa de proteger o sistema de danos progressivos, preservando o funcionamento fisiológico do tecido nervoso. As ações protetoras e regenerativas da gliose envolvem, entre outros eventos, a produção de fatores neurotróficos, liberação de agentes anti-oxidantes, captação do excesso de glutamato, recuperação da barreira hematoencefálica, suporte para a regeneração axonal e remodelamento sináptico (Liberto *et al.*, 2004). Por outro lado, a gliose reativa também contribui para a

neurodegeneração, impedindo a regeneração axonal e crescimento dendrítico através da formação da escara glial (Profirys *et al.*, 2004).

As respostas gliais a lesões assemelham-se no cérebro e na retina. O principal componente glial na retina é a célula de Müller, a qual se encontra ativada em diversas condições patológicas, tais como lesão por radiação luminosa, trauma mecânico, isquemia, retinopatia diabética e degeneração macular senil (Bringmann *et al.*, 2006). Nestes processos, as células de Müller são capazes de re-entrar no ciclo celular (Dyer e Cepko, 2000; Bringmann e Reichenbach, 2001), podendo se tornar um progenitor neurogênico (Fischer e Reh, 2001; 2003). Entretanto, a gliose reativa de células de Müller também pode contribuir para a degeneração neural e formação de edema e escara glial que podem impedir o reparo e o remodelamento do tecido retiniano. A escara glial preenche o espaço deixado pela degeneração de fotorreceptores, neurônios, epitélio pigmentado e vasos sanguíneos (para revisão: Bringmann *et al.*, 2006).

A resposta das células de Müller às lesões ou doenças manifesta-se inicialmente com a produção de fatores tróficos, gerando um ambiente favorável ao resgate de neurônios. Em particular, o FGFb é um dos principais fatores considerados como neuroprotetores efetivos na retina. Os demais fatores relacionados com neuroproteção na retina, tais como o BDNF, GDNF e NT-3 agem estimulando as células de Müller a produzir o FGFb (para revisão: Zahs e Esguerra, 2006). Outra característica importante da resposta inicial da glia de Müller durante as lesões e doenças é a dramática redução na expressão de canais retificadores de K^+ . Esta redução na expressão destes canais é acompanhada por despolarização e aumento na resistência de sua membrana, fenômenos que estão diretamente relacionados com a proliferação destas células (para revisão: Zahs e Esguerra, 2006). Outras características apresentadas pela gliose de células de Müller são a ativação da via das ERKs (Tezel *et al.*, 2003), hipertrofia,

proliferação, aumento na expressão de filamentos intermediários tais como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a vimentina (Lewis e Fisher, 2003).

Na retina de galinha, foi observado que nem todas as células de Müller respondem de maneira homogênea ao estímulo lesivo. Fischer e Reh (2003) observaram que a lesão de retinas adultas com NMDA induz uma proliferação de ~ 65% das células de Müller. Além disso, as células que apresentam um aumento na expressão de GFAP induzida pela lesão não re-entram no ciclo celular, enquanto que as células que não apresentam um aumento na expressão de GFAP proliferam.

Diversos autores relacionam fenômenos lesivos com a sinalização purinérgica no sistema nervoso central. Neary e colaboradores (2003), submetendo astrócitos à injúria causada por estiramento, observaram a ativação da via das ERKs de forma dependente da ativação de receptores P2Y₁.

A expressão de receptores P2 pode ser controlada durante diversos tipos de trauma no sistema nervoso central. Por exemplo, um aumento na expressão de receptores P2X₂ e P2X₄ em neurônios e microglia presentes em culturas de fatias de hipocampo de rato submetidos a isquemia foi detectado (Cavaliere *et al.*, 2003). Já um aumento na expressão de receptores P2X₇ em astrócitos, microglia e neurônios de córtex cerebral de ratos parece contribuir para os mecanismos de morte celular causada por isquemia (Franke *et al.*, 2004) e receptores P2Y₁ são intensamente expressos no hipocampo de ratos submetidos à isquemia (Moran-Jimenez e Matute, 2000). Lesão cerebelar unilateral em ratos provoca um aumento na expressão de receptores P2X₁ e P2X₂ em células neuronais e gliais (Viscomi *et al.*, 2004), enquanto a axotomia do nervo facial em ratos adultos dispara a ativação de microglia, que se acumula em volta do nervo motor axotomizado como resultado da migração e proliferação celular associadas a um aumento na expressão de receptores P2Y₁₂ (Sasaki *et al.*, 2003).

Receptor	Lesão	Aumento da expressão de receptores P2Y em: (tipo celular)
P2Y ₁	Lesão Mecânica	Astrócitos Neurônios e Astrócitos
P2Y ₂	Lesão Mecânica	Astrócitos
P2Y ₄	Hipoglicemia	Neurônios Cerebelares
P2Y ₆	Hipoglicemia Lesão Mecânica	Astrócitos
P2Y ₁₁	-	-
P2Y ₁₂	Lesão Mecânica	Neurônios e Astrócitos
P2Y ₁₃	-	-
P2Y ₁₄	-	-

Tabela II: Modulação da expressão de receptores P2Y durante lesão no sistema nervoso central. Nesta tabela, são mostrados os subtipos de receptores, os tipos de lesão e as células onde o aumento de receptores foi observado. (adaptado de Bringmann *et al.*, 2003; Franke *et al.*, 2004 e Dale, 2008)

A resposta proliferativa em retinopatias está associada com um aumento funcional de receptores purinérgicos na glia de Müller. Um aumento nas correntes iônicas mediadas por receptores P2X₇ em humanos (Bringmann e Rachelbach, 2001) e a ativação de receptores P2Y associada a um aumento na resposta do cálcio em outras espécies (Iandiev *et al.*, 2006) foram descritos. Aumento na sinalização purinérgica, correspondente a um aumento de proliferação celular, em retinas submetidas previamente a lesão também foi observado (Bringmann *et al.*, 2003; Dale, 2008). Na retina de galinha, a degeneração retiniana promovida por luz provoca uma gliose de células de Müller seguida por um aumento na expressão de receptores P2Y₁ nestas células (Ward e Fletcher., 2009). A tabela II sintetiza algumas das características dos receptores P2Y durante fenômenos de lesão.

2 – Objetivos:

Tendo em vista que a sinalização celular mediada por ATP e por IGF-I na retina de galinha é capaz de promover diversos efeitos celulares, muitos deles ainda não totalmente compreendidos, nosso presente objetivo é caracterizar a relação entre estes receptores durante a proliferação de progenitores tardios da retina e durante a proliferação induzida por à lesão mecânica de culturas de células de retina com estágios mais avançados de diferenciação. Para isto pretendemos:

- 1- Estudar o envolvimento de receptores catalíticos, com ênfase em receptores de IGF-I e insulina, sobre a proliferação celular induzida por ADP;

- 2- Estudar a participação de inibidores de endocitose via clatrina sobre a proliferação celular, acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos, ativação da via das MAPK e AKT, e ativação de receptores para IGF-I e insulina, induzida por ADP.

- 3- Caracterizar o tipo celular que responde ao ADP com proliferação celular.

- 4- Estudar o efeito de ATP durante a lesão da monocamada de culturas de retinas com diferentes estágios de cultivo, analisando o crescimento celular e a proliferação celular.

3- Materiais e Métodos:

3.1- Materiais:

[³H]-timidina (5 Ci/mmol), [³H]-myo-inositol (22,2 Ci/mmol) e BrdU foram adquiridos da GE Healthcare ou Perkin-Elmer; ATP, ADP, PPADS, suramina, Adenosina 5'-difosfatase / Adenosina 5'-trifosfatase (apirase), I-OME AG-538, DAPI, antisoro anti-P₂Y₁, glutamina, monodansil-cadaverina (MDC), penicilina-G, sulfato de estreptomicina, Coomassie blue R250 da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); clorpromazina da Aventis; O antisoro anti-2M6 foi gentilmente cedido por Dr. Schlosshauer, Tübingen, Alemanha; Antisoros anti-p-ERK, anti-p-IGF/Insulina (receptor), anti-p-AKT e anti-ERK total da Cell Signaling Inc.; Antisoro anti-p-IRS, antisoros secundários, BME, DMEM, MEM, da Invitrogen Inc.; Tripsina da Worthington Biochemical (Freehold, NJ, USA). IGF-I da PeproTech (Rocky Hill, USA); K-252a, PP1e brefeldina A da Biomol (Plymouth Meeting, USA); RB-2 da RBI.

3.2- Culturas de retina:

Retinas de embrião de galinha em diferentes fases do desenvolvimento (E7 e E8) foram dissecadas em ambiente estéril, em solução salina sem cálcio e magnésio (CMF). As retinas foram incubadas com tripsina 0.1 % por 20 min, a 37°C. A solução de tripsina foi retirada com auxílio de pipetas *Pasteur* e as células foram mecanicamente dissociadas em 5mL de meio MEM, suplementados ou não com 5 % de soro fetal bovino, antibióticos (0,1 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina) e glutamina 2 mM. As células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro ou sobre lamínulas em alguns casos, na densidade de aproximadamente 3x10⁶ células por placa para os ensaios de incorporação de [³H]-timidina, 5x10⁶ para os ensaios de

imunofluorescência e 10×10^6 células para os ensaios de “western blotting” e acúmulo de [^3H]-fosfoinosítídeos.

3.3- Lesão mecânica da monocamada de culturas de retina e determinação do crescimento celular:

Cultura de células de retinas de embriões com 8 dias (E8), cultivadas na densidade de 10^7 células/placa por 1 (E8C1) ou 7 dias (E8C7), foram lesadas com o auxílio de ponteira fina para micropipetas de 10 μL , marca Axygen, sendo a monocamada celular riscada com a ponteira em posição oblíqua. Um risco se estendendo por todo diâmetro da placa foi realizado em cada cultura, gerando uma região desprovida de células. Em seguida, as culturas foram lavadas duas vezes com meio MEM sem soro e incubadas com meio MEM contendo 5% de soro fetal bovino e expostas à apirase, RB-2, suramina ou PPADS durante 3 dias. A cada 24 horas de cultivo área de lesão foi fotografada e a área desprovida de células determinada utilizando o programa Scion Image, previamente calibrado para 1.06 pixel/ μm . As áreas totais das culturas fotografadas com objetivas de 10 x e 20 x foram de 0,325 mm^2 e 0,08125 mm^2 , respectivamente. Após este procedimento, a área descoberta pela lesão foi calculada e o crescimento celular estimado pela diminuição na área livre de células em cada etapa do experimento. A proliferação celular nas áreas inicialmente desprovidas de células foi quantificada por imunocitoquímica para BrdU. O número de células BrdU⁺ em culturas lesadas ou não foi estimado e a proliferação celular expressa como a fração de células marcadas com DAPI que eram BrdU⁺. Para realizar esta quantificação, utilizamos uma objetiva de 20x, com a qual realizamos um grupo de imagens mostrando ~100 μm da área de lesão, sendo o início das imagens as regiões desprovidas de neurônios. Para a obtenção da quantidade de células BrdU⁺ ou marcadas

com DAPI fora da área de lesão, obtivemos outro grupo de imagens da cultura distantes ~ 5 mm da área de lesão.

3.4- Acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos:

Cultura contendo 1×10^7 células de retina obtidas de embriões de galinha com 7 dias (E7) foram incubadas com 1 μ Ci de [³H]-myo-inositol durante 1,5 h, à 37°C, em 1 mL de meio MEM, sem soro. Em seguida, LiCl a uma concentração final de 10 mM foi adicionado às culturas e as células incubadas por mais 1h à 37°C. As células foram pré-incubadas com os inibidores MDC 300 μ M, CPZ 10 μ M e I-OME AG-538 10 μ M durante 10 minutos e estimuladas durante 1h à 37°C com ATP e ADP, nas concentrações finais de 100 μ M e 500 μ M, respectivamente. O estímulo foi interrompido com a lavagem das culturas com 2 mL de solução de Hank's completo tamponada com HEPES 20 mM (pH 7.4) por 3x, seguido pela adição de 2.5 mL de TCA (ácido tricloroacético) 15%. Os materiais das placas foram então transferidos para tubos de centrífuga e congelados "overnight" à -20°C. Após descongelamento, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 25 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos de vidro, lavado por três vezes com 2,5 mL de éter etílico e neutralizados com 2,5 mL de solução de Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, contendo 5 mM de EDTA. A solução final foi transferida para colunas de troca iônica contendo 1mL de resina Dowex X-8, previamente equilibrada com ácido fórmico 1 M. As frações foram sequencialmente eluídas com (1) 5 mL de água deionizada, (2) 5 mL de solução tetraborato de sódio 5 mM / formiato de amônio 60 mM e (3) 4 mL de solução ácido fórmico 0,1 mM / formiato de amônio 1 M. Esta seqüência de eluição remove [³H]-inositol (1), [³H]-glicerofosfoinositol (2) e derivados fosforilados de [³H]-inositol (3). A radioatividade foi determinada por cintilação líquida.

O precipitado obtido na centrifugação das amostras foi dissolvido em NaOH 1 N e o teor protéico dosado utilizando-se o método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados obtidos a partir da determinação da radioatividade foram normalizados para CPM/mg de proteína.

3.5- Incorporação de [³H]-timidina:

Culturas de retina em E7C1 (7 dias de incubação, 1 dia de cultura) com 3×10^6 células, tratadas ou não durante 24h à 37°C, foram incubadas com [³H]-timidina (0,5 µCi) por 1h, à 37°C. As culturas foram então lavadas 3 vezes com 2 mL de BME tamponado com HEPES 25 mM, pH 7.4. As células foram dissolvidas com 0.2 mL de NaOH 0.4 N durante 15 min à 4°C, raspadas e transferidas para tubos de ensaio, lavando três vezes as placas com 1 mL de água deionizada gelada. Após a adição de TCA 50%, as amostras foram então incubadas à 4°C, durante 30 min. As amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro do tipo Whatmann GF/B e lavadas 3 vezes com 2 mL de TCA 5 % gelado. Os filtros foram secos à 100°C por 1h e a radioatividade determinada por cintilação líquida.

3.6- Ensaio de Viabilidade Celular:

A morte celular foi estudada através do ensaio colorimétrico de viabilidade celular descrito por Mosmann (1983). Neste método, o reagente MTT (brometo de 3-4,5-Dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol: tetrazol) é reduzido à formazan púrpura pelas mitocôndrias de células vivas, uma vez que esta reação acontece somente quando a enzima redutase mitocondrial está ativa. Deste modo, a conversão do reagente MTT à formazan é diretamente relacionada ao número de células vivas e a efetividade do agente em teste para causar a morte das células pode ser medido através de uma curva

dose resposta. As células em E7C1, tratadas ou não com ADP 500 μM ; IOME 10 μM ; MDC 3 e 30 μM , CPZ 1, 10 e 100 μM , por 24h à 37°C, foram incubadas com MTT na concentração de 1.5 mg/mL. Após 4 horas de incubação, as culturas foram lavadas com solução salina completa (Hank's), à 37°C e a camada de células contendo o formazan insolúvel dissolvida numa mistura de HCl 12 N e álcool isopropílico absoluto (6:1000). Após este procedimento, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 650 nm.

3.7- Imunocitoquímica para BrdU e 2M6 em culturas de retinas que sofreram lesão de monocamada celular:

Para a detecção de BrdU células de retina obtidas de E8 foram semeadas sobre lamínulas na densidade de 10^7 células. Após 7 dias de cultivo, as culturas foram lesadas, cultivadas por mais dois dias sob tratamento de RB-2 40 μM ou não e expostas a solução de BrdU 100 μM por 4 h. As células foram então fixadas com paraformaldeído 4 % em tampão fosfato 0,16 M por 30 minutos, à temperatura de ambiente e lavadas 2 vezes com PBS pH 7.6 por 5 min. Em seguida, as células foram permeabilizadas em PBS, pH 7.6, contendo Triton 1% durante 30 min. Após este período de permeabilização, as células foram incubadas em HCL 2 N por mais 10 min, lavadas e incubadas em tampão borato, pH 8.0, por 10 min, seguido por 3 lavagens de 5 min com PBS pH 7.6.

A solução de bloqueio composta de PBS pH 7.6 acrescido de Triton 1%, NGS 3% e BSA 3%, foi aplicada durante 1.5 horas, à temperatura ambiente. Após este procedimento, as culturas foram incubadas com antisoro primário monoclonal de camundongo anti-BrdU, na diluição de 1:500 ou antisoro primário monoclonal de camundongo contra 2M6 durante a noite, à temperatura ambiente. Em seguida, as

células foram lavadas 3 vezes por cinco min com PBS pH 7.6 e incubadas por mais 4 horas com antisoro secundário anti-camundongo fluorescente Alexa 568 (1:200) na ausência de luz. Antes do fechamento das lamínulas sobre as lâminas, as células foram lavadas 2x com PBS pH 7.6, expostas ao marcador nuclear DAPI (1:1000) durante 20 segundos e lavadas 2x novamente com PBS pH 7.6. As lamínulas foram montadas com solução de n-propilgalato e analisadas por microscopia de fluorescência, utilizando microscópio Nikon Eclipse TE2000-U.

3.8- Imunocitoquímica para P₂Y₁ e 2M6 em cultura de retina:

Células de retina obtidas de E7 foram semeadas sobre lamínulas, sem poliornitina, e cultivadas durante 1 dia na densidade de 5×10^6 células. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato, por 5 min à temperatura de ambiente e lavadas 2 vezes com PBS pH 7.6 por 5 min. A solução de bloqueio composta de PBS pH 7.6, Triton 0.1% e BSA 1% foi aplicada durante 1.5 horas à temperatura ambiente sob agitação leve. As células foram incubadas durante 24h com anticorpo monoclonal anti-P₂Y₁ (1:75 - coelho) e 2M6 (1:500 - camundongo). As células foram então lavadas 3x por 5 min com PBS pH 7.6 e incubadas por mais 4 horas com antisoro secundário anti-camundongo fluorescente-Alexa 568 (1:200) e anti-coelho fluorescente-Alexa 488 (1:200) na ausência de luz. Antes do fechamento das lamínulas sobre as lâminas, as células foram lavadas com PBS pH 7.6 (2x), expostas ao marcador nuclear DAPI (1:1000) durante 20 segundos e lavadas novamente com PBS pH 7.6 (2x). As lamínulas foram montadas com solução de n-propilgalato e analisadas por microscopia de fluorescência.

3.9- Western Blotting:

Retinas de embriões em E7 foram dissecadas e cultivadas por 1 ou 2 dias. Após este período, o meio de cultura MEM contendo soro fetal bovino 5 % foi substituído por meio MEM livre de soro e as células cultivadas por mais 1 h. Em seguida, as células foram pré-incubadas com I-OME AG-538 10 μ M, MDC 30 e 300 μ M ou CPZ 10 μ M por 25 min e estimuladas com ADP 500 μ M ou IGF-I 100 ng/mL por mais 5 min. O estímulo foi interrompido por lise celular utilizando 70 μ L de tampão de amostra Laemmli. As amostras foram então fervidas por 15 min e centrifugadas por 5 min à 15.000 rpm utilizando-se centrífuga Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e o conteúdo protéico determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. A curva padrão foi normalizada adicionando-se a mesma quantidade de tampão de amostra Laemmli presente nas amostras de proteínas a serem dosadas: 2 μ L por tubo. Após a adição de azul de bromofenol, amostras contendo 50 μ g de proteína foram submetidas à eletroforese em gel SDS/PAGE 9% e transferidas para membranas de PVDF. A ativação do receptor de IGF-I/Insulina e a fosforilação do IRS-1, da ERK e da AKT foram determinados utilizando-se anticorpo monoclonal de coelho para o receptor de IGF/insulina na sua forma fosforilada (1:2000), anticorpo monoclonal de coelho para o p-IRS (1:2000), anticorpo monoclonal de coelho para pAKT (1:4000) e anticorpo monoclonal de camundongo para fosfo-ERK (1:1000) seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase anti-camundongo (1:1000) ou anti-coelho (1:2000). A visualização da reação enzimática foi realizada através da utilização do reagente ECL Plus (GE Healthcare) e exposição em filme fotográfico.

3.10- Análises estatísticas:

Os dados foram quantificados por análise de variância ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5*. Em todos os gráficos está representada a média e o erro padrão da média.

4- Resultados:

4.1- Proliferação celular induzida por ADP depende da participação de receptores tirosina cinase.

A participação conjunta de receptores para nucleotídeos e fatores tróficos em fenômenos proliferativos na retina tem sido demonstrada (Milenkovic *et al.*, 2003). Nesta tese investigamos a participação do sistema purinérgico associado a fatores tróficos sobre a proliferação celular na retina de galinha em desenvolvimento. Inicialmente, estudamos o efeito de diversos inibidores para receptores tirosina cinases sobre a proliferação celular induzida por ADP ou ATP. Retinas em E7 foram dissecadas, dissociadas e semeadas na densidade de 3×10^6 células por placa. As células foram tratadas após um dia de cultivo com os inibidores K252a 50 nM (inibidor para receptores das neurofinas NGF, BDNF e NT-3), Genisteína 5, 10 e 25 μ M (inibidor geral de tirosina cinases) e IOME AG-538 0.1, 1 e 10 μ M (inibidor para receptores de IGF-I e Insulina) na presença ou não de ADP 500 μ M por 24 horas (Figuras 6A e 6C) ou ATP 100 μ M (Figura 6B) e processadas para a incorporação de [3 H]-timidina. Em todas as situações, a proliferação celular induzida pelo nucleotídeo foi completamente bloqueada por estes inibidores, sugerindo que o efeito proliferativo do ADP dependa da ativação destes receptores nesta fase do desenvolvimento. Além disto, IOME AG-538 10 μ M também promoveu um efeito inibitório significativo de ~ 71 % sobre a proliferação basal (Figura 6C). Uma justificativa para o efeito deste composto sobre a proliferação basal pode ser a indução de morte celular promovida pelo tratamento com a droga. Para verificar esta possibilidade, culturas de células de retina em E7C1 foram incubadas com ADP 500 μ M e IOME AG-538 10 μ M durante 24 horas e submetidas ao ensaio colorimétrico para viabilidade celular descrito por Mosmann (1983) (Figura 6D).

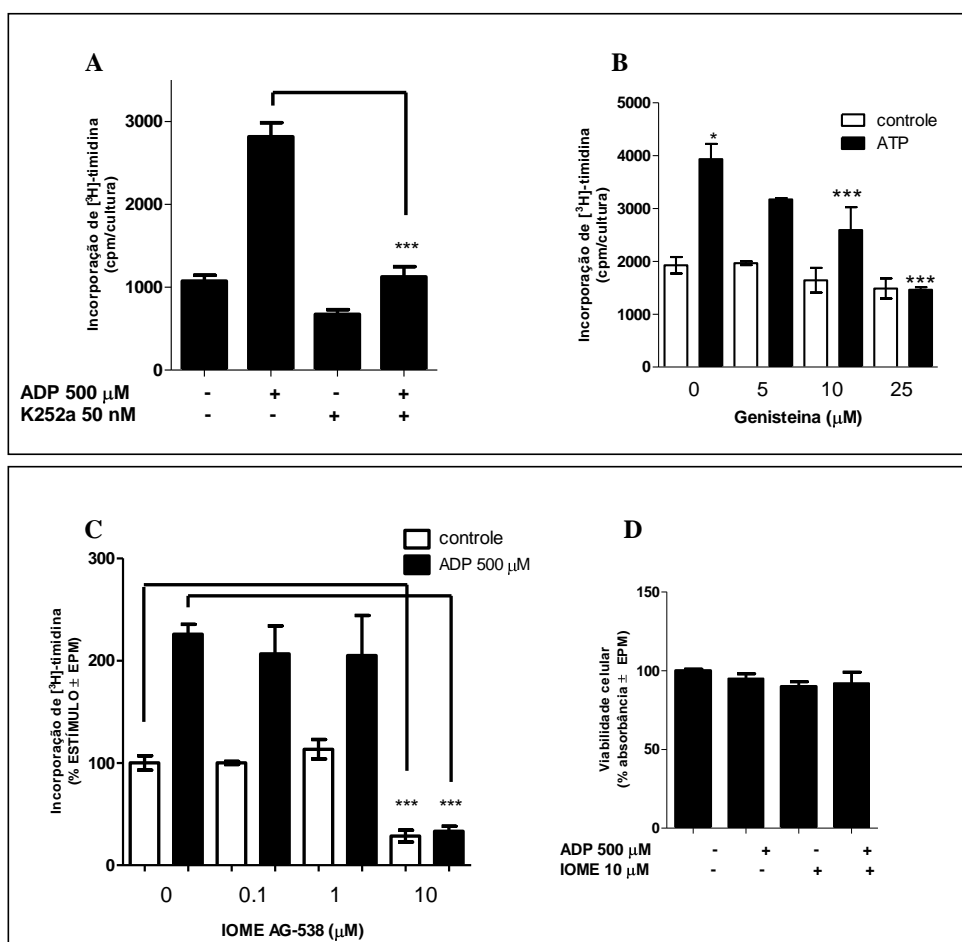


Figura 6: Efeito de inibidores de tirosina cinases sobre a proliferação celular induzida por ADP e sobre a viabilidade celular. Incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina induzida por ADP 500 μM em culturas de células de retina em E7C2 tratadas com K252a 50nM (A), Genisteína 5, 10 e 25 μM (B) e IOME AG-538 0.1, 1 e 10 μM (C) durante 24 horas. (D) Ensaio de viabilidade celular em culturas de células de retina em E7C2 tratadas com ADP 500 μM e IOME AG-538 10 μM . Os gráficos em A e B representam a média em cpm/cultura de 4 e 2 experimentos independentes realizados em duplicata, respectivamente. O gráfico C representa a média percentual de estímulo EPM de 4 experimentos independentes realizados em duplicata. O gráfico D representa a média percentual da absorbância EPM de 2 experimentos realizados em duplicata. * $p < 0.001$ comparado ao controle; *** $p < 0.001$ comparados com ADP, ATP ou com o controle em C.

Nenhuma redução significativa na viabilidade celular foi observada nas culturas tratadas com IOME AG-538 (média percentual de absorvância em relação ao controle \pm EPM: controle: 100 ± 1 ; ADP: 95 ± 3 ; IOME: 90 ± 3 ; IOME + ADP: 90 ± 7 ; $n = 2$), reforçando a idéia de que o efeito inibitório deste composto sobre a incorporação de [³H]-timidina ocorra por mecanismos que interferem no controle de proliferação e não de viabilidade celular da cultura como um todo.

Calvaruso e colaboradores (1996) demonstraram que o IGF-1 é um fator abundante na retina embrionária de pinto. Além disto, estes autores mostraram que este fator é capaz de aumentar cerca de 20 - 45% a incorporação de [³H]-timidina em explantes de retina cultivados por 2 dias em meio livre de soro. No presente trabalho, resolvemos investigar uma possível associação entre os efeitos proliferativos do ADP e a ativação de receptores de IGF-I/insulina. Para isto, células de retina em E7C1 foram tratadas com IGF-I 100ng/mL e ADP 500 μ M durante 24 h na presença ou ausência de soro fetal bovino. Como observado na figura 7, não foi possível detectar proliferação celular induzida por IGF-I tanto nas culturas mantidas em meio livre de soro (média percentual de estímulo em relação ao controle \pm EPM: controle: 100 ± 10 ; ADP: 276 ± 5 ; IGF-I: 91 ± 13 ; IGF-I + ADP: 242 ± 10 ; $n = 4$), nem nas culturas acrescidas de 5% de soro fetal bovino (média percentual de estímulo em relação ao controle \pm EPM: controle: 100 ± 6 ; ADP: 210 ± 4 ; IGF-I: 80 ± 7 ; IGF-I + ADP: 234 ± 7). Estes dados em conjunto sugerem que o tratamento com IGF sozinho por 24 h não é capaz de promover um aumento na incorporação de [³H]-timidina nas culturas.

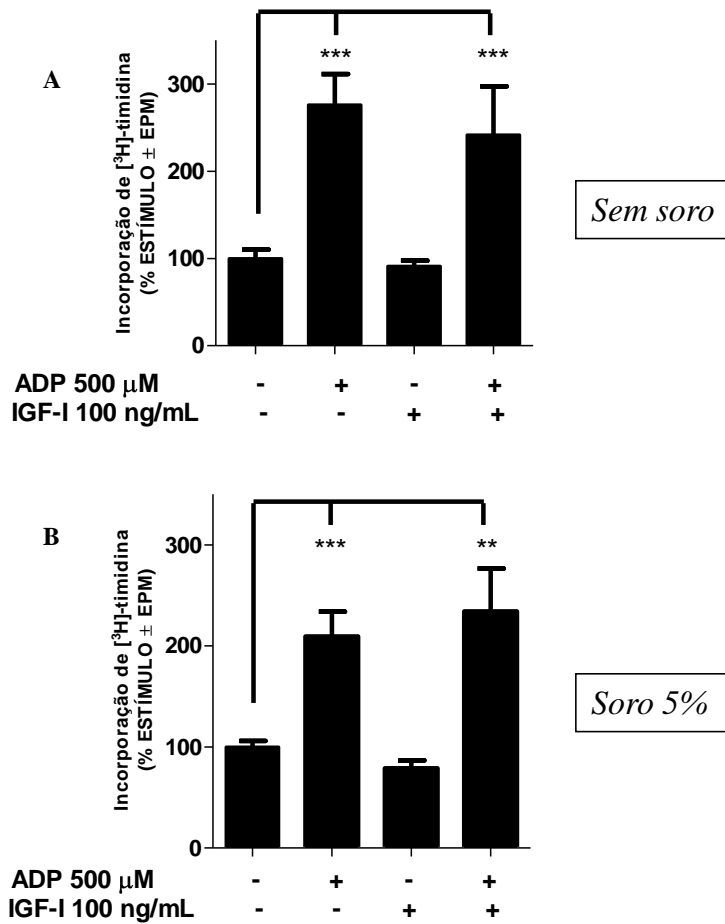


Figura 7: Efeito de IGF-I sobre a proliferação celular induzida por ADP na presença e ausência de soro fetal bovino. Incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina induzida por ADP 500 μM em culturas de células de retina em E7C2 tratadas com IGF-I 100 ng/mL na ausência de soro (**A**) e na presença de soro (**B**) durante 24 horas. Os dados representam a média percentual de estímulo \pm EPM em relação ao controle de 4 e 3 (**A** e **B** respectivamente) experimentos independentes realizados em duplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados ao controle.

A proliferação induzida por ATP de progenitores tardios na retina embrionária de galinha é dependente da ativação da fosfolipase C, PKC e ERKs (Sanches *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2007), assim como da ativação da via da PI3K/AKT (Ornelas, 2007). Por outro lado, inúmeras evidências mostraram que a estimulação do receptor de IGF-I pode desencadear a ativação de diversas proteínas intracelulares, incluindo a via das ERKs e da PI3K/AKT (Cobb e Goldsmith, 1995; Otaegi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007). Com o objetivo de caracterizar se este fator era capaz de ativar algumas destas vias de transdução de sinal em nossas culturas, 10^7 células de retina de galinha de E7 foram semeadas em placas de Petri com 35 mm de diâmetro. Após 24 h de cultivo, as células foram estimuladas com IGF-I 100 ng/mL durante 5, 30 e 60 min e seus extratos protéicos analisados por western blotting (WB) para detecção da fosforilação do receptor de IGF-I/Insulina, do fator responsivo à insulina IRS-I e da AKT. Nas figuras 8A e 8D, pode ser observado um aumento significativo e sustentado de ~ 2.5 x na fosforilação do receptor para IGF-I/Insulina em comparação com os níveis basais (média percentual de p-IGF-I em relação a ERK total \pm EPM: controle: $49 \pm 0,7$; IGF-I 5': $119 \pm 0,8$; IGF-I 30': 126 ± 11 ; IGF-I 60': 140 ± 32 ; n = 02). Já nas figuras 8A e 8E, pode ser observado um aumento significativo de ~ 13 x na fosforilação do IRS-I em relação ao basal (média percentual de p-IRS-I em relação a ERK total \pm EPM: controle: 6 ± 1 ; IGF-I 5': 80 ± 9 ; IGF-I 30': 84 ± 8 ; IGF-I 60': 50 ± 12 ; n = 02), um aumento que permaneceu sustentado durante os primeiros 30 min de estímulo, diminuindo cerca de 38 % após 60 min de estimulação. Nas figuras 8B e 8F podemos observar um aumento de ~ 2.3 x na fosforilação da AKT em relação aos níveis basais (média percentual de p-AKT em relação a AKT total \pm EPM: controle: 49 ± 14 ; IGF-I 5': 114 ± 24 ; IGF-I 30': 113 ± 35 ; IGF-I 60': 144 ± 52 . n = 02). O curso temporal de fosforilação da AKT foi

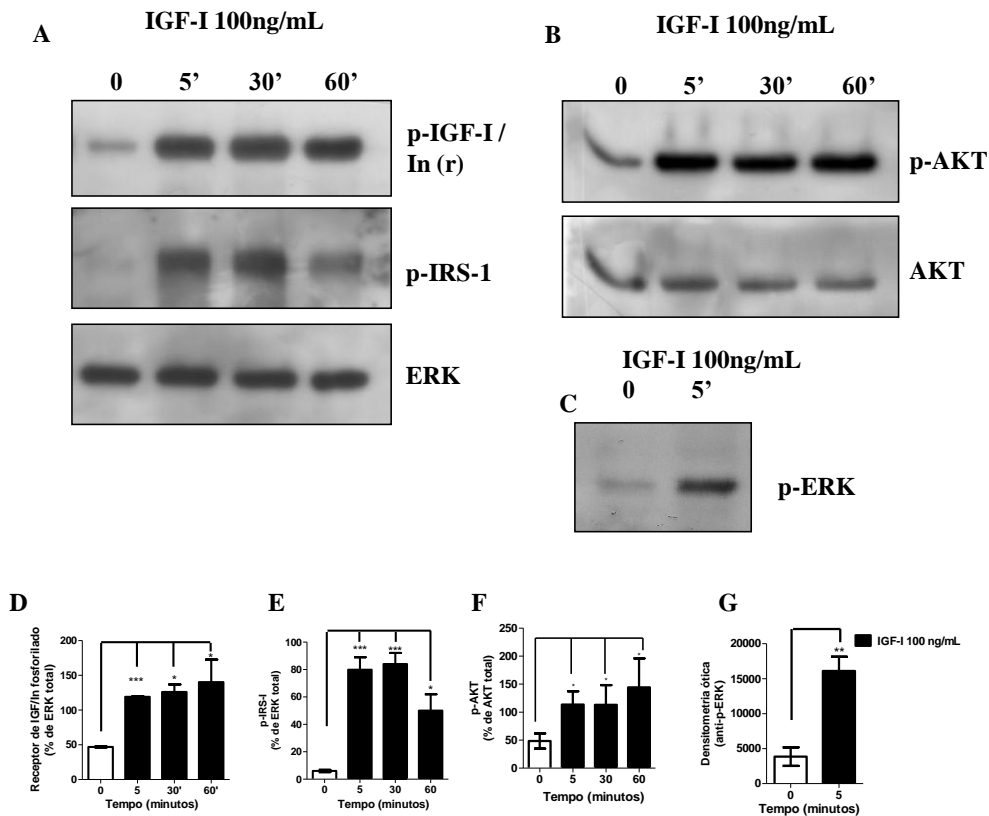


Figura 8: Efeito de IGF-I sobre a fosforilação do receptor para IGF-I/Insulina, IRS-1, ERK e AKT. Culturas de retina contendo 10^7 células por placa foram tratadas com IGF-I 100 ng/mL durante 5, 30 e 60 minutos. **A)** Fotomicrografias revelando a marcação com anticorpos monoclonais para o receptor de IGF-I/Insulina fosforilado (1:2000), anti-p-IRS-1 (1:2000) e anti-ERK (1:1000). **B)** Fotomicrografias revelando a marcação com anticorpos monoclonais para p-AKT (1:2000) e anti-AKT (1:2000). **C)** Fotomicrografias revelando a marcação com anticorpo monoclonal para p-ERK (1:1000). Os gráficos representam a média percentual em densidade ótica em relação a ERK (**D**, **E**) e AKT total (**F**) de 2 experimentos em duplicata. O gráfico **G** representa a média em densidade ótica de 2 experimentos em duplicata realizados separadamente. * $p < 0.05$ comparado ao controle (**D**) e IGF-I 100 ng/mL no tempo de 5 min (**E**). ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparados ao controle.

semelhante ao observado para a fosforilação do receptor de IGF-I, permanecendo fosforilada durante os 60 min de estímulo.

A ativação da via das MAP cinases por IGF-I também foi estudada. Culturas de células de retina em E7 foram estimuladas com IGF-I 100 ng/mL durante 5 min e a fosforilação da ERK estimada por WB, utilizando um anticorpo monoclonal anti-p-ERK (1:1000). Nas figuras 8C e 8G podemos observar que o IGF-I foi capaz de induzir um aumento significativo de ~ 4.2 x na fosforilação da ERK em comparação com os níveis basais (média em densidade ótica de p-ERK \pm EPM: controle: 3860 \pm 1333; IGF-I: 16100 \pm 2036. n = 2).

Com o objetivo de correlacionar a ativação das vias das MAP cinases e da PI3K/AKT induzida por nucleotídeos observada anteriormente por nosso grupo (Nunes *et al.*, 2007; Ornelas, 2007) e a ativação destas vias por IGF-I, resolvemos investigar o efeito de ATP sobre a fosforilação do receptor de IGF-I/In, sobre a fosforilação das ERKs e da AKT. Para isto, 10⁷ células de retina de galinha em E7 foram semeadas e após 24 h de cultivo, foram estimuladas com ATP 100 μ M durante 5, 30 e 60 min. Os homogeneizados protéicos foram recolhidos e analisados por WB, utilizando anticorpos para detecção de p-IGF-I/In (r), p-ERK e p-AKT. Nas figuras 9A e 9B, podemos observar que ATP induziu um aumento significativo de ~ 2.1 x na fosforilação do receptor para IGF-I/In (média em densidade ótica de p-IGF-I/In (r) \pm EPM: controle: 9793 \pm 2228; ATP 5': 20310 \pm 2178; ATP 30': 21110 \pm 1697; ATP 60': 21300 \pm 2566), permanecendo sustentado durante todos os intervalos de tempo estudados. Nestes homogeneizados, analisamos também a fosforilação da ERK e da AKT (figuras 9A, 9C e 9D). Como esperado, ATP induziu um aumento significativo de ~ 6.3 x na fosforilação da ERK (média em densidade ótica de p-ERK \pm EPM: controle: 3400 \pm 540.6; ATP 5': 21390 \pm 2951; ATP 30': 5792 \pm 886.1; ATP 60': 7982 \pm 1543; n=2) e ~

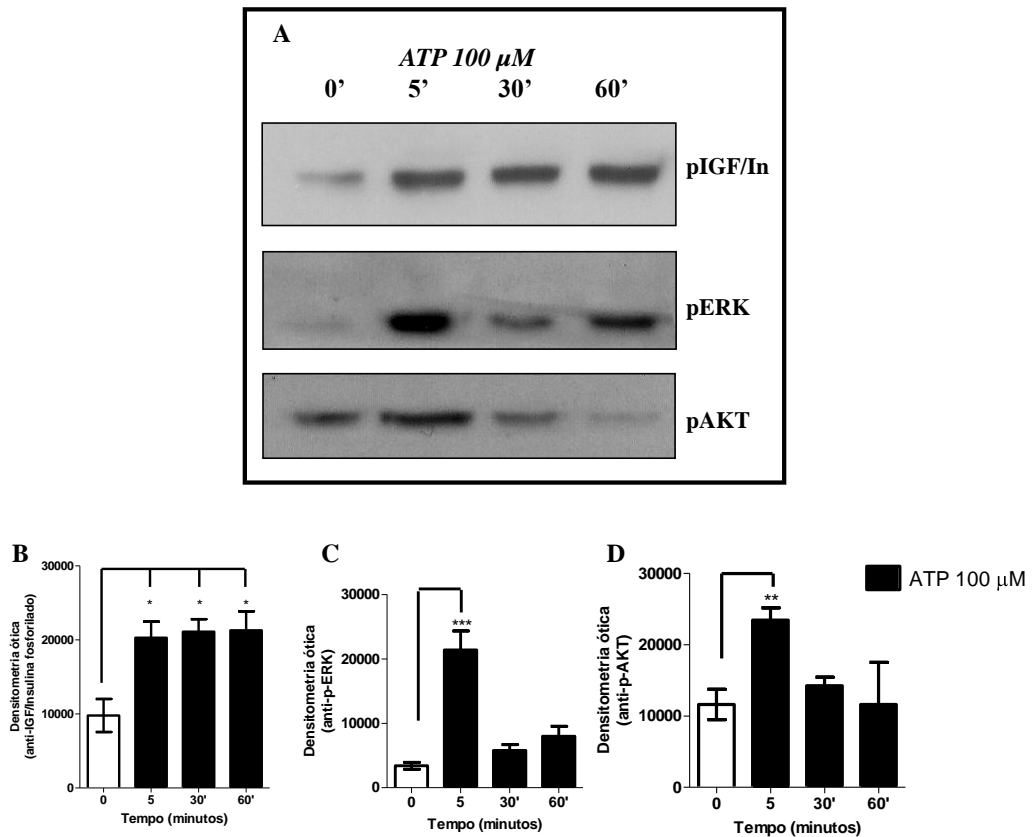


Figura 9: Efeito de ATP sobre a fosforilação do receptor para IGF-I, ERK e AKT. Culturas de retina contendo 10^7 células foram tratadas com ATP 500 μ M durante 5, 30 e 60 minutos. **A)** Fotomicrografias da marcação com anticorpos monoclonais para o receptor de IGF-I/Insulina fosforilado (1:2000), anti-p-ERK (1:1000) e anti-p-AKT. Os gráficos em **B**, **C** e **D** representam a média em densidade ótica de 2 experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparados ao controle.

2.0 x na fosforilação da AKT (média em densidade ótica de p-AKT \pm EPM: controle: 11620 \pm 2123; ATP 5': 23450 \pm 1714; ATP 30': 14250 \pm 1184; ATP 60': 11610 \pm 5916; n=2).

A proliferação de progenitores tardios induzida por ATP tanto na retina de embrião de pinto quanto na retina pós-natal de camundongos envolve a ativação de receptores para nucleotídeos do tipo P2Y₁ (Sanches, *et al.*, 2002; Nunes, *et al.*, 2007; Sholl-Franco *et al.*, 2010), sendo o ADP o nucleotídeo de maior afinidade por este receptor. Com base nisto, resolvemos investigar o efeito do ADP sobre as vias das ERKs e da PI3K/AKT em nossas culturas, assim como investigar se este nucleotídeo era capaz de induzir a fosforilação do receptor de IGF-I/Insulina como observado na incubação das culturas com ATP. Para isto, inicialmente as culturas de células de retina em E7C1 foram estimuladas com ADP 500 μ M durante 5, 30 e 60 min e os homogeneizados analisados por WB para a detecção de p-ERK e p-AKT. Na figura 10, podemos observar que células estimuladas com ADP 500 μ M durante 5, 30 e 60 minutos apresentaram um aumento de \sim 3.1 x na fosforilação da ERK (média percentual de p-ERK em relação a ERK total \pm EPM: controle: 16 \pm 3.5; ADP 5': 51 \pm 12; ADP 30': 19 \pm 4; ADP 60': 2.6 \pm 0.8; n = 2) e um aumento de \sim 2.3 x na fosforilação da AKT (média percentual de p-AKT em relação a ERK total \pm EPM: controle: 23 \pm 4; ADP 5': 54 \pm 10; ADP 30': 28 \pm 3; ADP 60': 19 \pm 3.5. n = 2). Para ambas as enzimas, o efeito do ADP foi transitório e semelhante ao efeito observado com ATP, sendo possível a detecção do estímulo somente no período de 5 min.

Com objetivo de relacionar a ativação de receptores P2Y₁, estimulados preferencialmente por ADP, com a sinalização mediada por IGF-I em nossas culturas, investigamos o efeito de IOME-AG538, um inibidor de receptores de IGF-I, sobre a fosforilação do receptor para IGF-I/Insulina, da ERK e da AKT induzida por ADP em

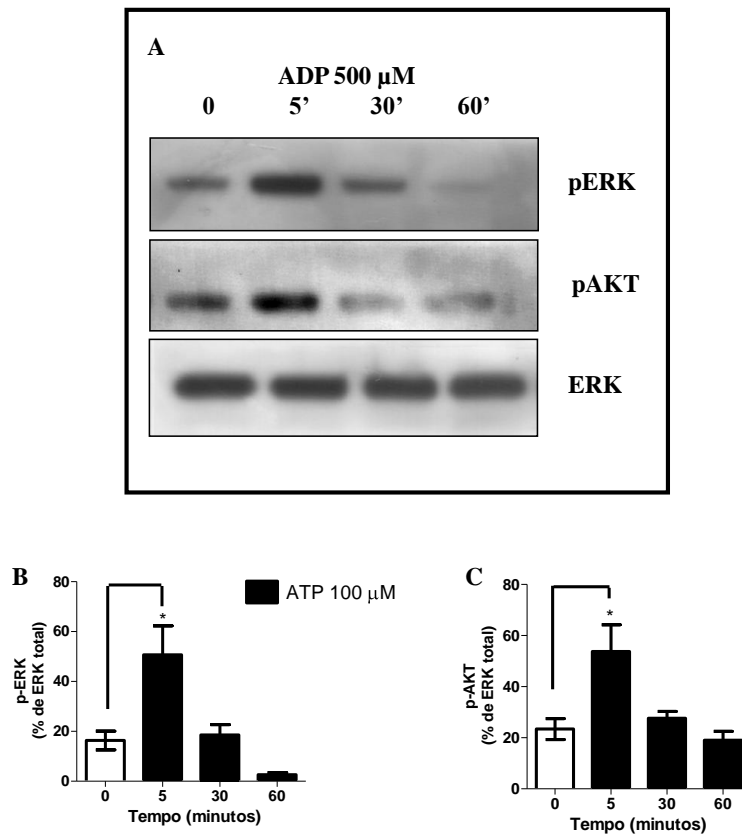


Figura 10: Efeito de ADP sobre a fosforilação da ERK e AKT durante intervalos de tempo crescentes. Culturas de retina contendo 10^7 células por placa foram tratadas com ADP 500 μ M durante 5, 30 e 60 minutos. **A)** Fotomicrografias da marcação com anticorpos monoclonais para p-ERK (1:1000), p-AKT (1:2000) e ERK total (1:2000). Os gráficos **B** e **C** representam a média em densidade ótica de 2 experimentos. * $p < 0.05$ comparados ao controle.

nossas preparações. Para isto, culturas de retina foram pré-incubadas com IOME AG-538 10 μM durante 25 min e estimuladas com ADP 500 μM por mais 5 min. Em seguida, as culturas foram submetidas ao ensaio de WB para a detecção destas proteínas. Nas figuras 11A e 11B, podemos observar que o tratamento com ADP promoveu um aumento de ~ 1.85 x na fosforilação do receptor para IGF-I/Insulina, um efeito que foi inibido pelo antagonista IOME-AG-538 (média percentual p-IGF-I/In (r) em relação a ERK total \pm EPM: controle: 60 ± 7 ; ADP: 111 ± 11 ; IOME: 59 ± 7 ; IOME + ADP: 72 ± 7 ; n = 2). Além disto, tanto a fosforilação da AKT quanto da ERK foram inibidas pelo antagonista do receptor para IGF-I/Insulina (figura 11A, 11C e 11D). A adição de IOME AG-538 10 μM foi eficaz em diminuir consideravelmente a fosforilação, induzida por ADP, da AKT (média percentual de p-AKT em relação a ERK total \pm EPM: controle: 27 ± 3.6 ; ADP: 60 ± 8.5 ; IOME: $11,5 \pm 0.3$; IOME + ADP: 28 ± 3 ; n = 2) e da ERK (média percentual de p-ERK em relação a AKT total \pm EPM: controle: 43.5 ± 7.5 ; ADP: 167.5 ± 6.5 ; IOME: 47.5 ± 7.5 ; IOME + ADP: 57.5 ± 0.5 ; n = 2). Estes dados sugerem que receptores de IGF-I/Insulina estejam envolvidos na ativação da via das MAP cinases e da PI3K/AKT induzida por ADP em nossas culturas. Sabendo que a ativação de receptores P2Y₁ (França *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007) e receptores para IGF-I (Guse *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 2005) promovem a ativação da fosfolipase C (PLC) e a consequente formação de IP₃, resolvemos caracterizar o efeito de I-OME AG-538 sobre o acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos induzido por ADP. Para isto, culturas de E7C2 contendo 10⁷ células foram pré-incubadas com I-OME-AG 538 nas concentrações de 10, 50 e 100 μM por 10 min e estimuladas com ADP 500 μM por 1 hora. Em seguida, as células foram submetidas ao ensaio de acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos. Em culturas tratadas com ADP 500 μM por 1h, um aumento na formação de [³H]-fosfoinosítídeos de ~ 2.9 x em relação ao controle foi observado

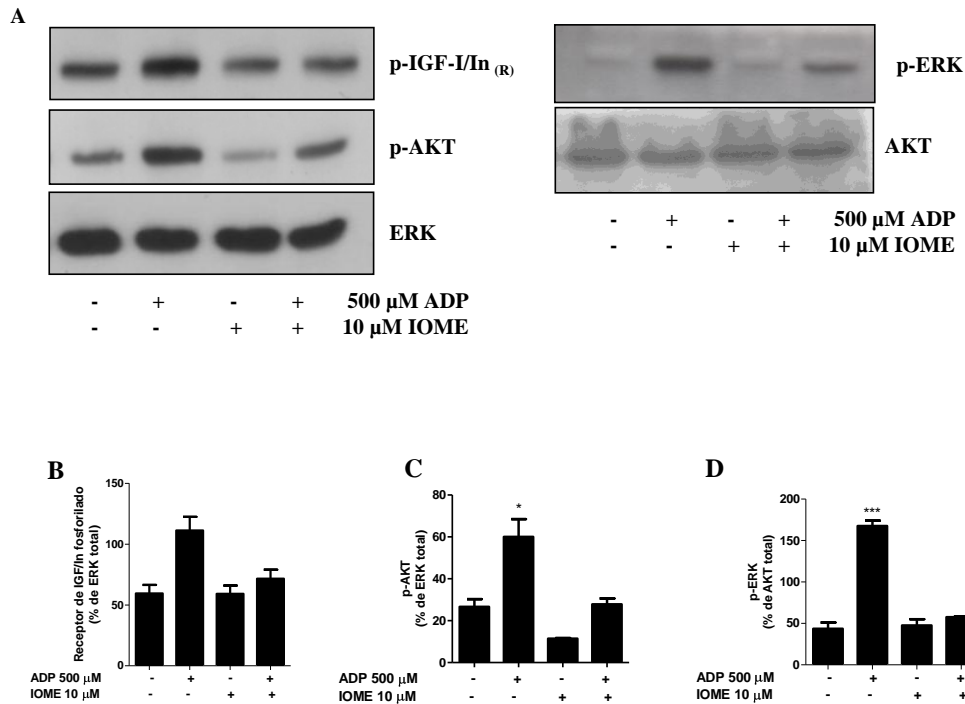


Figura 11: Efeito de IOME AG-538 sobre a fosforilação do receptor para IGF-I, ERK e AKT induzida por ADP. Culturas de retina contendo 10^7 células foram pré incubadas com IOME AG-538 $10 \mu\text{M}$ durante 25 min. e estimuladas com ADP $500 \mu\text{M}$ durante 5 min. **A)** Fotomicrografias da marcação com anticorpos monoclonais para o receptor de IGF-I/Insulina fosforilado (1:2000), p-AKT (1:2000), p-ERK (1:1000), ERK total (1:2000) e AKT total (1:2000). Os gráficos em **B**, **C** e **D** representam a média em densidade ótica em relação a ERK e a AKT total de 2 experimentos realizados em duplicata. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ comparados ao controle.

(figura 12). O tratamento com IOME AG-538 nas concentrações de 10, 50 e 100 μM reduziu o acúmulo de [^3H]-fosfoinosítídeos induzida por ADP em $\sim 21, 36$ e 38% respectivamente (média em cpm/mg de proteína \pm EPM: controle: 531 ± 25.5 ; ADP: 1549 ± 32 ; IOME 10 μM + ADP: 1231 ± 117 ; IOME 50 μM + ADP: 987 ± 113 ; IOME 100 μM + ADP: 969 ± 39). Estes dados sugerem que assim como a ativação da ERK e da AKT induzida por ADP, a formação de derivados fosforilados de inositol dependente deste nucleotídeo seja mediado, pelo menos parcialmente, pela ativação de receptores de IGF-I em culturas de células de embrião de pinto.

Para explicar a participação de receptores de IGF-I na proliferação celular induzida por ADP em nossas culturas, diversos mecanismos celulares ou moléculas podem ser aventados como intermediários na interação entre receptores P2Y_1 e receptores de IGF-I. Tendo em vista que, em vários modelos celulares, a estimulação de receptores de nucleotídeos P2Y é capaz de ativar a proteína Src (para revisão: Weisman, *et al.*, 2005), um mecanismo simples para explicar esta interação seria o de que receptores P2Y_1 estivessem estimulando a Src que, por sua vez, estaria estimulando receptores de IGF-I na ausência do ligante IGF. Segundo este mecanismo, inibidores da Src deveriam inibir a proliferação celular induzida por ADP em nossas culturas. Para investigar esta hipótese, culturas de retina de E7C1 foram tratadas por 24 horas com ATP 100 μM ou ADP 500 μM , na presença ou não dos inibidores da Src Herbimicina A (10 ng/mL) ou PP1 (1 μM) e processadas para a incorporação de [^3H]-timidina. Entretanto, nenhuma diminuição na incorporação de [^3H]-timidina foi observada em culturas tratadas tanto com Herbimicina A quanto com PP1, na presença ou não de nucleotídeos (figura 13).

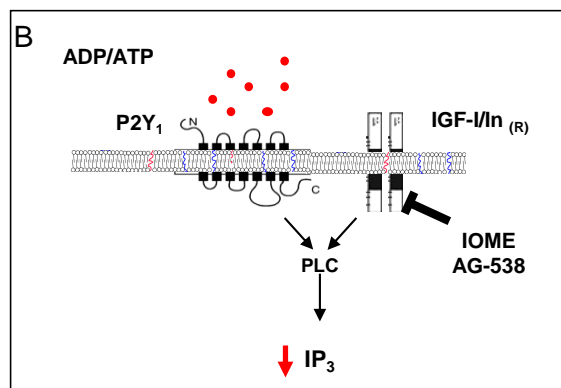
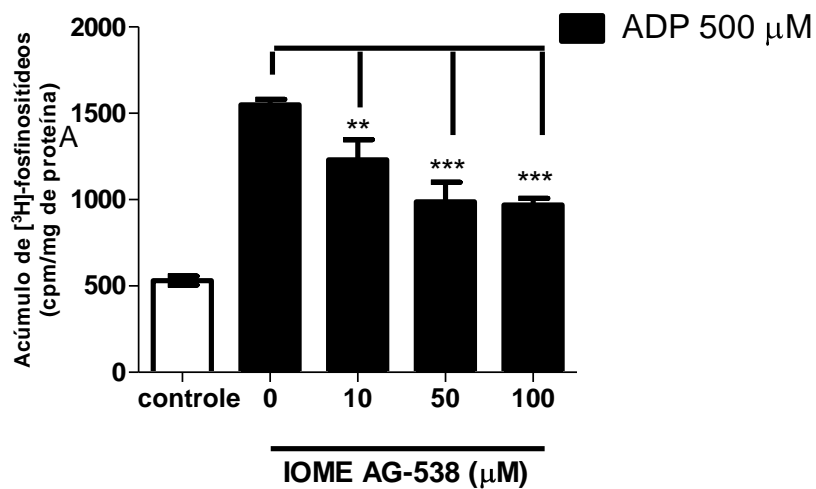


Figura 12: Efeito de concentrações crescentes de IOME AG-538 sobre o acúmulo de [3H]-fosfoinosítídeos induzido por ADP. A) Culturas de E7C2 contendo 10^7 células foram pré-incubadas com concentrações crescentes de IOME AG-538 (10, 50, 100 μM) durante 10 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com ADP 500 μM durante 1 hora (barra preta). B) Modelo esquemático mostrando a ativação de receptores P2Y₁ e a consequente formação de IP₃ de forma dependente da participação de receptores para IGF-I. Para cada concentração de IOME, foi realizado 1 experimento separado em duplicata. Os dados representam a média \pm EPM dos dados obtidos. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparados com ADP 500 μM .

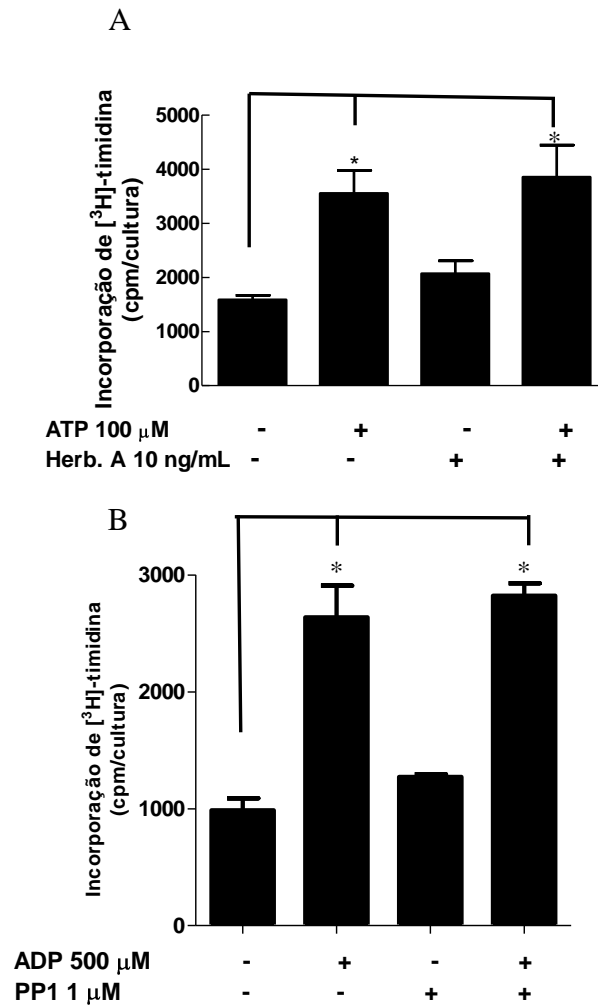


Figura 13: Efeito de inibidores da Src sobre a proliferação celular induzida por ADP. Culturas de E7C1 foram estimuladas por 24 h com ADP 500 μ M na presença ou ausência dos inibidores Herbimicina A 10 ng/mL (A) ou PP1 1 μ M (B). Os dados representam a média \pm EPM de 2 experimentos realizados em duplicata. * $p < 0.05$ versus o controle.

Estes resultados sugerem que a Src não esteja envolvida no efeito proliferativo do ATP em culturas de células de retina de embrião de pinto, descartando, portanto, uma possível transativação de receptores de IGF-I por nucleotídeos mediados pela Src.

4.2- Envolvimento da dessensibilização de receptores P2Y e endocitose mediada por clatrina na resposta proliferativa do ADP.

Classicamente, um dos fenômenos associados à dessensibilização de receptores acoplados à proteína G é o fenômeno de endocitose, que ao diminuir a formação de segundos mensageiros induzida por estes sítios, provoca uma mudança no acoplamento destes receptores, que passam então a sinalizar através da via das MAP cinases (Maudsley, *et al.*, 2007). Dados obtidos no período inicial de meu doutoramento (para complementar a publicação dos dados de meu mestrado) mostraram que a proliferação induzida por ATP de progenitores tardios da retina de pinto ocorria de forma concomitante com a dessensibilização da formação de derivados fosforilados de inositol (InsPs) induzida pelo agonista (França *et al.*, 2007). Tendo em vista a proliferação de progenitores tardios induzida por ADP na retina embrionária de pinto é dependente da ativação de MAP cinases (Sanches *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2007), resolvemos investigar a participação ou não do fenômeno de endocitose na proliferação de progenitores tardios da retina. Para isto, avaliamos o efeito de monodansil-cadaverina (MDC) e clorpromazina, 2 compostos capazes de inibir a endocitose via clatrina através de mecanismos distintos, sobre a proliferação induzida por ADP (figura 14). Culturas em E7C1 foram estimuladas com ADP durante 24 h e tratadas com concentrações crescentes de monodansil-cadaverina (MDC; 3 e 30 μ M), um inibidor genérico da formação de vesículas recobertas por clatrina (Phonphok e Rosenthal, 1991; Wang *et al.*, 1993) ou clorpromazina (CPZ; 1 e 10 μ M), um inibidor que bloqueia o recrutamento

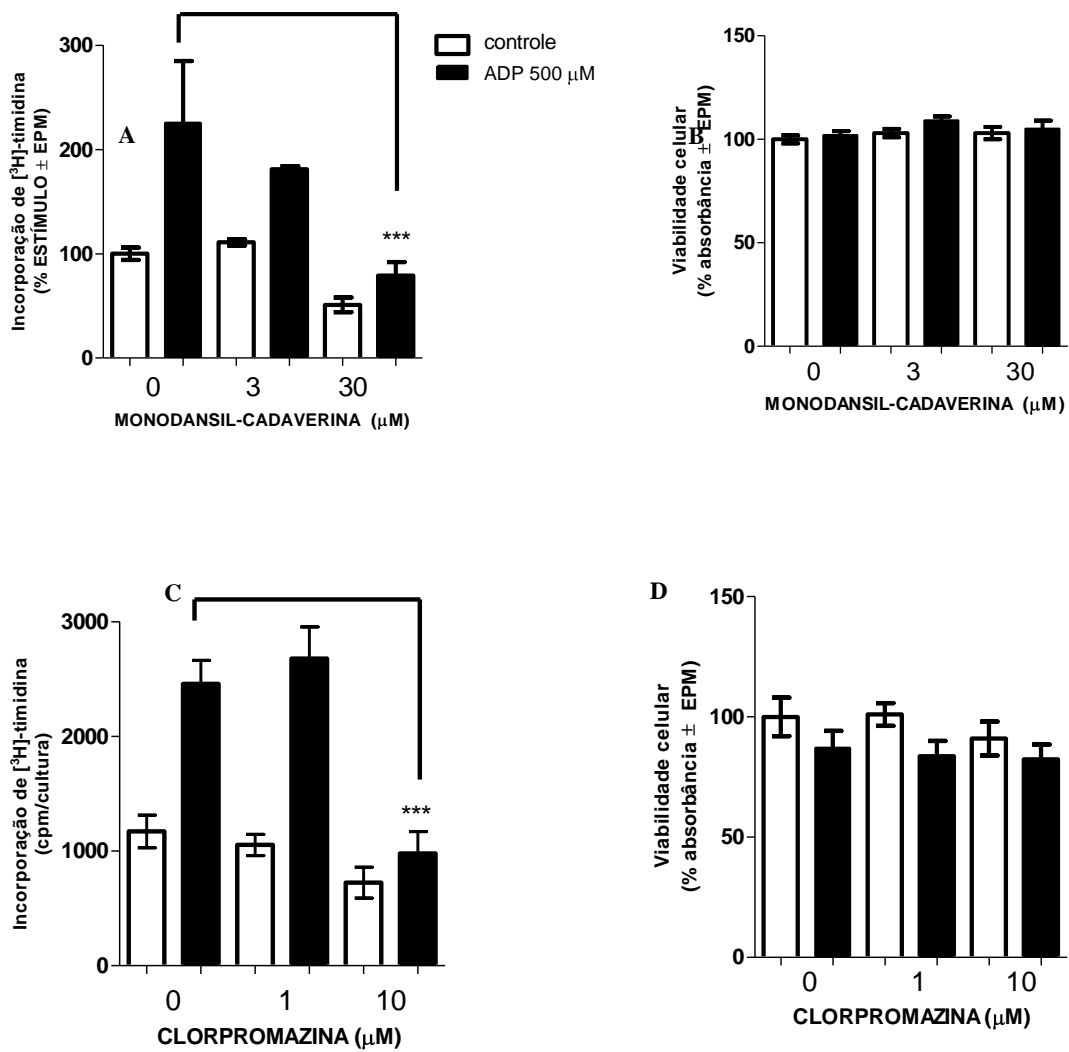


Figura 14: Efeito de concentrações crescentes de MDC e CPZ sobre a incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina (A e C) induzida por ADP 500 μM e sobre a viabilidade celular (B e D). Culturas de células de retina em E7C2 foram tratadas com MDC (3 e 30 μM) na ausência ou presença de ADP 500 μM por 24 h (A e B). Culturas de células de retina em E7C2 foram tratadas com CPZ (1 e 10 μM) na presença ou não de ADP 500 μM por 24 h (C e D). Os dados representam a média em % \pm EPM de 4 experimentos realizados em duplicata. *** $p < 0.001$ comparado com ADP 500 μM .

do complexo AP2 para a membrana (Yao *et al.*, 2002; Tulapurkar *et al.*, 2005). Os tratamentos com MDC 30 μM (media percentual em relação ao controle \pm EPM: controle: 100 ± 6 ; ADP: $225,5 \pm 59$; ADP + MDC 30 μM : 79 ± 13 ; $n=2$) ou CPZ 10 μM (media em cpm/cultura \pm EPM: controle: 1172 ± 143 ; ADP: 2459 ± 206 ; CPZ 10 μM : 726 ± 135 ; ADP + CPZ 10 μM : 980 ± 190 ; $n=3$) inibiram de forma significativa a proliferação celular induzida por ADP 500 μM . Além disso, ensaios de viabilidade celular indicaram ausência de morte celular significativa nas culturas tratadas tanto com MDC quanto com CPZ (figuras 14B e 14D, respectivamente), descartando, portanto, a possibilidade que a redução na proliferação celular observada nas culturas tratadas com MDC ou CPZ seja devida à efeitos tóxicos destes agentes. Estes resultados, em conjunto com os dados publicados pelo nosso grupo (França *et al.*, 2007), sugerem que a dessensibilização de receptores P2Y seguida por endocitose seja um fenômeno necessário para proliferação celular induzida por ADP em nosso modelo.

Sabendo que o receptor envolvido na proliferação celular em nossas culturas é o P2Y₁ (Sanches *et al.*, 2002) acoplado à formação do segundo mensageiro IP₃ (Sanches *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2007), resolvemos investigar o efeito de um destes inibidores de endocitose, o MDC, sobre o acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos induzido por ADP. Para isto, culturas de E7C2 contendo 10⁷ células foram pré-incubadas com MDC 300 μM por 10 min, estimuladas com ADP 500 μM por 1 hora e analisadas para o acúmulo de [³H]-fosfoinosítídeos como descrito na seção de Materiais e Métodos. Em culturas tratadas com ADP 500 μM por 1h, um aumento na formação de [³H]-fosfoinosítídeos de ~ 80 % acima dos níveis basais foi observado (figura 15). Além disto, o tratamento com MDC 300 μM não foi capaz de reduzir a formação de fosfoinosítídeos induzida por ADP, sugerindo que a endocitose não esteja envolvida na ativação inicial da fosfolipase C por ativação de receptores P₂Y₁ em nossas culturas.

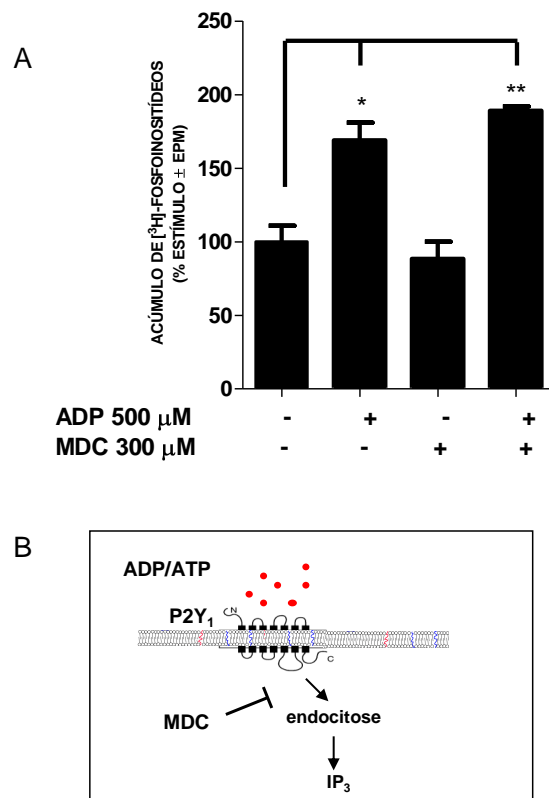


Figura 15: Efeito de MDC sobre o acúmulo de ^3H -fosfoinosítídeos induzido por ADP em culturas de células de retina em E7. A) Culturas de E7C2 contendo 10^7 células foram pré-incubadas com MDC 300 μM , durante 10 min. Em seguida, as células foram estimuladas com ADP 500 μM e processadas para o acúmulo de ^3H -fosfoinosítídeos. B) Modelo esquemático mostrando a ativação de receptores P2Y_1 e a formação de IP_3 de forma independente de endocitose. O gráfico representa a média percentual de estímulo \pm EPM de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ comparado com o controle.

Com o objetivo de caracterizar a(s) via(s) de sinalização intracelular afetada(s) por MDC e CPZ, resolvemos investigar inicialmente o efeito destes inibidores de endocitose sobre a ativação da via das ERKs e da PI3 cinase/AKT induzida por ativação de receptores P2Y₁. Para isto, culturas em E7C1 contendo 10⁷ células foram pré-incubadas com MDC 30 e 300 μM ou CPZ 10 μM durante 25 min (figura 16A). Em seguida, as células foram estimuladas com ADP 500 μM por mais 5 min e processadas para ensaios de “WB” para detecção de ERK e AKT fosforiladas. A ativação da AKT foi estudada apenas com MDC 30 μM e para a ativação da ERK, tanto MDC 30 e 300 μM quanto CPZ 10 μM foram investigados. Em todas as condições experimentais onde o tratamento das culturas com ADP foi realizado na presença dos inibidores de endocitose, observamos um bloqueio completo na fosforilação da AKT e da ERK, sugerindo fortemente que a endocitose dependente de clatrina seja necessária para a ativação da via das ERKs e da AKT estimulada por receptores P₂Y₁ e, conseqüentemente, para a indução da proliferação celular por ADP.

Como pode ser verificado no conjunto de resultados iniciais desta tese, a proliferação celular induzida por ADP parece ser dependente da ativação de receptores para IGF-I/In, uma vez que o inibidor deste receptor, o IOME-AG-538, foi capaz de bloquear a resposta proliferativa do ADP em nossas culturas (figura 6). Além disto, este inibidor foi capaz de diminuir a tanto a fosforilação destes receptores induzida por ADP quanto a fosforilação da ERK e da AKT induzida pelo nucleotídeo (figura 11). Com objetivo de verificar se a endocitose mediada por clatrina estaria envolvida na ativação de receptores para IGF-I/In induzida por ADP, resolvemos investigar o efeito da monodansil-cadaverina sobre a fosforilação destes receptores e da proteína adaptadora IRS-1 induzida por ADP (figura 17). Culturas de E7C1 contendo 10⁷ células foram pré-incubadas com MDC 30 μM durante 25 min. Em seguida, as células foram estimuladas

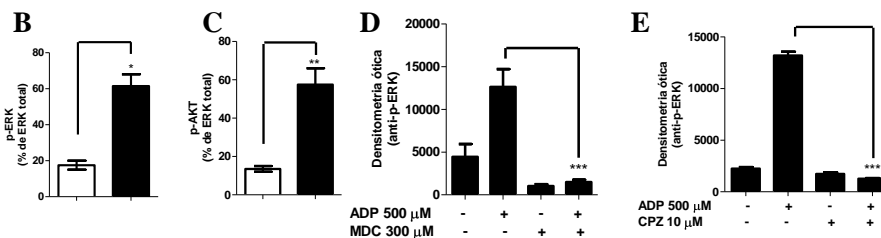
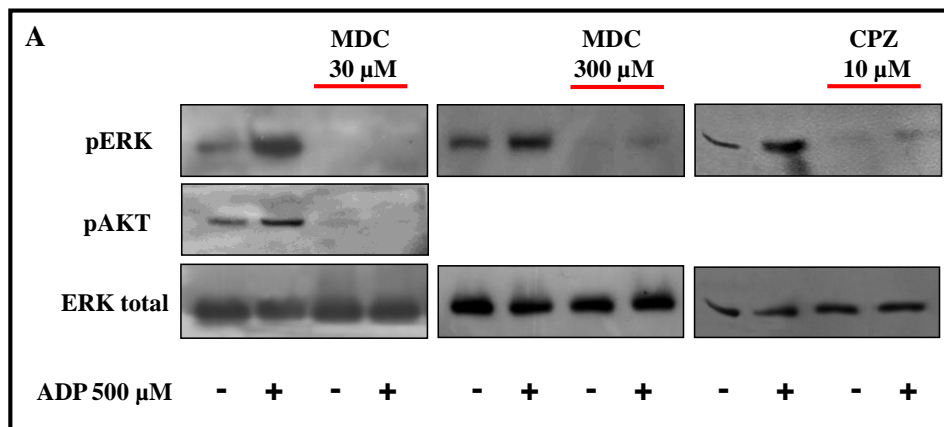


Figura 16: Efeito de MDC e CPZ sobre a fosforilação da AKT e da ERK induzida por ADP. Culturas de E7C2 contendo 10^7 células foram pré-incubadas com MDC 30 ou 300 μ M e CPZ 10 μ M durante 25 min. Em seguida, as células foram estimuladas com ADP 500 μ M e processadas para western blot. A) Fotomicrografias revelando a marcação para anti-p-AKT (1:2000) e anti-p-ERK (1:1000). Os gráficos representam a média percentual em densidade ótica em relação a ERK total \pm EPM de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ comparado com o controle.

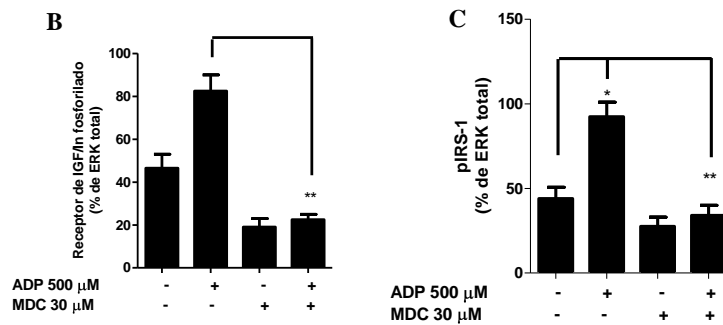
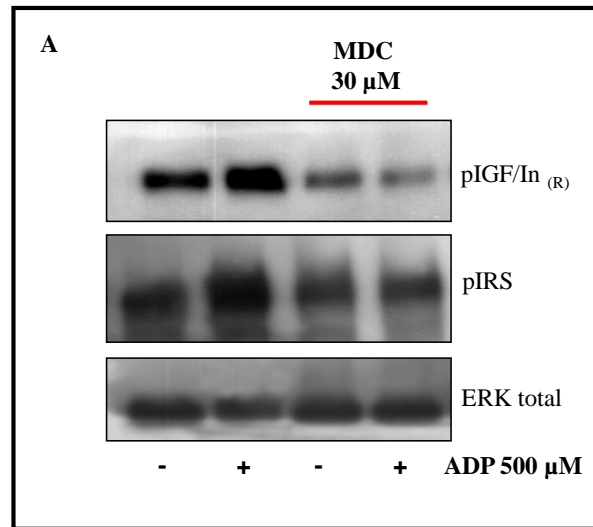


Figura 17: Efeito de MDC sobre a fosforilação do receptor de IGF-1/In e do fator responsivo à insulina (IRS-1) induzida por ADP. Culturas em E7C1 contendo 10^7 células foram pré-incubadas com MDC 30 μ M durante 25 min. Em seguida, as células foram estimuladas com ADP 500 μ M e processadas para western blot. **A)** Fotomicrografias mostrando a marcação para o receptor de IGF/In (1:2000) e para IRS-1 (1:2000) fosforilados. **B)** e **C)** Densitometria dos ensaios mostrados em **A)**. Os gráficos representam a média percentual em densidade óptica em relação a ERK total \pm EPM de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0.05$ comparado com o controle e ** $p < 0.01$ comparado com ADP 500 μ M.

com ADP 500 μ M por mais 5 min e processadas para ensaios de “WB” para detecção da fosforilação do receptor de IGF-I/In e da proteína IRS-I. Nas figuras 17A e 17B, podemos observar que, enquanto o ADP induziu um aumento ~ 1.77 x na fosforilação do receptor para IGF-I/Insulina em comparação com os níveis basais, o tratamento com MDC foi capaz de inibir completamente a fosforilação deste receptor induzida por ADP (média percentual de p-IGF-I/In em relação a ERK total \pm EPM: controle: 47 ± 7 ; ADP: 83 ± 8 ; MDC: 19 ± 4 ; ADP + MDC: 23 ± 3 ; n = 02). Além disto, nas figuras 17A e 17C, podemos observar que o ADP promoveu um aumento significativo de ~ 2.10 x na fosforilação do IRS-I. Em acordo com os resultados do receptor, o tratamento das culturas com MDC 30 μ M foi capaz de inibir completamente a fosforilação do IRS-I induzida por ADP (média percentual de p-IRS-I em relação à ERK total \pm EPM: controle: 44 ± 7 ; ADP: 92 ± 9 ; MDC: 28 ± 6 ; ADP + MDC: 34 ± 6). Estes resultados sugerem que a transativação entre receptores P2Y₁ e IGF-I/Insulina ocorre de forma dependente de endocitose.

Como a proliferação celular, a ativação de receptores de IGF-I/Insulina, a ativação do IRS-I e das vias da MAPK e da AKT foram dependentes de endocitose quando induzidas por ADP, resolvemos investigar se a ativação do receptor de IGF-I/Insulina induzida pelo próprio agonista IGF-I também era dependente de endocitose mediada por clatrina. Para isto, culturas de E7C1 contendo 10^7 células foram pré-incubadas com MDC 30 μ M durante 25 min (figura 18A). Em seguida, as células foram estimuladas com IGF-I 100 ng/mL por mais 5 min e processadas para ensaios de “WB” para detecção do receptor de IGF-I/In fosforilado e para a detecção da p-AKT e da p-ERK. Culturas tratadas com IGF-I mostraram um aumento significativo de ~ 6.7 , 3.0 e 3.6 x na fosforilação do receptor de IGF-I/In, da AKT e da ERK, respectivamente. Entretanto, nenhuma redução na fosforilação destas proteínas foi observada nas culturas

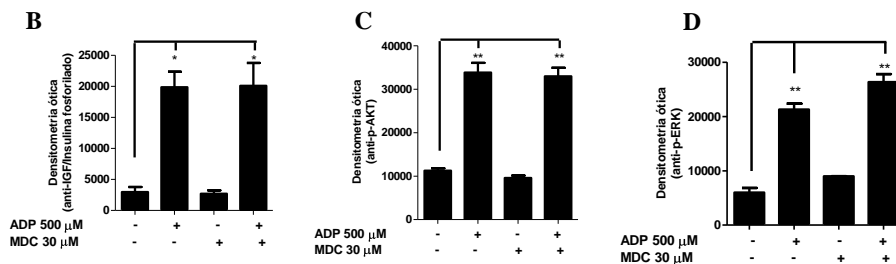
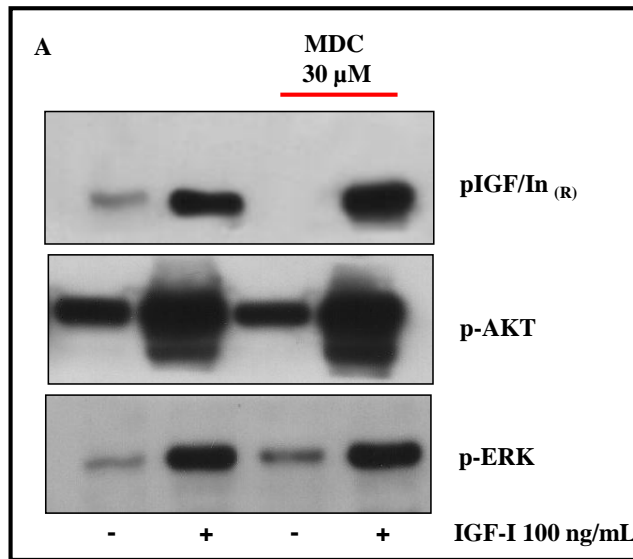


Figura 18: Efeito de MDC sobre a fosforilação do receptor de IGF-I/In, da AKT e da ERK induzida por IGF-I. Culturas de E7C1 contendo 10^7 células foram pré-incubadas com MDC 30 μ M durante 25 min. Em seguida, as células foram estimuladas com IGF-I 100 ng/mL e processadas para WB. **A)** Fotomicrografias mostrando a marcação para o receptor de IGF-I/In (1:2000), AKT (1:4000) e ERK (1:1000) fosforilados. **B), C) e D)** Densitometria dos ensaios de WB. Os gráficos representam a média percentual em densidade ótica \pm EPM de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ comparados com o controle.

tratadas concomitantemente com IGF-I e MDC, que apresentaram aumentos de ~6.7x, 3.0x e 3.6 na fosforilação do receptor, da AKT e da ERK, respectivamente. Estes dados sugerem que a ativação do receptor de IGF-I/In e das vias de transdução de sinal AKT e ERK quando induzida diretamente por IGF ocorra de forma independente do fenômeno de endocitose mediada por clatrina.

4.3- Efeito de ATP sobre a proliferação celular em culturas de células de retina mais diferenciadas submetidas à lesão mecânica.

Sanches e colaboradores (2002) mostraram que a proliferação celular induzida por ativação de receptores P2Y₁ por ATP encontra-se restrita a um período do desenvolvimento compreendido entre o 6^o e o 9^o dia embrionário (E6-E9), uma etapa onde apenas progenitores de células gliais e bipolares ainda proliferam neste tecido. Por outro lado, durante meu mestrado e início desta tese, mostramos que células de retina de embriões de 7 dias mantidas em cultura também perdem sua capacidade de responder a este nucleotídeo, em termos de proliferação celular, após o 3^o dia de cultivo (figura 1 do trabalho em anexo, França *et al.*, 2007).

Os dados relatados acima sugerem que o efeito proliferativo do ATP na retina ocorra apenas em progenitores de tecidos embrionários, mas não de células gliais de tecidos adultos. Entretanto, diversos trabalhos têm sugerido que o ATP esteja envolvido no fenômeno de gliose reativa induzida por lesão em tecidos adultos (Neary *et al.*, 1996, Rathbone *et al.*, 1999). Assim como em lesões do Sistema Nervoso Central por isquemia ou trauma, onde ocorre liberação de nucleotídeos e formação da cicatriz glial (para revisão, Franke e Illes, 2006), em culturas de células epiteliais, a lesão mecânica da monocamada de células provoca liberação significativa de ATP capaz de induzir proliferação celular dependente da ativação de receptores P2 (Yin *et al.*, 2007). Com o

objetivo de evidenciar um efeito proliferativo de ATP em estágios mais tardios do desenvolvimento *in vitro* de células da retina, resolvemos investigar a proliferação celular e as mudanças morfológicas induzidas por lesão da monocamada celular em culturas de retinas de embrião de galinha. Para isto, culturas de células de retinas de E8 contendo 10^7 células/placa e mantidas por 1 (E8C1) ou 7 dias (E8C7) foram lesadas mecanicamente com o auxílio de uma ponteira de micropipeta, gerando uma região desprovida de células. Após a lesão, o meio de cultura foi trocado e o crescimento celular sobre a área livre de células observado. Em culturas lesadas em E8C1, um aumento no preenchimento da área descoberta pela lesão foi detectado entre o 1º e o 8º dia após a lesão (área livre de células em $\text{mm}^2 \times 10^2 \pm \text{EPM}$: dia 0: 21 ± 0.4 ; dia 1: 17.6 ± 0.8 ; dia 2: 12.3 ± 0.9 ; dia 3: 9.0 ± 0.7 ; dia 8: 6.3 ± 0.8 , $n = 3$). Da mesma maneira, em culturas mais diferenciadas em E8C7, um recobrimento significativo da área de lesão foi detectado entre o 1º e o 7º dia pós-lesão (área livre de células em $\text{mm}^2 \times 10^2 \pm \text{EPM}$: dia 0: 22.4 ± 1.0 ; dia 1: 18 ± 0.9 ; dia 2: 13.6 ± 0.7 ; dia 3: 7.6 ± 0.9 ; dia 7: 5.4 ± 1.2 ; $n = 3$) (Figura 19).

A análise morfológica utilizando microscopia de contraste de fase revelou que as culturas lesadas em E8C1 apresentaram, durante os 3 primeiros dias após a lesão, uma intensa neuritogênese, com inúmeras conexões entre as bordas da região lesada, assim como diversas áreas recobertas por células com morfologia tanto neuronal quanto glial (Figura 20A). Já as culturas lesadas em E8C7 não apresentaram células com morfologia neuronal sobre a região lesada. Somente células com morfologia glial foram observadas (Figura 20B).

Com objetivo de confirmar a natureza glial das células localizadas na área de lesão em culturas mais diferenciadas de E8C7, realizamos ensaios de imunocitoquímica para um marcador de células gliais de Muller de aves, o antígeno glial 2M6. Para

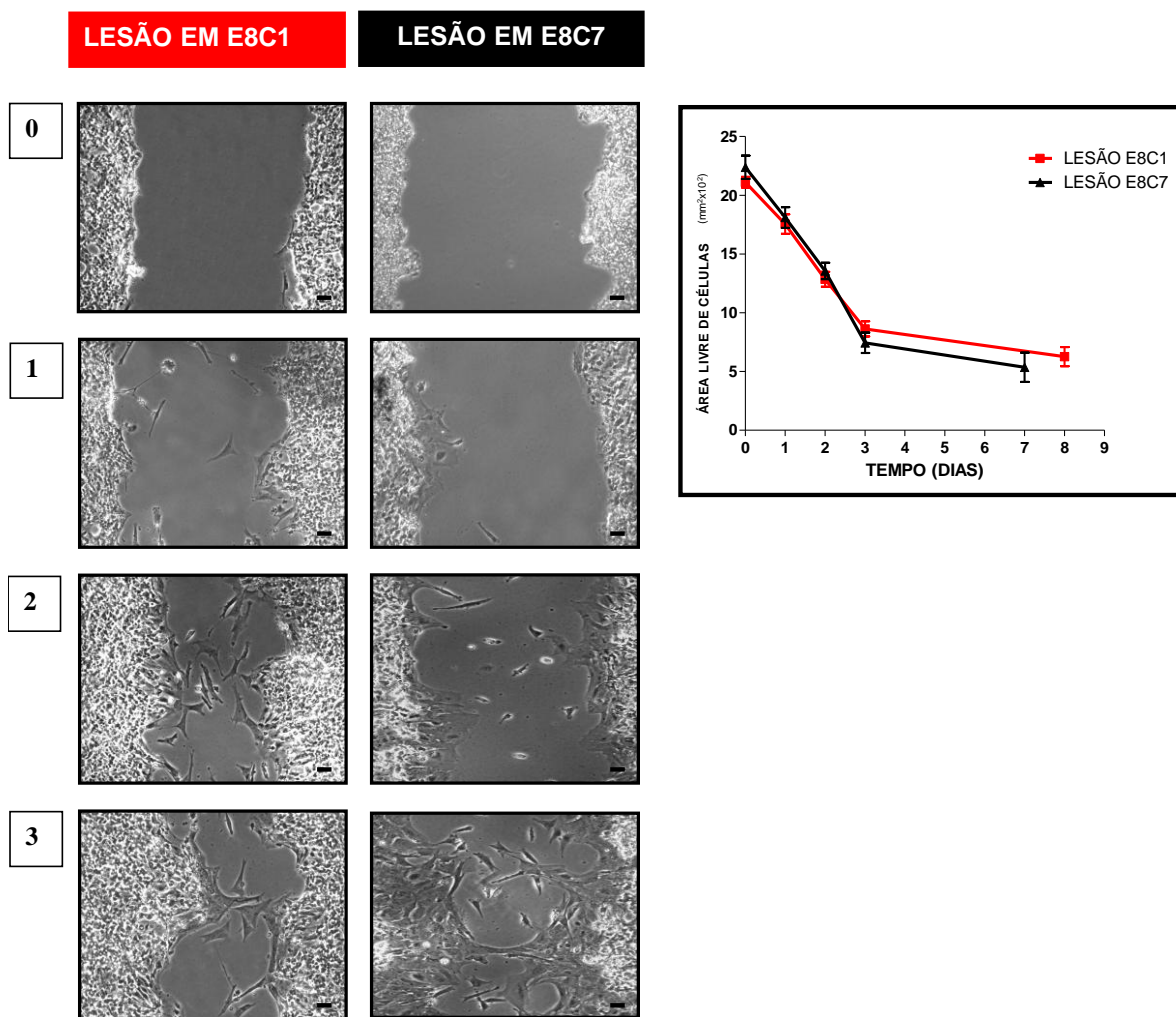


Figura 19: Cinética de recobrimento da área livre de células após lesão da monocamada em cultura de retina com diferentes estágios de diferenciação. Culturas de retina em E8C1 (vermelho) e E8C7 (preto) contendo 10^7 células foram lesadas como descrito nos métodos. As imagens mostradas foram obtidas após 0, 1, 2 e 3 dias após a lesão em E8C1 (esquerda) ou E8C7 (direita). Destes experimentos, foram obtidas ~ 25 imagens para cada intervalo de tempo, sendo a área livre de células ($\text{mm}^2 \times 10^2$) medida utilizando o programa Scion Image. O gráfico representa 3 experimentos independentes, realizados em duplicata. Todos os pontos do gráfico obtiveram diferença significativa com $p < 0.001$ em comparação ao controle. Barra = 20 μm

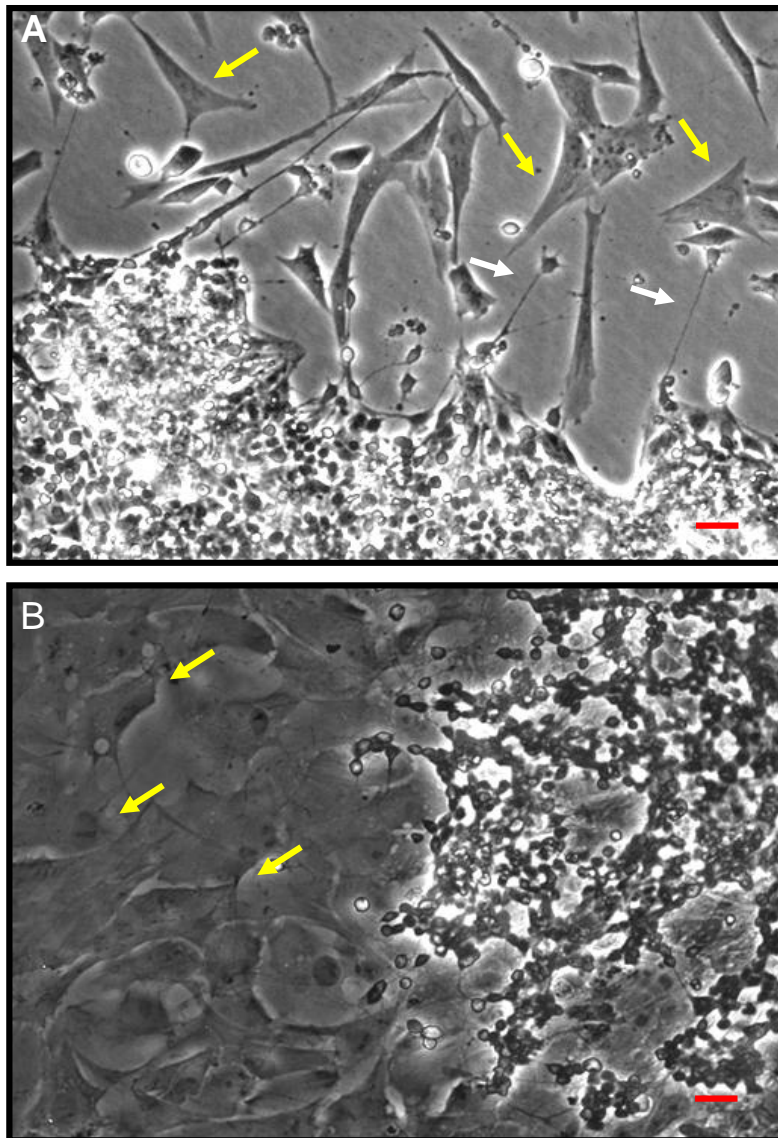


Figura 20: Características morfológicas das células na área de lesão em culturas lesadas em E8C1 e E8C7. A) Cultura de células de retina que sofreu lesão em E8C1. Imagem obtida 2 dias após a lesão. Note a presença de neurônios (setas brancas) e células gliais (setas amarelas) sobre a área onde ocorreu a lesão. **B)** Cultura de células de retina que sofreu lesão em E8C7. Imagem obtida 3 dias após a lesão. Note a ausência de neurônios e neuritos e presença de células gliais (setas amarelas) sobre a área onde ocorreu a lesão. Barra vermelha = 20 μm .

precursores neuronais, utilizamos o marcador TUJ-1. Após 7 dias de cultivo, culturas contendo 5×10^6 células de retina em lamínulas de vidro foram lesadas com auxílio de ponteira para micropipeta e cultivadas por mais 3 dias. Após este período, as células foram fixadas com PFA 4% e incubadas com os antisoros contra 2M6 (1:500) e TUJ-1 (1:200). Como observado na figura 21, a região da lesão foi completamente recoberta por células positivas para 2M6, indicando a presença de células gliais nesta área. Embora estas células na área da lesão também tenham apresentado imunoreatividade para o marcador TUJ-1, neurônios positivos para TUJ-1 mas negativos para 2M6 foram observados apenas fora da área de lesão. Estes resultados sugerem que o recobrimento da área descoberta pela lesão mecânica em nossas culturas de E8C7 deva ocorrer através de um processo de gliose reativa semelhante ao observado em lesões do sistema nervoso de animais adultos, uma vez que as culturas apresentaram uma região de cicatrização glial com ausência de neurônios ou processos nervosos.

Uma vez que a gliose reativa envolve, entre outros fenômenos, a proliferação celular, resolvemos investigar a incorporação de BrdU, um marcador da fase S do ciclo celular, em nosso modelo. Para isto, células de E8C7 foram lesadas como descrito anteriormente, cultivadas por 2 dias e incubadas com BrdU por 4 h, antes da fixação com PFA 4%. As células foram então processadas para imunofluorescência, utilizando o antisoro contra BrdU (1:500). A quantificação da proliferação celular foi realizada através da relação número de células BrdU^+ / número de núcleos DAPI^+ , em campos fotográficos da borda das lesões, de áreas distantes 5 mm da borda das lesões e de campos aleatórios de culturas que não sofreram lesão. Na borda da lesão, foi possível detectar um aumento significativo de $\sim 2.8 \times$ na incorporação de BrdU em relação a incorporação de BrdU em culturas controle não submetidas à lesão (Figura 22). Nas imagens obtidas em áreas distantes 5 mm da borda de lesão foi possível detectar um

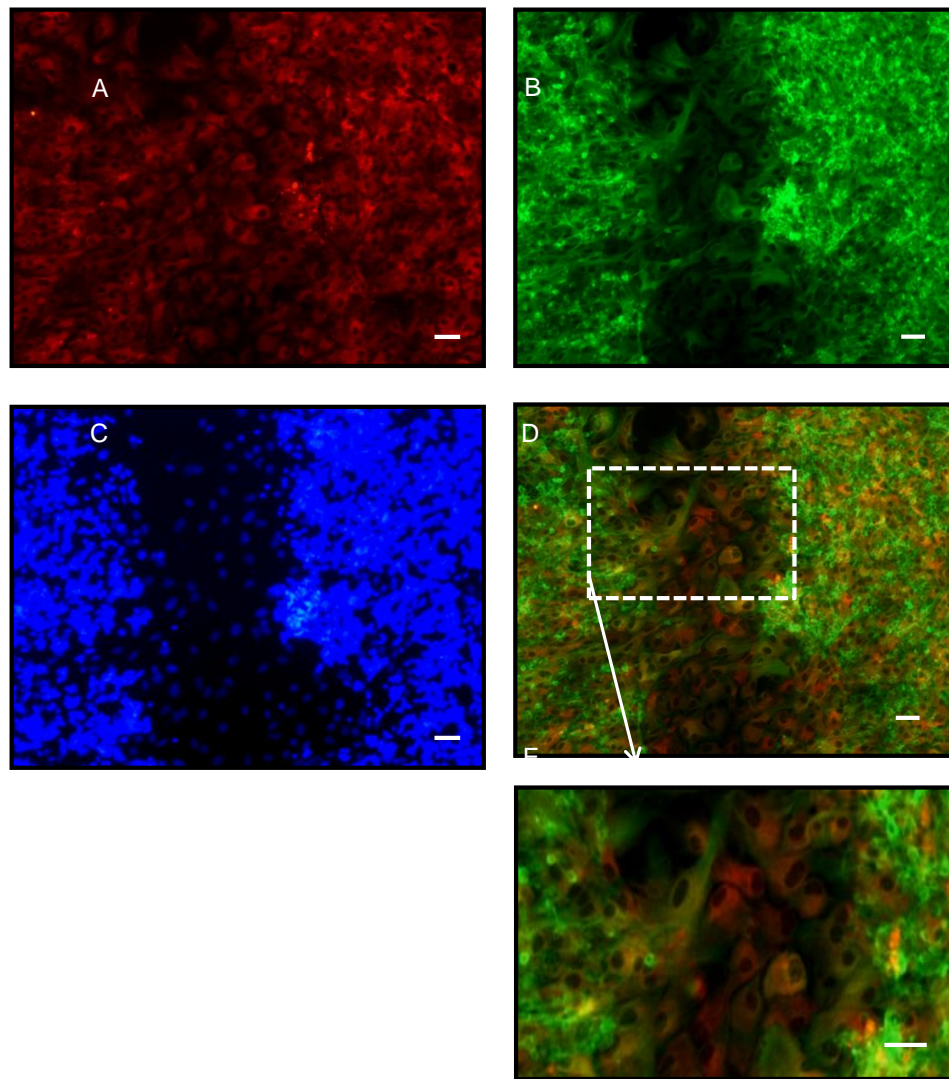


Figura 21: Imunofluorescência para o antígeno glial 2M6 e para o marcador de precursor neuronal TUJ 1 em culturas de células submetidas à lesão em E8C7. As culturas foram lesadas, cultivadas por 3 dias, fixadas com PFA 4% e processadas para imunocitoquímica. A) 2M6; B) TUJ-1; C) DAPI; D) Sobreposição das imagens. E) Detalhe da área de lesão. Barra = 10 μ m.

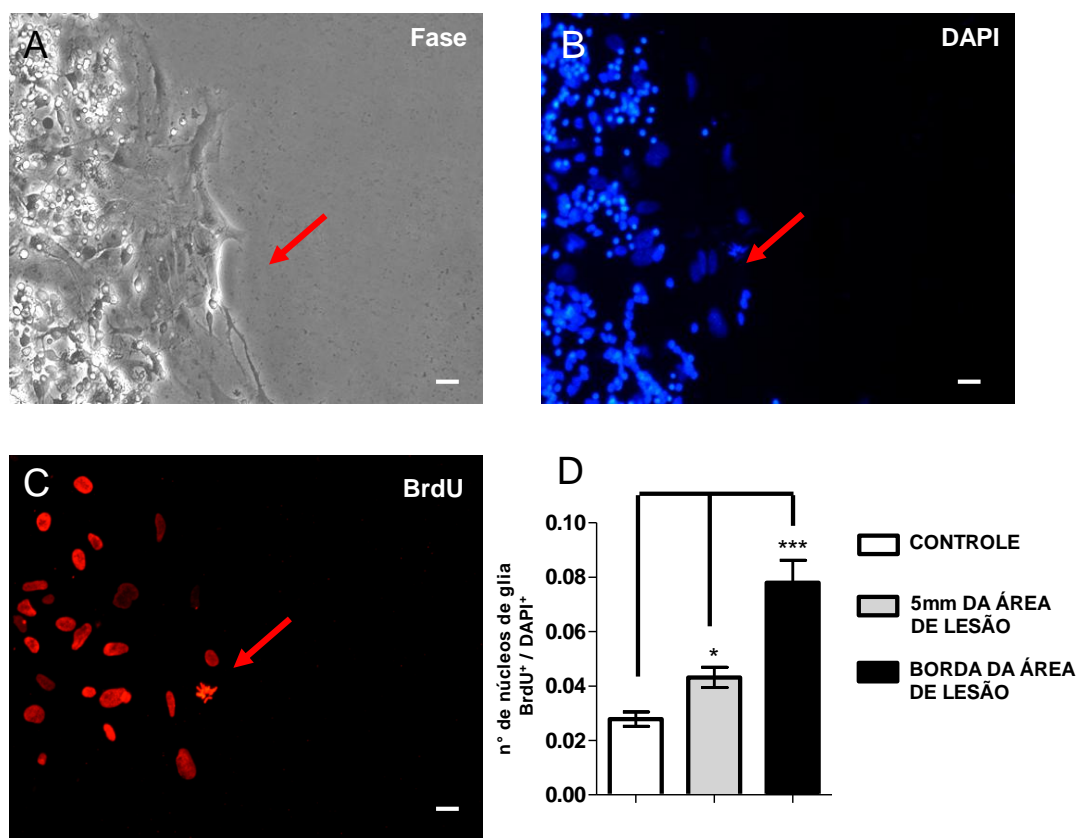


Figura 22: Incorporação de BrdU em culturas de células de retina com lesão da monocamada. Culturas de células de retina foram lesadas em E8C7. Após 2 dias, as culturas foram incubadas com BrdU por 4 h, lavadas, fixadas com PFA 4% e processadas para imunocitoquímica em E8C9. As fotomicrografia mostram uma imagem representativa da borda da lesão. **A)** contraste de fase; **B)** DAPI; **C)** BrdU. A seta vermelha evidencia uma célula em mitose. **D)** Quantificação da proporção de células BrdU⁺ em culturas não lesadas (barra branca), em áreas distantes 5 mm da borda da lesão de culturas lesadas (barra cinza) e na borda da lesão de culturas lesadas (barra preta). Os dados representam a média de 7 a 19 imagens obtidas de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$, comparado com a incorporação em áreas distantes 5 mm da borda da lesão e com o controle, respectivamente. Barra branca = 10 μm .

aumento significativo na incorporação de BrdU de ~1.53 x em relação à culturas controle. Núcleos pequenos de neurônios marcados positivamente para BrdU não foram detectados. Além disto, células BrdU⁺ com perfil mitótico (seta vermelha, figura 22) foram observadas com frequência na área de lesão.

Como relatado anteriormente, lesões do SNC ou lesões mecânicas de células epiteliais em cultura induzem a liberação de ATP seguida por proliferação celular mediada por receptores P2 (Franke e Illes, 2006; Yin *et al*, 2007). Com o objetivo de estudar a participação ou não deste nucleotídeo na proliferação celular induzida por lesão da monocamada em nossas culturas mais diferenciadas, culturas de E8C7 foram lesadas como descrito anteriormente e tratadas com Adenosina 5'-difosfatase / Adenosina 5'-trifosfatase (apirase) 5 U/mL, uma enzima que promove a hidrólise de ATP para AMP (para revisão: Fields e Burnstock 2006), por períodos de tempo crescentes. As respectivas áreas livre de células foram medidas como descrito anteriormente. Como pode ser observado na figura 23, esta enzima inibiu significativamente o crescimento celular sobre a área livre de células em 60, 57 e 73 %, após 1, 2 e 3 dias de tratamento, respectivamente. Estes resultados sugerem que o ATP presente em culturas de retina em estágios mais avançados de maturação submetidas à lesão mecânica esteja envolvido na proliferação de células gliais sobre a área de lesão.

Dados recentes do nosso laboratório mostraram que os nucleotídeos ATP, ADP e UTP são capazes de induzir um aumento na formação [³H]-fosfoinositídeos na retina embrionária de pinto, além de induzir a ativação de ERKs neste tecido (Nunes *et al.*, 2007). Neste trabalho, foi verificado que apenas as respostas ao ADP, que ocorrem através da ativação de receptores P2Y₁, foram inibidas pelos antagonistas PPADS e Suramina. Nenhuma inibição por estes compostos foi observados na ativação de receptores P2Y_{2/4} por UTP.

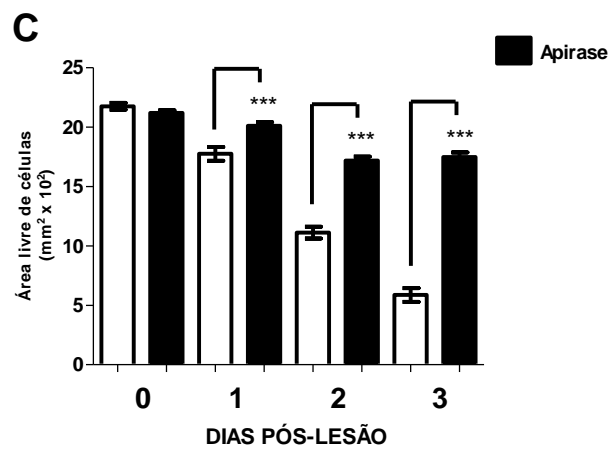
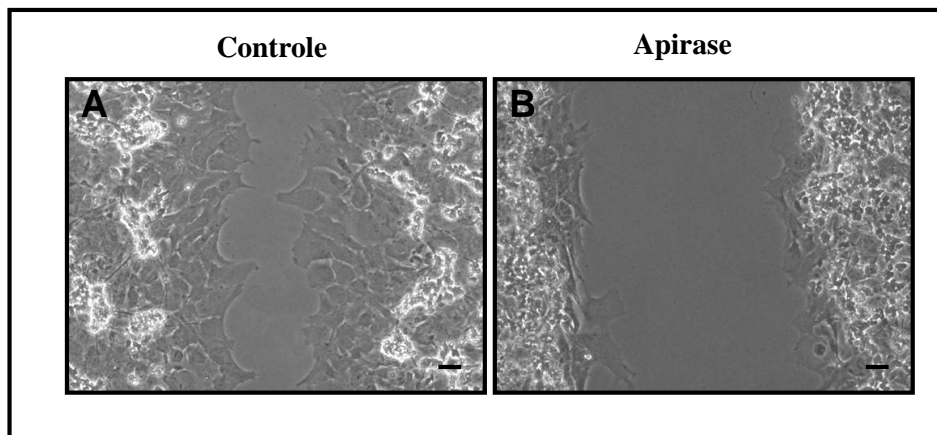


Figura 23: Efeito de Adenosina 5'-difosfatase / Adenosina 5'-trifosfatase (apirase) 5 U/mL sobre o crescimento celular induzido por lesão. A) Fotomicrografia em contraste de fase de culturas lesadas em E8C7 e cultivadas por 3 dias (controle). **B)** Fotomicrografia de culturas lesadas em E8C7 e cultivadas por 3 dias na presença de 5 U/mL de apirase. **C)** Quantificação das áreas livres de células em função do tempo de cultivo após a lesão das culturas. Os dados representam a média de ~40 imagens obtidas em 2 experimentos independentes realizados em duplicata. *** $p < 0.001$, comparado com culturas controle, não tratadas com apirase. Barra = 20 μm

Tendo em vista que tanto receptores P2Y₁ quanto receptores P2Y_{2/4}, dentre outros, foram identificados na retina (Housley, 2009, para revisão), resolvemos então verificar a participação ou não destes receptores no crescimento celular induzido pela lesão mecânica em nossas culturas. Para isto, resolvemos investigar o efeito dos antagonistas purinérgicos não seletivos PPADS e suramina e do antagonista seletivo para receptores P2Y_{2/4} reactive blue-2 (RB-2). Culturas de retina em E8C7 foram lesadas e tratadas com PPADS 100 µM, suramina 100 µM e RB-2 40 µM, por 3 dias. Em seguida, as respectivas áreas livre de células foram medidas como descrito anteriormente. A eficácia de inibição para o recobrimento da área livre de células foi maior para os antagonistas RB-2 e suramina. Já o PPADS foi o antagonista de menor eficácia (Figura 24). RB-2, suramina e PPADS foram capazes de inibir em $65.4 \pm 2.7\%$, $63 \pm 6\%$ e $20.8 \pm 2.6\%$ o crescimento observado em culturas não tratadas, respectivamente. Além disto, a incubação de culturas submetidas à lesão com RB-2 por 3 dias inibiu significativamente o crescimento de células 2M6⁺ sobre a área da lesão, sugerindo que estes antagonistas inibam o crescimento de células gliais sobre esta área.

A lesão mecânica na monocamada de células de retina promove um aumento na incorporação de BrdU em células da borda da lesão (figura 22). Com o objetivo de investigar a participação de receptores P2 na proliferação celular induzida pela lesão mecânica, culturas de células de retina em E8C7 foram lesadas, tratadas com RB-2 40 µM por 2 dias e incubadas com BrdU por 4 h antes do término da incubação. Após fixação, as células foram processadas para imunofluorescência para BrdU. A quantificação da proliferação celular foi realizada através da relação número de células BrdU⁺ / número de núcleos DAPI⁺, em campos fotográficos da região da borda das lesões, de áreas distantes 5 mm da borda das lesões e de campos aleatórios de culturas não lesadas. Como observado na figura 25, RB-2 inibiu completamente a proliferação

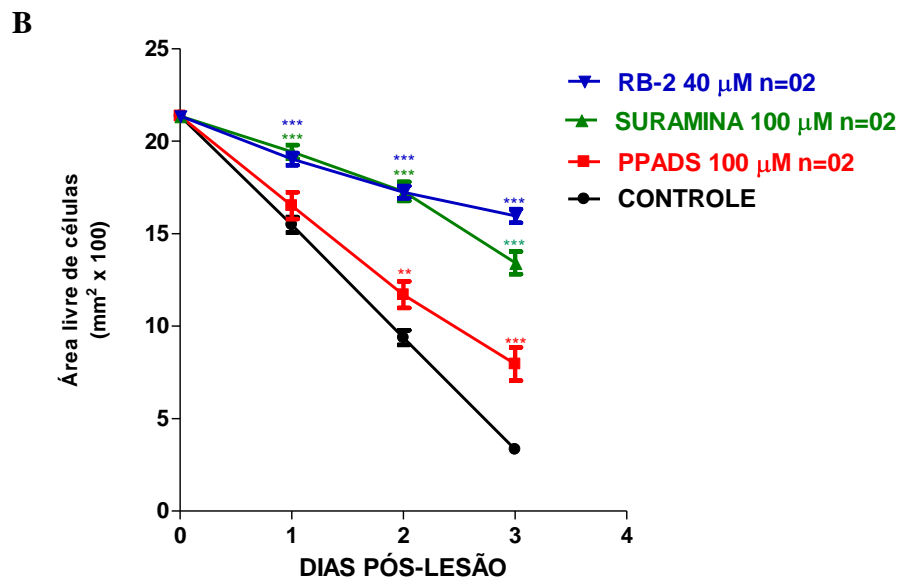
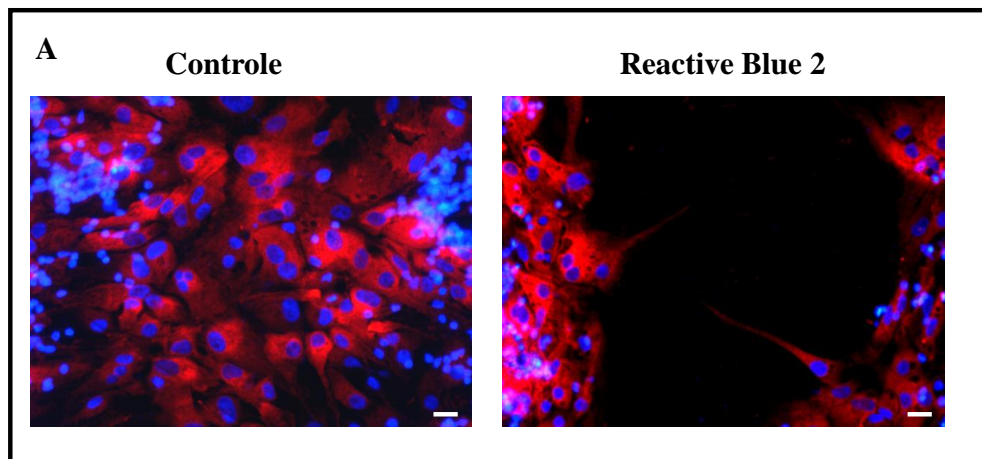


Figura 24: Efeito de antagonistas purinérgicos de receptores P2 sobre o crescimento celular induzido por lesão. Culturas lesadas em E8C7 e cultivadas por 2 dias na ausência (A) ou presença de 40 µM de RB-2 (B) foram processadas por imunofluorescência para o antígeno glial 2M6 (vermelho). Em azul, núcleos corados com DAPI. C) Quantificação das áreas livres de células de culturas lesadas em E8C7 e tratadas com os antagonistas PPADS (100 µM), suramina (100 µM) e RB-2 (40 µM) pelos tempos indicados após a lesão. Os dados representam a média de ~ 40 imagens obtidas em 2 experimentos independentes realizados em duplicata. **p < 0.01 e ***p < 0.001 comparado com culturas controle, não tratadas com os antagonistas. Barra = 20 µm.

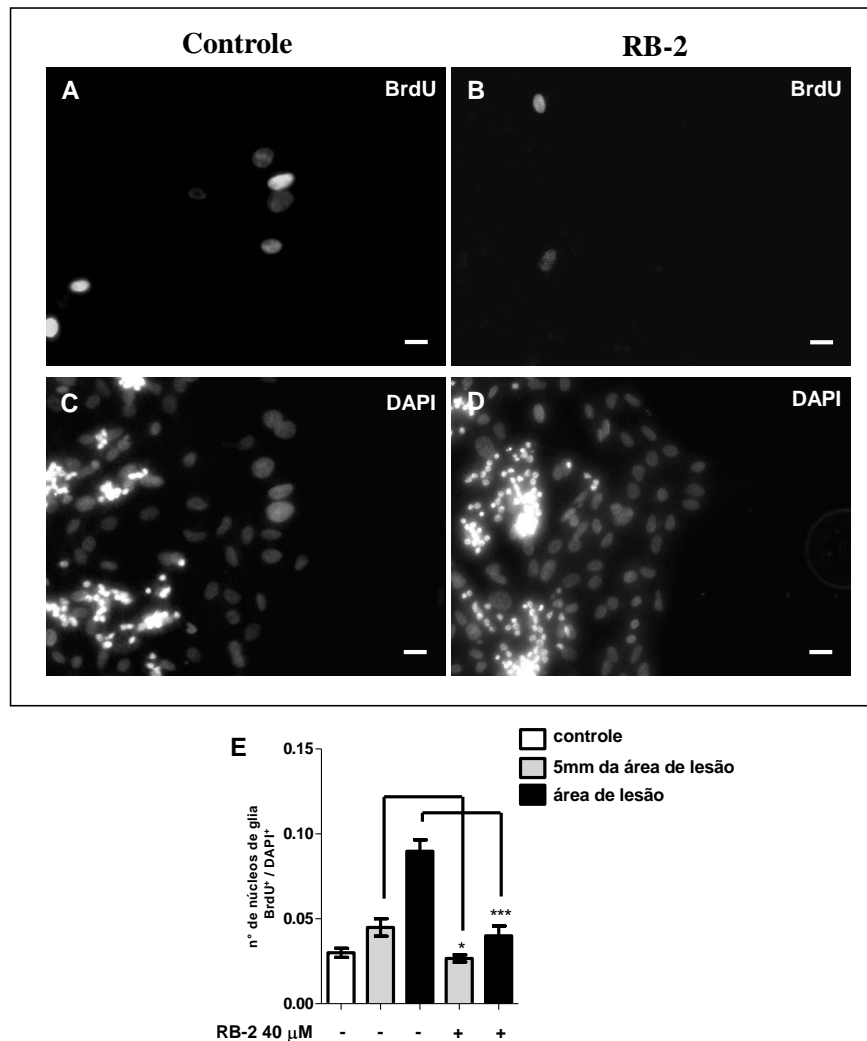


Figura 25: Efeito de RB-2 sobre a proliferação celular induzida por lesão mecânica em culturas de retina. Culturas de células de retina lesadas em E8C7 foram tratadas ou não com RB-2 (40 μ M) durante 2 dias. Após este período, as culturas foram incubadas com BrdU por 4 h, fixadas com PFA 4% e processadas para imunocitoquímica em E8C9. **A)** Imunorreatividade para BrdU na borda da lesão em culturas controle. **B)** Imunorreatividade para BrdU na borda da lesão em culturas tratadas com RB-2. **C e D)** DAPI. **E)** Quantificação da proporção de células BrdU⁺ em culturas tratadas ou não com RB-2. Barra branca = culturas controle, não lesadas. Barras cinzas = quantificação em áreas distantes 5 mm da borda da lesão. Barras pretas = bordas da lesão. Os dados representam a média de ~ 8 a 16 imagens obtidas de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$, comparado com as culturas não tratadas com RB-2. Barra = 20 μ m.

celular induzida pela lesão, tanto na borda da área livre de células, quando nas áreas distantes 5 mm da área de lesão (área livre de células em $\text{mm}^2 \times 10^2 \pm \text{EPM}$: controle 0.03 ± 0.0027 ; 5 mm: 0.045 ± 0.005 ; área de lesão: $0.09 \pm 0,007$; 5 mm + RB-2: 0.027 ± 0.002 ; área de lesão + RB-2: 0.04 ± 0.006 ; $n = 2$). Estes resultados em conjunto sugerem que células gliais em estágios de diferenciação mais avançados são capazes de proliferar em resposta ao ATP quando as culturas são submetidas à lesão mecânica. Além disto, estes resultados sugerem que o principal receptor purinérgico envolvido nesta resposta seja o receptor do tipo P2Y_{2/4}.

As evidências anteriores do nosso grupo sugerem que o receptor envolvido na proliferação de progenitores gliais seja o receptor do tipo P2Y₁, uma vez que esta resposta das células pode ser induzida por ATP ou ADP, mas não por UTP (Sanches *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2007). Para confirmar esta hipótese, resolvemos investigar a presença destes receptores em progenitores gliais mantidos em culturas. Para isto, culturas de células de retinas pouco diferenciadas (E7C1) foram submetidas ao ensaio de imunocitoquímica para o receptor P2Y₁ e para o antígeno glial 2M6. Na figura 26, podemos observar a presença de células duplamente marcadas para o antígeno glial 2M6 e para o receptor P2Y₁ (setas brancas). Entretanto, receptores P2Y₁ parecem não ser exclusivamente expressos em células gliais, uma vez que a marcação para o receptor P2Y₁ ocorreu tanto em células 2M6 positivas quanto em células 2M6 negativas (seta amarela). As células duplamente marcadas tem corpo celular pequeno, além de 1 ou 2 processos grossos, ambos característicos de progenitores gliais nesta etapa do cultivo.

Em outra série de experimentos, analisamos a expressão de receptores P2Y₁ em culturas de retinas lesadas em E8C7 com o objetivo de verificar se estes receptores seriam os sítios envolvidos no crescimento glial sobre a área descoberta pela lesão. Na figura 27, podemos observar que enquanto células da borda da lesão eram positivas para

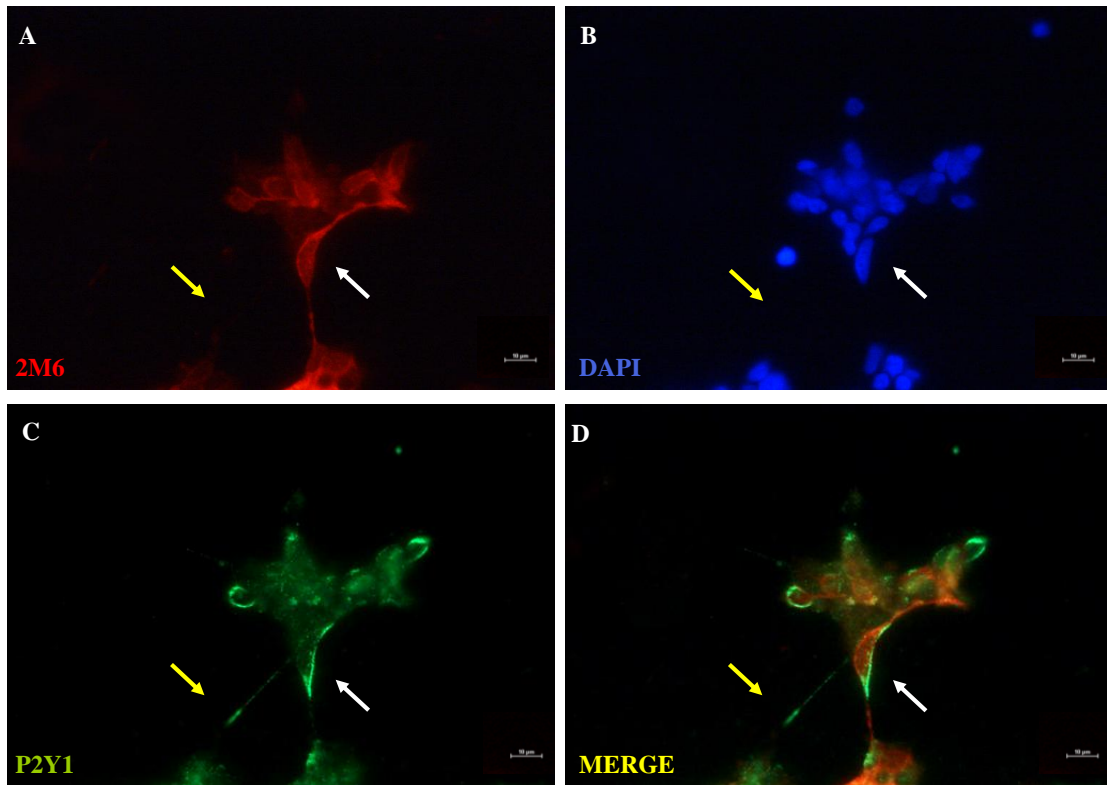


Figura 26: Imunofluorescência para o receptor P2Y₁ e para o antígeno glial 2M6 em culturas pouco diferenciadas de células de retina. Culturas de retinas em E7C1 contendo 5×10^6 células por placa foram imunorreagidas com antisoros para o antígeno glial 2M6 (A) e para o receptor P2Y₁ (C). (B) DAPI. (D) Sobreposição das imagens em A e C. Setas brancas, célula duplamente marcada para 2M6 e P2Y₁. Setas amarelas: célula marcada somente para o receptor P2Y₁. Imagens representativas de 3 experimentos realizados em duplicata. Barra = 10 µm

o antígeno 2M6, nenhuma imunoreatividade para o receptor P2Y₁ foi observada nesta região (figura 27C) ou em outras áreas da cultura (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que este receptor não seja o receptor P2 envolvido na proliferação glial decorrente da lesão mecânica em nossas culturas e reforçam a hipótese da participação de outros receptores, notadamente o receptor P2Y_{2/4}, no fenômeno proliferação glial decorrente da lesão de culturas de células de retina.

Como descrito na primeira parte desta tese, a proliferação de progenitores tardios induzida por ADP em culturas de retinas em E7C1 ocorre de forma dependente de receptores de IGF-I / Insulina. Com o objetivo de estudar a participação destes receptores durante a lesão mecânica em culturas mais diferenciadas, células de retina em E8C7 foram lesadas e incubadas ou não com IOME AG-538 10 µM durante 3 dias. As respectivas áreas livres de células e a incorporação de BrdU foram medidas como descrito anteriormente. Como observado na figura 28 e 29, nenhum efeito de IOME AG-538 sobre o recobrimento da área livre de células e sobre a incorporação de BrdU, respectivamente, foi observado em nossas culturas, sugerindo que a sinalização mediada por receptores de IGF-I / insulina não esteja envolvida no crescimento e proliferação induzidos por lesão mecânica em culturas de células de retina em E8C7. Este resultado, mais uma vez, levanta a possibilidade de participação de outros receptores como o P2Y_{2/4} na proliferação induzida por lesão mecânica em nossas culturas.

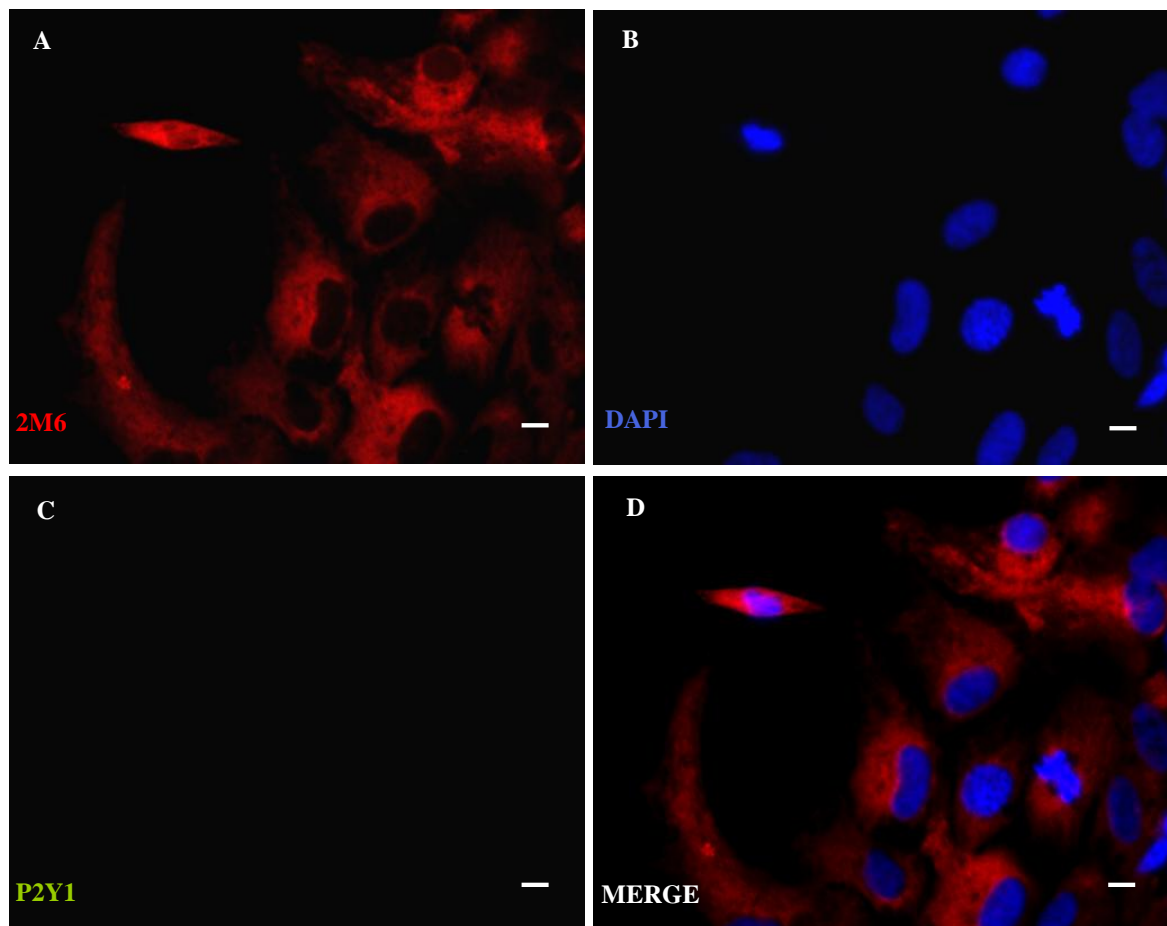


Figura 27: Imunofluorescência para o receptor P2Y₁ e 2M6 em cultura de células de retina com lesão mecânica de monocamada. Culturas de retinas em E8C7 contendo 10⁷ células por placa foram lesadas e fixadas após 2 dias de cultivo. **A)** Marcação para 2M6 na borda da lesão (à direita). **B)** DAPI. **C)** Marcação para o receptor P2Y₁. **D)** Sobreposição das imagens A e C. Imagens representativas de 1 experimento realizado em duplicata. Barra = 10 μm

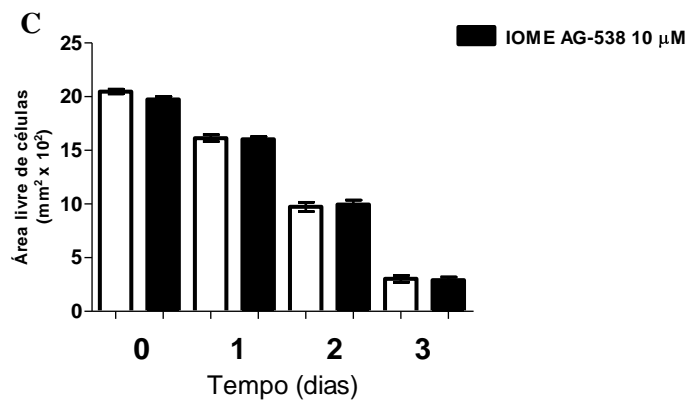
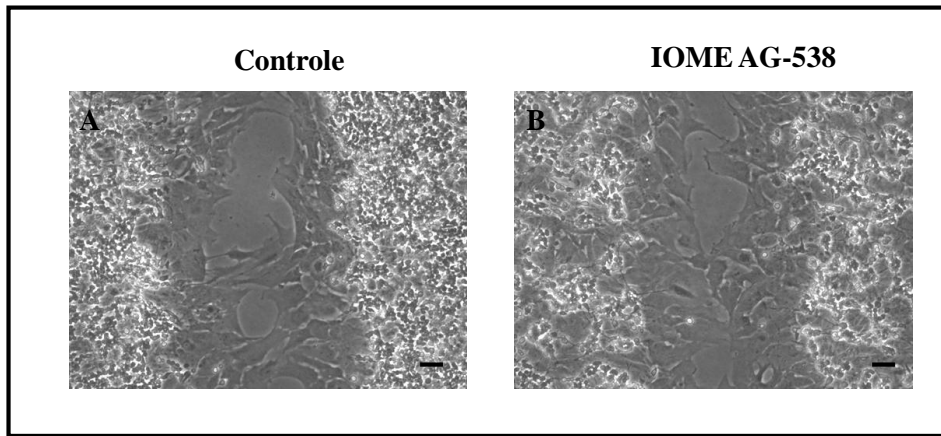


Figura 28: Efeito de IOME AG-538 sobre o crescimento celular induzido por lesão. **A)** Fotomicrografia em contraste de fase de culturas lesadas em E8C7 e cultivadas por 3 dias (controle). **B)** Fotomicrografia de culturas lesadas em E8C7 e cultivadas por 3 dias na presença de IOME AG-538 10 µM. **C)** Quantificação das áreas livres de células em função do tempo de cultivo após a lesão das culturas. Os dados representam a média \pm EPM de ~70 imagens obtidas em 3 experimentos independentes realizados em duplicata. *** $p < 0.001$, comparado com culturas controle, não tratadas com apirase. Barra preta = 20 µm

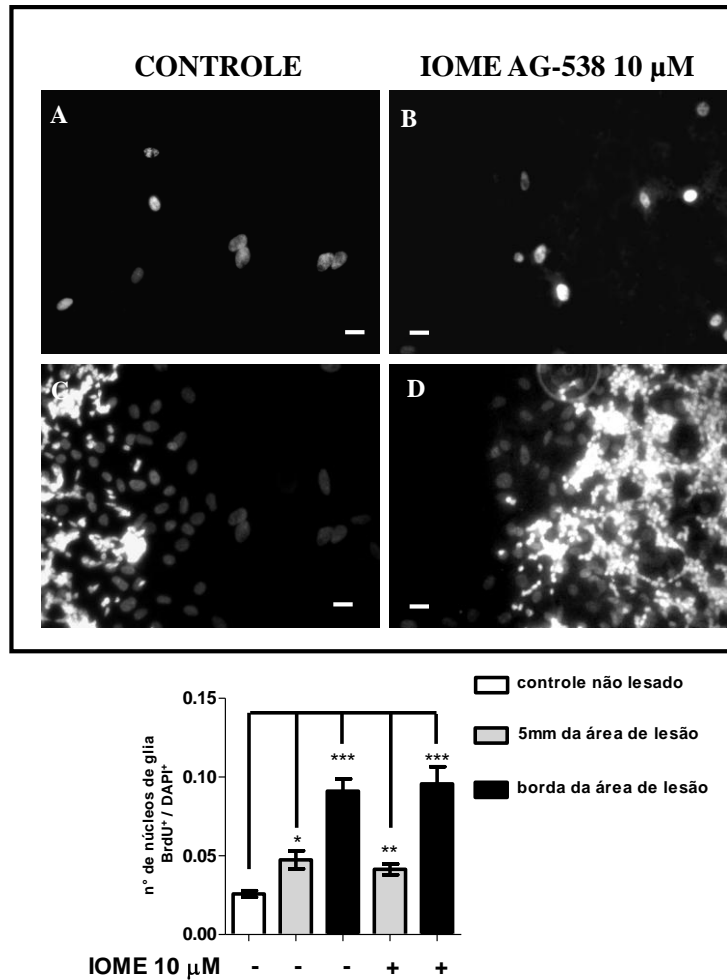


Figura 29: Efeito de IOME AG-538 sobre a proliferação celular induzida por lesão mecânica em culturas de retina. Culturas de células de retina lesadas em E8C7 foram tratadas ou não com IOME (10 μ M) durante 2 dias. Após este período, as culturas foram incubadas com BrdU por 4 h, fixadas com PFA 4% e processadas para imunocitoquímica em E8C9. **A)** Imunorreatividade para BrdU na borda da lesão em culturas controle. **B)** Imunorreatividade para BrdU na borda da lesão em culturas tratadas com IOME. **C e D)** DAPI. **E)** Quantificação da proporção de células BrdU⁺ em culturas tratadas ou não com IOME. Barra branca = culturas controle, não lesadas. Barras cinzas = quantificação em áreas distantes 5 mm da borda da lesão. Barras pretas = bordas da lesão. Os dados representam a média de ~ 6 a 11 imagens obtidas de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, comparado com as culturas não tratadas com IOME. Barra branca = 10 μ m.

5- Discussão:

Em trabalhos anteriores, o nosso grupo demonstrou que um dos receptores purinérgicos envolvidos na proliferação celular na retina de galinha em desenvolvimento é o receptor P2Y₁. Uma vez ativado este receptor dispara, de forma independente, pelo menos duas vias de transdução de sinal que levam ao aumento na incorporação de [³H]-timidina. Uma delas é a ativação seqüencial da PLC, PKC e MAPK (Sanches *et al.*, 2002, Nunes *et al.*, 2007) e a outra via é a ativação da PI3K/AKT (Ornelas 2007). Nesta tese, demonstramos que a proliferação celular induzida por ATP ou ADP depende da participação de receptores catalíticos do tipo tirosina cinase, incluindo os receptores de IGF-I/Insulina que foram abordados mais detalhadamente. A ativação de receptores P2Y₁ por ATP/ADP promove um aumento na forma fosforilada do receptor de IGF-I/Insulina concomitante com um aumento dependente de endocitose na fosforilação de IRS-I, ERK e AKT. A associação entre estes receptores tirosina cinase e a proliferação celular em células de retina em cultura parece ocorrer somente em fases precoces do desenvolvimento, uma vez que, em culturas mais diferenciadas submetidas à lesão mecânica, somente o ATP parece participar do processo de crescimento e proliferação celular.

Como pode ser observado na figura 6 desta tese, tanto o K252a quanto a genisteína e o IOME AG-538 inibiram completamente a proliferação celular induzida por ADP em culturas de células de retina. Este resultado sugere fortemente que receptores tirosina cinase participem, em conjunto com receptores P2, na proliferação de precursores tardios de retina de galinha. A participação conjunta de receptores para nucleotídeos e fatores tróficos em fenômenos proliferativos na retina de outras espécies também foi demonstrada (Milenkovic *et al.*, 2003). Neste trabalho, foi observado que o estímulo de receptores P2Y em culturas purificadas de glia de Müller de coelho

promove um aumento na liberação de cálcio intracelular que acarreta a liberação de PDGF. Este, por sua vez, estimula receptores PDGF- α que induzem a ativação de metaloproteases que clivam moléculas de HB-EGF ancoradas à porção extracelular da membrana plasmática, estimulando receptores de EGF. Estes receptores então ativam a via da Ras, Raf, MEK e ERK_{1/2} e da PI3K, resultando em aumento de proliferação celular.

Em retina de ratos neonatos em cultura, o tratamento com IGF-I 10ng/mL, por 24 e 48 horas, induz um aumento de aproximadamente 50% na proliferação celular (Medina, 2008). Na retina embrionária de pinto, Calvaruso e colaboradores (1996) demonstraram que o IGF-I é um fator abundante capaz de aumentar cerca de 20 - 45% a incorporação de [³H]-timidina em explantes de retina cultivados por 2 dias em meio livre de soro. Nesta tese, culturas de células de retina tratadas com IGF-I 100 ng/mL, tanto na presença, quanto na ausência de soro fetal bovino, não apresentaram alterações na incorporação de [³H]-timidina nas fases do desenvolvimento estudadas (Figura 7). Uma possibilidade para explicar a ausência de efeito de IGF-I em nossas culturas seria a liberação deste fator por células da retina e sua presença no meio extracelular durante o cultivo. Corroborando esta idéia, Calvaruso e colaboradores (1996) detectaram cerca de 110 - 115 ng/mL de IGF-I em meios condicionados de culturas de retina de galinha obtidas a partir de embriões com 7 dias, uma concentração de IGF-I mais do que suficiente para ativar receptores de IGF-I em células de retina. Também de acordo com esta idéia, nossos dados mostraram que a adição do antagonista de receptores para IGF-I/Insulina IOME AG-538 induz uma redução significativa de ~ 71% na incorporação de [³H]-timidina basal em nossas culturas (Figura 6C), sugerindo a presença deste fator no meio de cultura. Entretanto, a observação de que IGF-I sozinho não é capaz de aumentar a incorporação de [³H]-timidina em nossas culturas como ocorre com ATP ou ADP

sugere que este fator em vez de ter um papel direto na indução de proliferação, tenha a função de dar competência às células para responder a outros fatores. Esta idéia é reforçada pela observação de que diversos fatores de crescimento como EGF, FGF e o próprio IGF-I são capazes de induzir proliferação de diversos tipos celulares quando associados, mas não quando adicionados sozinhos às células (para revisão: Ye e D'Ercole, 2006)

Os resultados desta tese também revelaram que tanto ATP/ADP (Figuras 9 e 10) quanto IGF-I (Figura 8) são capazes de ativar as vias das ERKs e da PI3K/AKT em culturas de células de retina de embrião de galinha. Entretanto, a cinética de ativação da AKT induzida por ATP/ADP ou por IGF-I foi diferente. Enquanto a fosforilação da AKT induzida por IGF-I pode ser observada até 60 min de estímulo, o curso temporal de fosforilação da AKT induzido por ATP/ADP foi transitório, sendo a fosforilação detectada somente nos primeiros 5 min de estímulo. Sabendo que diferenças no curso temporal de ativação da AKT podem resultar na ativação e/ou inibição de alvos intracelulares diferentes (Basso *et al.*, 2002), é possível que a ativação sustentada da AKT por IGF-I induza a ativação de alvos distintos daqueles envolvidos na proliferação celular induzida por receptores P2 em nossas culturas, o que também poderia explicar a falta de efeito deste fator na proliferação celular em nossas culturas. A análise dos alvos intracelulares afetados pela ativação de receptores de IGF-I e por receptores de nucleotídeos em nossas culturas poderia esclarecer melhor esta questão.

A ativação de receptores P2Y₁ na retina embrionária de pinto (Sanches *et al.*, 2002; França *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007) e de receptores para IGF-I em outros tipos celulares (Guse *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 2006) promove a ativação da fosfolipase C (PLC) e a consequente formação intracelular de IP₃. Nossos dados mostraram que o tratamento com IOME AG-538 foi capaz de inibir parcialmente a formação de [³H]-

fosfoinosítídeos induzido por ADP em culturas de células da retina (Figura 12). Além disto, o estímulo de receptores P2Y por ATP/ADP promoveu um aumento na fosforilação de receptores para IGF-I/Insulina, além de um aumento na ativação de IRS-I, da ERK e da AKT. Todos estes efeitos foram inibidos pelo antagonista de receptores para IGF/Insulina, IOME AG-538. Com base nestes resultados, consideramos plausível postular a ocorrência de transativação entre receptores P2Y₁ e receptores para IGF-I/Insulina na indução de proliferação de progenitores tardios de células bipolares/glia de retina de galinha mantidos em cultura. Como relatado no início desta discussão, mecanismo semelhante de transativação entre receptores de nucleotídeos P2 e receptores para EGF foi observado em células de Müller de retina de coelho (Milenkovic *et al.*, 2003). Além disto, diversos trabalhos da literatura mostraram que receptores acoplados à proteína G são capazes de transativar receptores catalíticos (para revisão: Lee *et al.*, 2002). Por exemplo, em 2005 van Kolen e colaboradores, mostraram que a ativação de receptores P2Y₁₂ em culturas de células de glioma C6 de ratos, promove a transativação de receptores para IGF-I, o que resulta na ativação da AKT por um mecanismo dependente de cálcio, Src, Pyk2 e PLD2.

A participação da via da Src em mecanismos de transativação de receptores acoplados à proteína G e receptores tirosina cinase vem sendo exaustivamente demonstrada (Lee e Chao, 2001; Lee *et al.*, 2002; Rajagopal *et al.*, 2004; Rajagopal e Chao, 2006). Além disso, no sistema purinérgico, receptores P2Y₂ apresentam dois domínios para associação com a Src na cauda C-terminal (para revisão: Weisman *et al.*, 2005). Os dados relatados nesta tese sugerem que a proliferação celular induzida por ADP na retina de galinha em desenvolvimento ocorra de forma independente da Src, uma vez que os inibidores desta enzima, a Herbimicina A e o PP1, não apresentaram nenhum efeito sobre a proliferação celular induzida por ADP (Figura 13). Além disto,

tendo em vista que receptores de IGF-I parecem participar da proliferação de progenitores induzida por nucleotídeos em nossas culturas, estes dados também sugerem que a Src não esteja envolvida na transativação de receptores de IGF-I por receptores P2Y em nossas culturas. Entretanto, a participação de outras tirosinas cinases citoplasmáticas, insensíveis a estes inibidores, não pode ser descartada.

Dados recentemente publicados no início desta tese mostraram que a proliferação de progenitores tardios da retina de galinha induzida por ATP ocorre de forma concomitante com a dessensibilização da formação de derivados fosforilados de inositol (InsPs) induzida pelo agonista (França *et al.*, 2007). Os resultados relatados aqui mostraram que o tratamento de culturas de retina de galinha com os inibidores de endocitose MDC e CPZ foi capaz de inibir a proliferação celular induzida por ADP, sugerindo que a dessensibilização de receptores P2Y seguida por endocitose seja um fenômeno necessário para proliferação celular induzida por ADP em nosso modelo.

A formação de segundos mensageiros mediada pela ativação por agonistas de receptores acoplados à proteína G muitas vezes é rapidamente atenuada por dessensibilização seguida de endocitose. Classicamente, a endocitose mediada por clatrina inicia-se com a fosforilação da cauda C-terminal do receptor pela PKA, PKC e GRKs (para revisão: Barki-Harrington e Rockman, 2008). As GRKs, quando ativadas, geram sítios de ligação de β -arrestinas no receptor que bloqueiam a interação do receptor com as PTGs e mediam a interação do complexo AP-2 com a clatrina, facilitando a endocitose destes receptores. Por outro lado, β -arrestinas podem servir como moléculas adaptadoras que possibilitam que proteínas envolvidas em proliferação e crescimento celular como a Raf, a ERK e a AKT sejam ativadas durante a endocitose (para revisão: Sorkin e Zastrow, 2009). Estas observações têm levado diversos autores a relacionar a endocitose de receptores acoplados à proteína G com determinados

fenômenos tais como a síntese de DNA e migração celular (DeWire *et al.*, 2007). No presente trabalho, além da inibição da proliferação celular induzida por ADP, observamos que inibidores de endocitose como o MDC são capazes de bloquear completamente a ativação das ERKs e da AKT induzida por ADP em nossas culturas, sugerindo que a ativação destas enzimas pelo nucleotídeo seja dependente de endocitose mediada por clatrina.

A relação entre transativação de receptores, endocitose e ativação da via das ERKs também vem sendo demonstrada. Pierce e colaboradores (2001) mostraram que a ativação da via das ERKs em células COS-7 transfectadas com receptores β_2 -adrenérgicos ocorre de forma dependente de endocitose e transativação de receptores de EGF. Maudsley e colaboradores (2000) mostraram nestas células que a ativação prolongada de receptores β_2 -adrenérgicos com isoproterenol provoca a fosforilação da alça C-terminal do receptor β_2 -adrenérgico pela GRK2, ancoramento de β -arrestinas e da Src, a transativação de receptores para EGF, endocitose e ativação da via das ERKs. Kim e colaboradores (2009) ainda mostraram que a proliferação de células musculares lisas de ratos induzida por receptores para angiotensina 2 ocorre de forma independente da ativação de proteínas G, mas dependente de endocitose mediada por β -arrestina/clatrina seguida de transativação de receptores de EGF e ativação da via das ERKs. Nesta tese, verificamos que tanto a proliferação celular quanto a fosforilação da ERK e da AKT induzida por ADP parecem ser dependentes da ativação de receptores para IGF-I/In. Além disto, observamos que a inibição da endocitose por MDC foi capaz de bloquear tanto a proliferação celular quanto a fosforilação do receptor de IGF-I/In, do IRS-I e das vias das ERKs e AKT induzidas pelo nucleotídeo (Figura 16 e 17). Entretanto, a fosforilação do receptor de IGF-I/In e das vias das ERKs e da AKT induzida pelo próprio IGF-I não foi bloqueada pelo inibidor MDC (Figura 18). Estes

resultados em conjunto sugerem que a proliferação induzida por ATP/ADP de precursores tardios de retina de galinha em cultura ocorre de forma dependente de endocitose, sendo este processo envolvido na transativação de receptores de IGF-I/In e na ativação da via das ERKs e da AKT. A observação de que a ativação direta da ERK e da AKT por IGF-I é independente do processo de endocitose mediada por clatrina não só reforça a idéia de que este processo seja necessário para a proliferação celular em nossas culturas como também poderia ser uma explicação para a ausência de detecção de proliferação em culturas tratadas somente com IGF-I. Experimentos complementares serão necessários para definir se receptores P2Y₁ são endocitados durante a estimulação das culturas com nucleotídeos e de que maneira a endocitose destes sítios é capaz de induzir a transativação de receptores de IGF-I.

A importância fisiológica do fenômeno de gliose reativa na retina permanece ainda controversa. Se por um lado células de Müller, ao re-entrarem no ciclo celular, (Dyer e Cepko, 2000; Bringmann e Reichenbach, 2001) acabam gerando progenitores neurogênicos (Reh e Fischer, 2001; Fischer e Reh, 2003), por outro lado, a gliose reativa neste tecido pode contribuir para a degeneração neural e formação de regiões inativas neurofisiologicamente que preenchem o espaço deixado pela degeneração de fotorreceptores, neurônios, epitélio pigmentado e vasos sanguíneos, o que impede o reparo e remodelamento funcional do tecido retiniano (para revisão: Bringmann *et al.*, 2006).

A proliferação celular induzida por ATP em culturas de retina ocorre durante um período restrito do desenvolvimento embrionário. Na figura 1 do artigo em anexo, observamos que células de retina de E7 mantidas em cultura perdem a capacidade de responder ao ATP, em termos de proliferação celular, após o 3^o dia de cultivo. Neste trabalho também mostramos que células mais diferenciadas liberam fatores solúveis

maiores do que 12 kDa que são capazes de inibir a proliferação celular induzida por ATP. Com base nestes achados, postulamos que o ATP, em condições não lesivas, é capaz de promover a proliferação de precursores retinianos tardios, sendo este efeito do nucleotídeo controlado pela própria retina que, na medida em que amadurece, bloqueia a re-entrada de células quiescentes no ciclo celular.

Na última parte desta tese, analisamos o crescimento e proliferação de células gliais em culturas mais desenvolvidas (E8C7) submetidas à lesão mecânica da monocamada de células. Nossos dados revelaram que células de Müller destas culturas foram capazes de re-entrar no ciclo celular, proliferar e recobrir a área livre de células devido à lesão da monocamada. Isto porque um aumento consistente na incorporação de BrdU em células, principalmente em regiões da borda da lesão, foi observado (Figura 22). Além disso, 3 dias após a lesão, um preenchimento quase completo da área de lesão por células positivas para o marcador 2M6 foi observado (Figura 21).

Diversos trabalhos mostraram que células de Müller respondem inicialmente a lesões com a produção de fatores tróficos, em particular, o FGFb (para revisão: Zahs e Esguerra, 2006). No presente trabalho, nenhum efeito de FGFb foi detectado em culturas de retina de embrião de pinto lesadas em E8C7 e sequencialmente tratadas com este fator (dados não mostrados). Entretanto, o crescimento celular sobre a área de lesão foi inibido tanto por apirase, uma enzima que causa a hidrólise do ATP em AMP (Figura 23), quanto por antagonistas de receptores purinérgicos (RB-2, suramina e PPADS). Estes resultados sugerem que ATP, presente nas culturas ou liberado durante a lesão mecânica da monocamada de células, esteja envolvido na proliferação e migração de células gliais sobre a área de lesão. Esta idéia está de acordo com diversos trabalhos que têm mostrado o envolvimento de ATP no fenômeno de gliose reativa induzida por lesão de astrócitos obtidos do sistema nervoso central de ratos adultos (Neary *et al.*,

1996, Rathbone *et al.*, 1999; Neary *et al.*, 2003). Além disto, nossos resultados estão de acordo com outros trabalhos que mostraram um aumento de proliferação celular em retinas que sofreram lesão que pode ser relacionado com um aumento de sinalização purinérgica neste tecido (Bringmann *et al.*, 2003; Dale, 2008). Em retina de galinha, por exemplo, a degeneração promovida por luz provoca gliose de células de Müller seguida por um aumento na expressão de receptores P2Y₁ (Ward e Fletcher., 2009). Desta forma, nossos dados em conjunto com os dados da literatura sugerem fortemente que o ATP seja um dos principais fatores que participam na gliose reativa de células de Müller em cultura.

Como descrito anteriormente, o receptor purinérgico envolvido com a proliferação de progenitores tardios de células bipolares/glia na retina de galinha em desenvolvimento é o P2Y₁ (Sanches *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2007). Entre os antagonistas purinérgicos investigados nesta tese, o RB-2 e a suramina foram os compostos com maior eficácia na inibição do crescimento glial sobre a área de lesão nas culturas de retina (Figura 24). Além disso, o RB-2 foi capaz de inibir completamente a incorporação de BrdU em células localizadas na borda da lesão (Figura 25). Tendo em vista que RB-2 é um antagonista que inibe com maior eficácia a resposta de receptores P2Y_{2/4}, nossos resultados sugerem que o principal receptor purinérgico ativado em resposta à lesão de culturas de retina de embrião de galinha mais diferenciadas seja o receptor purinérgico do tipo P2Y_{2/4} e não o receptor P2Y₁ envolvido na proliferação de progenitores tardios. A favor desta hipótese está a nossa observação de que o receptor purinérgico P2Y₁ não foi detectado através da técnica de imunocitoquímica em culturas mais diferenciadas de E8C9 previamente submetidas a lesão em E8C7, mas foi nitidamente detectado em culturas pouco diferenciadas de E7C1, tanto em células 2M6 positivas (Figura 26, seta branca) quanto 2M6 negativas (Figura 26, seta amarela).

Experimentos adicionais de imunocitoquímica para os receptores P2Y₂ e P2Y₄ podem ajudar a esclarecer esta questão.

A proliferação de precursores tardios de células bipolares e glia (E7C1) depende de transativação de receptores purinérgicos com receptores para IGF-I/Insulina, como descrito na primeira parte desta tese. Entretanto, o tratamento com o antagonista IOME AG-538 de culturas de retinas mais diferenciadas (E8C7) submetidas à lesão mecânica não resultou em nenhuma inibição no crescimento/migração ou proliferação celular determinada pela incorporação de BrdU (Figura 28 e 29). Este resultado, mais uma vez, levanta a possibilidade de participação de outros receptores purinérgicos ou mecanismos, distintos daqueles envolvidos na proliferação de progenitores, na proliferação glial induzida por lesão mecânica em nossas culturas mais diferenciadas. Enquanto durante o desenvolvimento precoce da retina, a proliferação celular induzida por ATP depende da participação conjunta de receptores P2Y₁ e de fatores tróficos, como o receptor de IGF-I/insulina, em culturas de retina mais maduras o receptor P2Y₁ parece ser regulado negativamente e a proliferação de células gliais dependente de ATP envolver outros receptores purinérgicos. Novamente, experimentos adicionais de imunocitoquímica para os diversos subtipos de receptores purinérgicos poderão ajudar a desvendar este ponto.

6- Conclusão:

1. A proliferação celular induzida por ATP/ADP depende da participação de receptores para IGF-I/Insulina;
2. O tratamento de células de retina em cultura somente com IGF-I não promove estímulo da proliferação celular, porém o antagonista do receptor, IOME AG-538 inibe a proliferação basal, sugerindo que o IGF-I, em nosso modelo, participe como um fator que proporciona um estado de competência proliferativa.
3. A ação conjunta do ATP com o IGF-I na proliferação celular de precursores retinianos se dá por um mecanismo de transativação entre receptores P2 com receptores de IGF-I/Insulina.
4. A transativação entre estes receptores ocorre por um mecanismo independente de Src, mas dependente de endocitose (Figura 30).
5. Este mecanismo de proliferação celular mediado por transativação entre receptores P2 e IGF-I/Insulina parece estar restrito a proliferação de precursores tardios da retina (E7C1), uma vez que culturas de retina mais diferenciadas (E8C7) submetidas a lesão mecânica, proliferam de forma dependente de ATP, mais independente de IGF-I/Insulina (Figura 31).
6. O receptor P2 envolvido na proliferação celular induzida por lesão é, provavelmente, o receptor P2Y_{2/4} uma vez que o antagonista RB-2 foi se mostrou mais eficaz no bloqueio do crescimento e da proliferação celular induzida por lesão. Além disso, o receptor P2Y₁ foi detectado somente em culturas de precursores tardios.

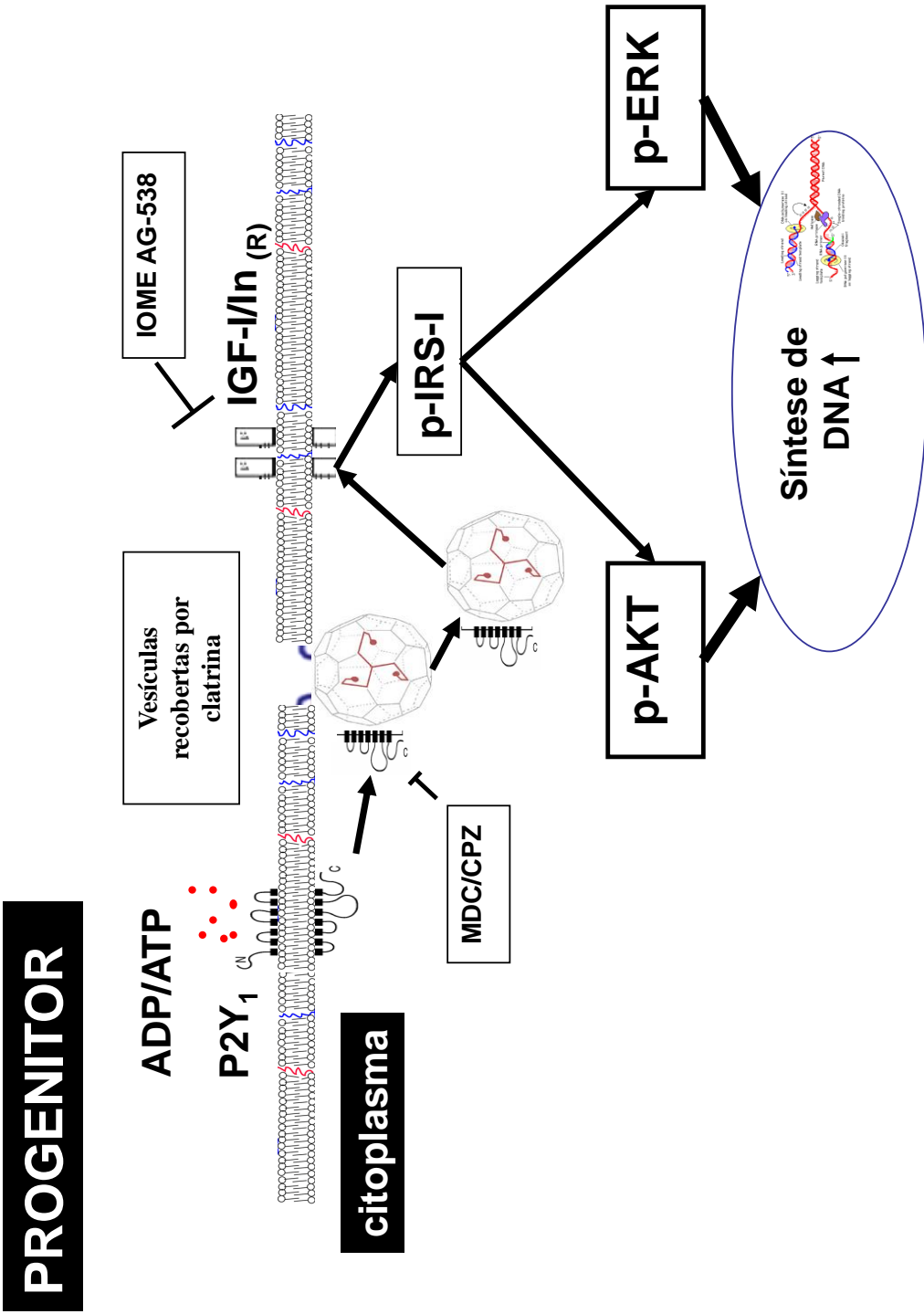


Figura 30: Modelo esquemático de proliferação celular induzida por ATP/ADP em culturas de retinas em E7C1. A endocitose de receptores P2Y₁ promove a transativação com receptores de IGF-I/Insulina de forma dependente de endocitose. Em seguida ocorre a ativação do substrato responsivo à insulina (IRS-I), levando a ativação da ERK e AKT, resultando em indução de proliferação celular. MDC: monodancil-cadaverina; CPZ: clorpromazina; IOME AG-538: antagonista de receptores de IGF-I/Insulina.

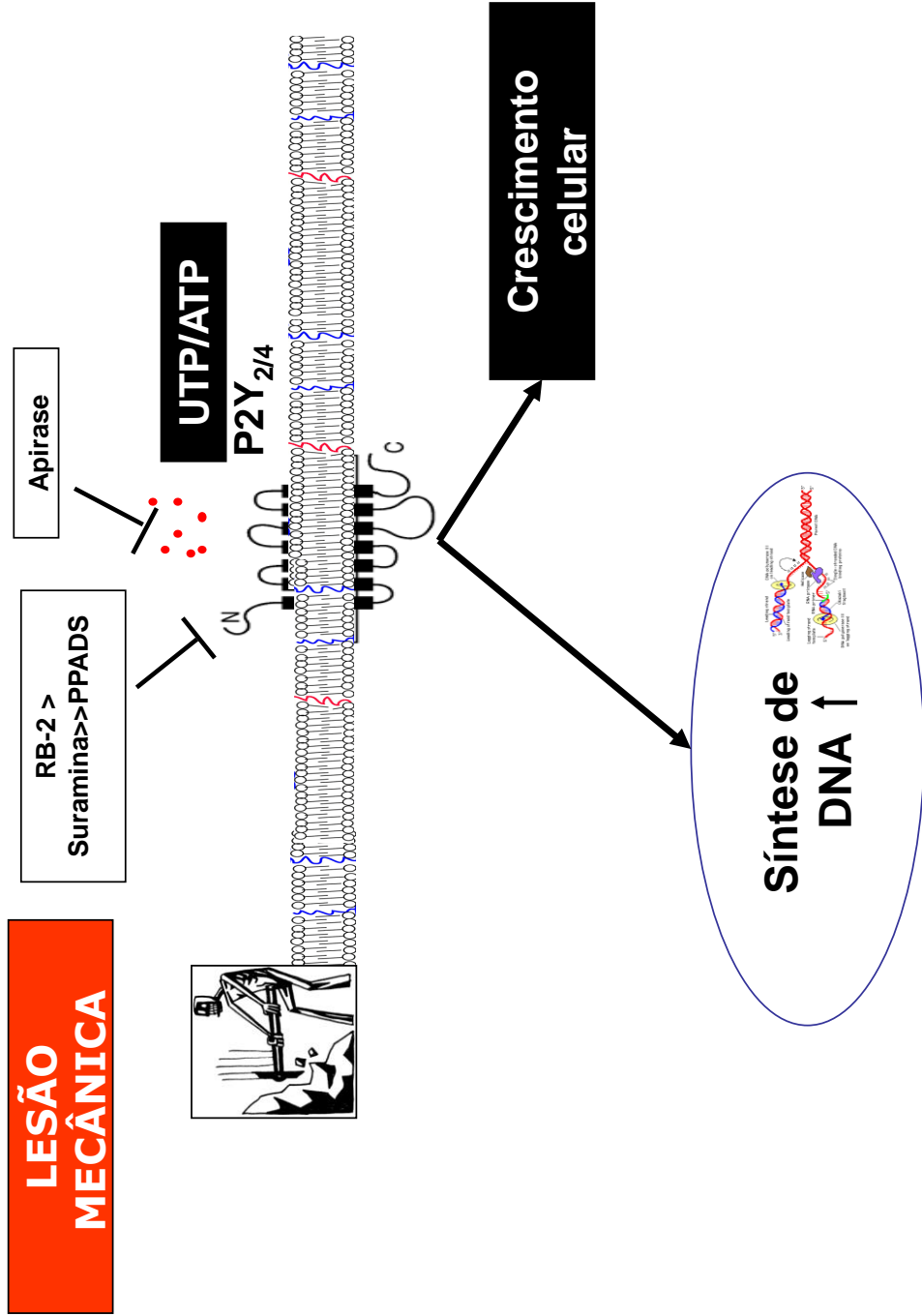


Figura 31: Modelo esquemático da proliferação celular induzida por lesão em culturas de retinas em E8C7. A lesão mecânica resulta em aumento de proliferação e crescimento celular, um efeito que é inibido por apirase, e pelos antagonistas purinérgicos RB-2, suramina e PPADS.

7- Referências Bibliográficas:

Abbracchio MP and Burnstock G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445-475.

Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S and Cattabeni F. (1999). Signalling mechanisms involved in P2Y receptor-mediated reactive astrogliosis. *Prog. Brain Res.* 120, 333-342.

Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA and Burnstock G. (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 52-55.

Abdipranoto A, Liu GJ, Werry EL and Bennett MR. (2003). Mechanisms of secretion of ATP from cortical astrocytes triggered by uridine triphosphate. *Neuroreport.* 14, 2177-2181.

Ballerini P, Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P and Caciagli F. (1995). Influence of Ca²⁺ channel modulators on [³H]purine release from rat cultured glial cells. *Neurochem. Res.* 20, 697-704.

Ballerini P, Rathbone MP, Di Iorio P, Renzetti A, Giuliani P, D'Alimonte I, Trubiani O, Caciagli F and Ciccarelli R. (1996). Rat astroglial P2Z (P2X₇) receptors regulate intracellular calcium and purine release. *Neuroreport.* 7, 2533-2537.

Ballerini P, Di Iorio P, Ciccarelli R, Nargi E, D'Alimonte I, Traversa U, Rathbone MP and Caciagli F. (2002). Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *Neuroreport.* 13, 1789-1792.

Barki-Harrington L and Rockman HA. (2008). Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology (Bethesda).* 23, 17-22.

Barton JF, Hardy AR, Poole AW and Mundell SJ. (2008). Reciprocal regulation of platelet responses to P2Y and thromboxane receptor activation. *J. Thromb. Haemost.* 6, 534-543.

Bassnett S and Beebe DC. (1990). Localization of insulin-like growth factor-1 binding sites in the embryonic chicken eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 1637-43.

Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tschlis P and Rosen N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* 18, 39858-66.

Baurand A, Eckly A, Hechler B, Kauffenstein G, Galzi JL, Cazenave JP, Leon C and Gachet C. (2005). Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol. Pharmacol.* 67, 721-733.

- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brambilla R, Neary JT, Cattabeni F, Cottini L, D'Ippolito G, Schiller PC and Abbracchio MP. (2002). Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling. *J. Neurochem.* 83, 1285-1296.
- Bringmann A and Reichenbach A. (2001). Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front. Biosci.* 6, E72-92.
- Bringmann A, Pannicke T, Francke M, Milenkovic I, Weick M, Uckermann O, Uhlmann S, Wiedemann P and Reichenbach A. (2003). Proliferation of retinal glial (Müller) cells: role of P2 receptors and potassium channels. *Biomed. Res.* 14, 38-46.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN and Reichenbach A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 397-424.
- Bunchthal F and Folkow B. (1948). Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. *Acta Physiologica Scandinavica.* 15, 150-160.
- Burnstock G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacology Reviews.* 24, 509-581.
- Burnstock G. (1991) Distribution and roles of purinoceptor subtypes. *Nucleosides and Nucleotides.* 10: 917-930.
- Burnstock G. (1993). Physiological and pathological roles of purines: an update. *Drug Development Research.* 28, 195-206.
- Burnstock G. (2004). Introduction: P2 receptors. *Curr. Top Med. Chem.* 4, 793-803.
- Butt AJ, Firth SM and Baxter RC. (1999). The IGF axis and programmed cell death. *Immunology and Cell Biology.* 77, 256-262.
- Calvaruso G, Vento R, Giuliano M, Lauricella M, Gerebino E and Tesoriere G. (1996). Insulin-Like growth factors in chick embryo retina during development. *Regulatory Peptides.* 61, 19-25.
- Cavaliere F, Florenzano F, Amadio S, Fusco FR, Viscomi MT, D'Ambrosi N, Vacca F, Sancesario G, Bernardi G, Molinari M and Volontè C. (2003). Up-regulation of P2X₂, P2X₄ receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience.* 120, 85-98.
- Ceballos G, Tuttle JB and Rubio R. (1994). Differential distribution of purine metabolizing enzymes between glia and neurons. *J. Neurochem.* 62, 1144-1153.

- Chen CC and Chen WC. (1996). ATP-evoked inositol phosphates formation through activation of P2U purinergic receptors in cultured astrocytes: regulation by PKC subtypes alpha, delta, and theta. *Glia*. 17, 63-71.
- Ciccarelli R, Di Iorio P, Ballerini P, Ambrosini G, Giuliani P, Tiboni GM and Caciagli F. (1994). Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 39, 556-566.
- Ciccarelli R, Di Iorio P, Middlemiss PJ, Ballerini P, D'Alimonte J, Rathbone MP and Caciagli F. (1997) Potential neuroprotective effects of guanine-based purines released from rat cultured astrocytes. *In: Proceedings of the 11° International EPHAR Meeting, Drug Targets in Heart and Brain Ischemia*, p. 39.
- Cloues R. (1995). Properties of ATP-gated channels recorded from rat sympathetic neurons: voltage dependence and regulation by Zn²⁺ ions. *J. Neurophysiol.* 73, 312-319.
- Cobb MH and Goldsmith EJ. (1995). How *MAP* kinases are regulated. *J. Biol.* 23; 14843-6.
- Cogan D. (1966) Neurology of Visual System (Thomas C.C. ed) *Springfeld, Illions, USA*.
- Collis MG and Hourani SM. (1993). Adenosine receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 360-366.
- Cotrina ML, Lin JH, Lopez-Garcia JC, Naus CC and Nedergaard M. (2000). ATP-mediated glia signaling. *J. Neurosci.* 20, 2835-2844.
- Cunha RA. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38, 107-125.
- Dale N. (2008). Dynamic ATP signalling and neural development. *J. Physiol.* 586, 2429-2436.
- Dalle S, Ricketts W, Imamura T and Vollenweider P. (2001) Insulin and insulin-like growth factor I receptors utilize different G protein signaling components. *J. Biol. Chem.* 11, 15688- 15695.
- Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D and MacVicar BA. (2003). ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J. Neurophysiol.* 89, 1870-1877.
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C and Ullrich A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature.* 379, 557-560.
- de la Rosa EJ, Bondy CA and Hernandez-Sanchez C. (1994). Insulin and insulin-like growth factor system components gene expression in the chicken retina from early

- neurogenesis until late development and their effect on neuroepithelial cells. *Eur. J. Neurosci.* 6, 1801–10.
- DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ and Shenoy SK. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 483–510.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G and Baricordi OR. (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 97, 587-600.
- Drury AN and Szent-Gyorgyi A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 68, 213-237.
- Dyer MA and Bremner R. (2005). The search for the retinoblastoma cell of origin. *Nat. Rev. Cancer.* 5, 91-101.
- Dyer MA and Cepko CL. (2000). Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat. Neurosci.*, 3, 873–80.
- Emmelin N and Feldberg W. (1948). Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br J Pharmacol. Chemother.* 3, 273-284.
- Erb L, Liao Z, Seye CI and Wiesman GA. (2006). P2 receptor: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452, 552-62.
- Ferguson SS. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53, 1-24.
- Fischer AJ and Reh TA. (2001). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat. Neurosci.* 4, 247–252.
- Fischer AJ and Reh TA. (2003). Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia.* 43, 70–6.
- Fields RD and Burnstock G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 423-436.
- Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, Vallis Y, Owen DJ, Gibson A, Hopkins CR, Evans PR and McMahon HT. (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science.* 291, 1051-1055.
- França GR, Freitas RC and Ventura AL. (2007). ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 283-291.
- Franke H, Günther A, Grosche J, Schmidt R, Rossner S, Reinhardt R. (2004). P2X₇ receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 686– 699.

- Franke H and Illes P. (2006). Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol. Ther.* 109, 297-324.
- Fredholm BB and Dunwiddie TV. (1988). How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 130-134.
- Fujita S and Horii M. (1963). Analysis of Cytogenesis in Chick Retina by Tritiated Thymidine Autoradiography. *Arch. Histol. Jpn.* 23, 359-366.
- Gailly P, Boland B, Paques C, Himpens B, Casteels R, Gillis JM. (1993). Post-receptor pathway of the ATP-induced relaxation in smooth muscle of the mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 110, 326-30.
- Galindo A, Krnjevic K and Schwartz S. (1967). Micro-iontophoretic studies on neurones in the cuneate nucleus. *J. Physiol.* 192, 359-377.
- Gao L, Blair LA, Salinas GD, Needleman LA and Marshall J. 2006. Insulin-like growth factor-1 modulation of CaV1.3 calcium channels depends on Ca²⁺ release from IP₃-sensitive stores and calcium/calmodulin kinase II phosphorylation of the alpha1 subunit EF hand. *J Neurosci.* 7, 6259-68.
- Greenwood D, Yao WP and Housley GD. (1997). Expression of the P2X₂ receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the retina. *NeuroReport.* 8, 1083-8.
- Guse AH, Kiess W, Funk B, Kessler U, Berg I and Gercken G. (1992). Identification and characterization of insulin-like growth factor receptors on adult rat cardiac myocytes: linkage to inositol 1,4,5-trisphosphate formation. *Endocrinology.* 130, 145-51.
- Gysbers JW and Rathbone MP. (1996). GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells. *Int. J. Dev. Neuroscience.* 14, 19-34.
- Harden TK, Boyer JL and Nicholas RA. (1995). P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35, 541-579.
- Hardy AR, Conley PB, Luo J, Benovic JL, Poole AW and Mundell SJ. (2005). P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood.* 105, 3552-3560.
- Hernández-Sánchez C, López-Carranza A, Alarcón C, de La Rosa EJ and de Pablo F. (1995). Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 10, 9834-8.
- Ho C, Hicks J and Salter MW. (1995). A novel P2-purinoceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal cord of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 116, 2909-2918.

Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D and Conley PB. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 409, 202-207.

Holton P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.* 145, 494-504.

Housley GD, Bringmann A and Reichenbach A. (2009). Purinergic signaling in special senses. *Trends Neurosci.* 32, 128–141.

Illes P, Klotz KN and Lohse MJ. (2000). Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 295-298.

Iandiev I, Uckermann O, Pannicke T, Wurm A, Pietsch U-C, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A and Uhlmann S. (2006). Glial cell reactivity in a porcine model of retinal detachment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2161–2171.

Johnson-Farley NN, Travkina T and Cowen DS. (2006). Cumulative activation of Akt, and consequent inhibition of glycogen synthase kinase-3, by brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 in cultured hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1062–1069.

Jones JI and Clemmons DR. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Review.* 16, 3-33.

Kahn AJ. (1974). An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev. Biol.* 38, 30-40.

Kastritsis CH, Salm AK and McCarthy K. (1992). Stimulation of the P2Y purinergic receptor on type 1 astroglia results in inositol phosphate formation and calcium mobilization. *J. Neurochem.* 58, 1277-1284.

Khakh BS. (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 165-174.

Khakh BS, Bao XR, Labarca C and Lester HA. (1999). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* 2, 322-330.

Kim SJ, Kim MY, Lee EJ, Ahn YS and Baik JH. (2004). Distinct regulation of internalization and mitogen-activated protein kinase activation by two isoforms of the dopamine D2 receptor. *Mol. Endocrinol.* 18, 640-652.

Kim S, Garcia A, Jackson SP and Kunapuli SP. (2007). Insulin-like growth factor-1 regulates platelet activation through PI3-K – isoform. *Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 110, 4206-13.

Kim J, Ahn S, Rajagopal K and Lefkowitz RJ. (2009). Independent β -Arrestin2 and Gq/Protein Kinase C Pathways for ERK Stimulated by Angiotensin Type 1A Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells Converge on Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 284, 11953–11962.

- Koenig JA and Edwardson JM. (1997). Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 276-287.
- Krupnick JG and Benovic JL. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 289-319.
- Lazarowski ER and Harden TK. (1994). Identification of a uridine nucleotide-selective G-protein-linked receptor that activates phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 269, 11830-11836.
- Lee FS and Chao MV. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 3555-3560.
- Lee FS, Rajagopal R, Kim AH, Chang PC and Chao MV. (2002). Activation of Trk Neurotrophin Receptor Signaling by Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptides. *J. Biol. Chem.* 277, 9096-102.
- Lewis GP and Fisher SK. (2003). Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int. Rev. Cytol.* 230, 263-90.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW and Levison SW. (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* 89, 1092–1100.
- Linseman DA, Benjamin CW and Jones DA. (1995). Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270, 12563-12568.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maudsley S, Pierce KL, Zamah AM, Miller WE, Ahn S, Daakai Y, Lefkowitz RJ and Luttrell LM. (2000). The b2-Adrenergic Receptor Mediates Extracellular Signal-regulated Kinase Activation via Assembly of a Multi-receptor Complex with the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biological Chemistry.* 275, 9572–9580.
- Maudsley S, Martin B and Luttrell LM. (2007). G protein-coupled receptor signaling complexity in neuronal tissue: implications for novel therapeutics. *Curr Alzheimer Res.* 4, 3-19.
- McCusker RH, McCrea K, Zunich S, Dantzer R, Broussard SR, Johnson RW and Kelley KW. (2006). Insulin-like growth factor-I enhances the biological activity of brain-derived neurotrophic factor on cerebrocortical neurons. *J. Neuroimmunol.* 179, 186-190.
- Medina SV and Araújo EG. (2008). IGF-I aumenta a proliferação de células da retina: vias de sinalização envolvidas. *Tese de doutorado – Universidade Federal Fluminense – Niterói, RJ.* 103f.

- Milenkovic I, Weick M, Wiedemann P, Reichenbach A and Bringmann A. (2003). P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1211-1220.
- Moran-Jimenez MJ and Matute C. (2000). Immunohistochemical localization of the P2Y₁ purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 78:50–58.
- Morris VB. (1973). Time differences in the formation of the receptor types in the developing chick retina. *J. Comp. Neurol.* 151, 323-330.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.
- Mousavi SA, Malerød L, Berg T and Kjekken R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.* 1, 1-16.
- Mundell SJ, Jones ML, Hardy AR, Barton JF, Beaucourt SM, Conley PB and Poole AW. (2006). Distinct roles for protein kinase C isoforms in regulating platelet purinergic receptor function. *Mol. Pharmacol.* 70, 1132-1142.
- Neary JT, van Breemen C, Forster E, Norenberg LO and Norenberg MD. (1988). ATP stimulates calcium influx in primary astrocyte cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 1410-1416.
- Neary JT, Zhu Q, Kang Y and Dash PK. (1996). Extracellular ATP induces formation of AP-1 complexes in astrocytes via P2 purinoceptors. *Neuroreport.* 7, 2893-2896.
- Neary JT, Kang Y, Bu Y, Yu E, Akong K and Peters CM. (1999). Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. *J. Neurosci.* 19, 4211-4220.
- Neary JT, Kang Y, Willoughby KA and Ellis EF. (2003) Activation of ERK by stretchinduced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J. Neurosci.* 23, 2348–2356.
- Newman EA and Zahs KR. (1997). Calcium waves in retinal glial cells. *Science.* 275, 844–7.
- Newman EA. (2001). Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J. Neurosci.* 21, 2215-2223.
- Newman EA. (2003). Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J. Neurosci.* 23, 1659–66.
- Nunes PH, Calaza K da C, Albuquerque LM, Fragel-Madeira L, Sholl-Franco A and Ventura AL. (2007). Signal transduction pathways associated with ATP-induced

proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25, 499-508.

Olah ME and Stiles GL. (1990). Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annual Review in Pharmacology. Toxic.* 35: 581-606.

Ornelas IS and Ventura ALM. (2007). Sinalização mediada por nucleotídeos em células de retina em cultura: Participação da via PI3K/AKT/TOR no efeito proliferativo do ATP. *Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. Niterói-RJ.* 73p.

Otaegi G, Yusta-Boyo MJ, Vergaño-Vera E, Méndez-Gómez HR, Carrera AC, Abad JL, González M, de la Rosa EJ, Vicario-Abejón C and de Pablo F. (2006). Modulation of the PI3-kinase–Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells. *J. Cell. Sci.* 1, 2739-48.

Owen DJ, Vallis Y, Pearse BM, McMahon HT and Evans PR. (2000). The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J.* 19, 4216-4227.

Palmer TM and Stiles GL. (1995). Adenosine receptors. *Neuropharmacology.* 34, 683-694.

Pannicke T, Fischer W and Biedermann B. (2000). P2X₇ receptors in Müller glial cells from the human retina. *J. Neurosci.* 20, 5965–72.

Parekh AB and Penner R. (1995). Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 7907-7911.

Patapoutian A and Reichardt LF. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 272-280.

Pearson R, Catsicas M, Becker D and Mobbs P. (2002). Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *J. Neurosci.* 22, 7569-7579.

Pearson RA, Dale N, Llaudet E and Mobbs P. (2005). ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron.* 46, 731-744.

Perez MT, Ehinger BE, Lindstrom K e Fredholm BB. (1986). Release of endogenous and radioactive purines from the rabbit retina. *Brain Res.* 398, 106-112.

Phonphok Y and Rosenthal KS. (1991). Stabilization of clathrin coated vesicles by amantadine, tromantadine and other hydrophobic amines. *FEBS Lett.* 281, 188-190.

Pierce K, Tohgo A, Ahn S, Field M, Luttrell L and Lefkowitz R. (2001). Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 23155–60.

Pintor J, Diaz-Rey MA, Torres M and Miras-Portugal MT. (1992). Presence of diadenosine polyphosphates-Ap₄A and Ap₅A-in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺

dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci. Lett.* 136, 141-144.

Polyak S. (1957). The Vertebrate Visual System. In Kluwer (Ed), *University of Chicago, press.* Chicago (1ed, pp 207-287).

Prada C, Puga J, Perez-Mendez L, Lopez and Ramirez G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur. J. Neurosci.* 3, 1187.

Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K and Petratos S. (2004). Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 15, 415–436.

Puthussery T and Fletcher EL. (2006) P2X2 receptors on ganglion and amacrine cells in cone pathways of the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 496, 595–609.

Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS and Chao MV. (2004). Transactivation of Trk Neurotrophin Receptors by G-Protein-Coupled Receptor Ligands Occurs on Intracellular Membranes. *J. Neurosci.* 24, 6650-8.

Rajagopal R and Chao MV. (2006). A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling. *Mol. Cell Neurosci.* 33, 36-46.

Ralevic V and Burnstock G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413-492.

Rao GN, Delafontaine P and Runge MS. (1995). Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 270, 27871-27875.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, DeLuca B and Jovetich M. (1991). Extracellular guanosine increases astrocyte cAMP: inhibition by adenosine A2 antagonists. *Neuroreport.* 2, 661-664.

Rathbone MP, Deforge S, Deluca B, Gabel B, Laurensen C, Middlemiss P and Parkinson S. (1992). Purinergic stimulation of cell division and differentiation: mechanisms and pharmacological implications. *Med. Hypotheses.* 37, 213-219.

Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P and Caciagli F. (1999). Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59, 663-690.

Richardson PJ and Brown SJ. (1987). ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J Neurochem* 48, 622-630.

Rodieck RW. (1998). The first steps in seeing. Sunderland, M A: Sinauer. Sanchez I, Dynlacht BD (1996) Transcriptional control of the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 318-324.

Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL and Wherther GA. (2005). The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocrinology Reviews*. 26, 916-943.

Salter MW and Hicks JL. (1995). ATP causes release of intracellular Ca²⁺ via the phospholipase C beta/IP₃ pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *J. Neurosci*. 15, 2961-2971.

Sanches G, de Alencar LS and Ventura AL. (2002). ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. *Int. J. Dev. Neurosci*. 20, 21-27.

Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K and Kohsaka S. (2003). Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia*. 44, 242-250.

Schmid SL. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem*. 66, 511-548.

Sellers LA, Simon J, Lundahl TS, Cousens DJ, Humphrey PP and Barnard EA. (2001). Adenosine nucleotides acting at the human P2Y₁ receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis. *J. Biol. Chem*. 276, 16379-16390.

Sholl-Franco A, Fragel-Madeira L, Macama ACCM, Linden R and Ventura ALM. (2010). ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina. *Int. J. Dev. Neurosci*. 28, 63-73.

Spence SG and Robson JA. (1989). An autoradiographic analysis of neurogenesis in the chick retina in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 32, 801-812.

Sorkin A, von Zastrow M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 10, 609-22.

Thakker JK, DiMarchi R, MacDonald K and Caro JF. (1989). Effect of insulin and insulin-like growth factors I and II on phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate breakdown in liver from humans with and without type II diabetes. *J. Biol. Chem*. 5, 7169-75.

Tezel G, Chauhan BC, LeBlanc RP and Wax MB. (2003). Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 44, 3025–3033.

Tulapurkar ME, Schafer R, Hanck T, Flores RV, Weisman GA, Gonzalez FA and Reiser G. (2005). Endocytosis mechanism of P2Y₂ nucleotide receptor tagged with green fluorescent protein: clathrin and actin cytoskeleton dependence. *Cell Mol. Life Sci*. 62, 1388-1399.

van Kolen K, Gilany K, Moens L, Esmans EL and Slegers H. (2006). P2Y₁₂ receptor signalling towards PKB proceeds through IGF-I receptor cross-talk and requires activation of Src, Pyk2 and Rap1. *Cell Signal*. 18, 1169-1181.

- Viscomi MT, Florenzano F, Conversi D, Bernardi G and Molinari M. (2004). Axotomy dependent purinergic and nitrergic co-expression. *Neuroscience*. 123, 393-404.
- von Kugelgen I, and Wetter A. (2000). Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 310–323.
- Waldbillig RJ, Arnold DR, Fletcher RT and Chader GJ. (1991). Insulin and IGF-I binding in developing chick neural retina and pigment epithelium: a characterization of binding and structural differences. *Exp. Eye Res.* 53, 13–22.
- Wang LH, Rothberg KG and Anderson RG. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell. Biol.* 123, 1107-1117.
- Wang Z, Haydon PG and Yeung ES. (2000). Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal. Chem.* 72, 2001-2007.
- Ward MM and Fletcher. (2008) Localization and possible function of P2Y4 receptors in the rodent retina. *Neuroscience*. 155, 1262–1274.
- Ward MM, Fletcher EL. (2009). Subsets of retinal neurons and glia express P2Y1 receptors. *Neuroscience*. 5, 555-66.
- Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, Sun GY, González FA, Seye CI and Erb L. (2005). Molecular determinants of P2Y₂ nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol. Neurobiol.* 31, 169-83.
- Wu KH, Madigan MC, Billson FA and Penfold PL. (2003). Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *Br. J. Ophthalmol.* 87, 1159–1166.
- Yao D, Ehrlich M, Henis YI and Leof EB. (2002). Transforming growth factor-beta receptors interact with AP2 by direct binding to beta2 subunit. *Mol. Biol. Cell.* 13, 4001-4012.
- Ye P, D'Ercole AJ. (2006). Insulin-like growth factor actions during development of neural stem cells and progenitors in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 83, 1-6.
- Yin J, Xu K, Zhang J, Kumar A and Yu FS. (2007). Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 120, 815-825.
- Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Parke K and Ma JX. (2006). Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J. Mol. Endocrinol.* 37, 1–12.
- Zahs K and Esguerra M. (2006). Glial cells in the developing retina. In: *Retinal Development*. Cambridge University Press. 9, 172-192

Zimmermann H. (1994). Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17, 420-426.

Anexo I

ATP-induced proliferation of developing retinal cells: regulation by factors released from postmitotic cells in culture

Guilherme Rapozeiro França, Rodrigo Cesar Carvalho Freitas, Ana Lucia Marques Ventura*

Department of Neurobiology, Neuroimmunology Program, Institute of Biology, Federal Fluminense University, Niterói, Cx. Postal 100180, RJ 24001-970, Brazil

Received 21 March 2007; received in revised form 20 April 2007; accepted 4 May 2007

Abstract

ATP is an important mitogen in the developing retina and its proliferative response decreases as chick retinal cells differentiate in culture. Both non-stimulated or ATP-induced proliferative response was abolished if cycling cells were cocultured with cells from older embryos or cultured with conditioned medium (CM) from postmitotic cells. The effect of CM was dose-dependent and reversible, as removal of CM from the cultures restored both basal and ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine. The effect of CM was also dependent on the developmental stage of the retina used to prepare the medium. As tissues from older embryos were used, inhibition of the basal and ATP-induced proliferative response of the cells increased. Similar inhibition of ATP-induced increase in [³H]-thymidine incorporation was observed using CM from purified glial cultures. Neither ARL 67156, an ecto-ATPase inhibitor, prevented nor TGF- β 1 and TGF- β 2 mimicked the inhibitory effect of conditioned medium. Incubation of cells with CM or ATP for 24 h completely abolished the formation of [³H]-phosphoinositides induced by ATP. These effects were blocked by the P2 receptor antagonist PPADS and were not observed with dialysed CM, suggesting that agonist-dependent desensitization of P2 receptors occurred in cultures incubated with CM. However, removal of small molecules such as nucleotides by dialysis did not affect the decline in the proliferative activity induced by CM, suggesting that desensitization is not responsible for the conditioned medium-dependent cell cycle arrest of early developing retinal cells in culture. These results suggest that factors released from postmitotic cells induce the arrest of retinal cells in the mitotic state, a phenomenon that is concomitant with agonist-dependent P2 receptor desensitization.

© 2007 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nucleotide P2 receptors; Retinal cells proliferation; Receptor desensitization; Chick retina; Differentiated retinal cells

1. Introduction

In the retina, ATP is the predominant endogenous purine that is released through a calcium-dependent mechanism when retina is light-stimulated or depolarized with high extracellular [K^+] or when retinal cells in culture are incubated with glutamate agonists (Newman, 2005; Perez et al., 1986; Santos et al., 1999). Moreover, ATP can also be released from the pigment epithelium (Pearson et al., 2005) or retinal Müller cells in culture (Newman, 2001).

Expression of several P2Y receptors that are G protein-coupled receptors was detected in the retina (Fries et al., 2004). Activation of these sites by ATP and UTP was shown to induce the formation of phosphoinositides (Sanches et al., 2002) and

the mobilization of intracellular calcium (Sakaki et al., 1996; Sugioka et al., 1996) in the chick embryo retina.

Retinal response to ATP is predominant in the beginning of embryonic development and the involvement of P2 purinoceptors in the regulation of DNA synthesis in the retina was already demonstrated (Sugioka et al., 1999a,b; Pearson et al., 2002; Sanches et al., 2002). This effect is primarily associated with Ca^{2+} mobilization from intracellular stores, capacitive Ca^{2+} entry (Sugioka et al., 1996, 1999a,b) and activation of PKC and MAP kinases (Sanches et al., 2002).

Glial expression of P2Y receptors was first demonstrated by experiments showing that a P2Y receptor agonist induces the mobilization of intracellular calcium in purified rabbit Müller cells (Liu and Wakakura, 1998) and that P2 receptor antagonists inhibit the propagation of intercellular calcium waves induced by ATP in cultured rat Müller cells (Newman, 2001). In cultures of these cells, activation of P2Y receptors was clearly demonstrated to increase DNA synthesis (Milenkovic et al., 2003; Moll et al., 2002).

* Corresponding author. Tel.: +55 21 26292274; fax: +55 21 26292268.
E-mail address: almv@vm.uff.br (A.L.M. Ventura).

In the retina, all cell types cease mitosis in an early, close and overlapping succession (Khan, 1974). In the chick embryo, during embryonic days 7 and 8, >75% of the ganglion, horizontal, photoreceptor and amacrine cell precursors are already postmitotic. Two or three days later, most Müller and bipolar cells are also postmitotic (Prada et al., 1991). In a similar way, the number of cycling cells also decreases as development proceeds in the rodent retina (Alexiades and Cepko, 1996; Young, 1985).

In the chick, ATP increases DNA synthesis in retinal cultures prepared from embryos with no more than 7 or 8 days in ovo (Sanches et al., 2002). The decrease in the proliferative response to ATP is coincident with the decline in the proliferative activity observed late in retinogenesis. In the present study, we investigated if postmitotic retinal cells could influence the proliferative response of early developing cells to ATP. Our results show that conditioned medium from more differentiated cells decreases the incorporation of [³H]-thymidine and abolish the proliferative effect of ATP in early developing retinal cells. Desensitization of P2Y receptors was also observed in cultures treated with conditioned medium.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

[³H]-thymidine (5 Ci/mmol) and [³H]-myo-inositol (22.2 Ci/mmol) were from Amersham Biosciences; ATP, pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid (PPADS), glutamine, penicillin G, streptomycin sulfate were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); Basal Medium of Eagle (BME), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Minimal Essential Medium (MEM) were from Invitrogen; Recombinant Human TGF- β 1 and - β 2 were from PeproTech Mexico (Mexico, DF). Trypsin was from Worthington Bichemical (Freehold, NJ, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Retinal cultures

Retinas from White-Leghorn chick embryos were used and monolayer retinal cultures containing both neurons and glial cells (mixed cultures) prepared according to a previously published procedure (De Mello et al., 1982). Neuroretinas from embryos at several stages were dissected from other structures of the eye and immediately transferred to 1 mL of Ca²⁺ and Mg²⁺-free balanced salt solution (CMF). Trypsin, at a final concentration of 0.1%, was then added and the suspension incubated at 37 °C for 20–25 min. Trypsin solution was removed and the retinas resuspended in BME or MEM containing 2% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. The tissues were mechanically dissociated by successive aspirations of the medium. For experiments measuring the formation of [³H]-phosphoinositides, 10⁷ cells were seeded on plastic 35 mm culture dishes (1.04 \times 10⁴ cells/mm²). For experiments measuring the incorporation of [³H]-thymidine, cells were seeded on culture dishes at a density of 3 \times 10⁶ cells/dish (3.1 \times 10³ cells/mm²). Drugs were added at least 2–4 h after the preparation of the cultures. Cells were, then, incubated at 37 °C for the indicated periods of time, in humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. The culture medium was changed every other day. When TGF- β 1 or - β 2 were used, cells were treated 1 day after the onset of the cultures and cultivated for an additional 24 h period in the presence of the factors.

2.3. Glial cultures

Glial cultures were obtained according to a previous published procedure (Cossenza and Paes de Carvalho, 2000). Briefly, retinas from 11-day-old

embryos were dissected and the cells dissociated as described for the mixed cultures. The cells were seeded in 35 mm culture dishes at a density of 2 \times 10³ cells/mm² and cultured for 18–21 days. After this time, neurons die and glial cells turn confluent. Medium was changed every 3 days.

2.4. Cocultures

Retinas from 7-day-old (E7) and 9-day-old (E9) embryos were separately dissected, dissociated and 3 \times 10⁶ cells of E7 mixed with increasing amounts of cells of E9. The resulting mixture was seeded in 35 mm culture dishes and the cells incubated for 24 h in the presence or absence of 0.1 mM ATP. After this period, cultures were processed for the incorporation of [³H]-thymidine using the standard protocol.

2.5. Preparation of conditioned medium

For preparation of conditioned medium (CM) mixed retinal cultures containing 10⁷ cells/dish (1.04 \times 10⁴ cells/mm²) were used. Cells were cultivated for 2 or more days, the medium collected and immediately used or frozen at -80 °C. For all experiments, the duration of CM collection was 24 h, as the medium of the cultures was changed 24 h before CM was collected. Before use, CM was supplemented with 1 mM glutamine, 2 mM glucose and 2% bovine fetal serum, diluted with fresh medium containing 2% serum and filtered. Unless otherwise stated, CM was added to retinal cells of E7 24 h after the onset of the cultures. Cells were then cultivated in this medium for an additional period of 24 h in the presence or not of 0.1 mM ATP and processed for the incorporation of [³H]-thymidine. According to a previous work (Sanches et al., 2002), this concentration of ATP induces maximal incorporation of [³H]-thymidine in the cultures. For [³H]-phosphoinositides, cultures of E7 with 10⁷ cells/dish were used. Filtering of molecules above 12 kDa was performed by dialysis of CM through a <12 kDa permeable membrane. Samples of 20 or 25 mL of CM inside the membrane were incubated under constant agitation in 1.5 L of fresh culture medium without serum or any other supplementation for 24–36 h, at 4 °C. After this period, dialysed CM was supplemented and diluted as described for the nondialysed medium.

2.6. [³H]-thymidine incorporation

Treated cultures were incubated with [³H]-thymidine (0.5 μ Ci) for 60 min, at 37 °C. Cultures were then washed four times with 2 mL BME buffered with 25 mM Hepes, pH 7.4 and the cells dissolved with 0.2 mL of 0.4N NaOH. After dilution of the samples with 3 mL H₂O, 0.6 mL of 50% trichloroacetic acid (TCA) was added and the mixtures incubated, at 4 °C, for at least 30 min. The samples were filtered through Whatmann GF/B glass fiber filters and washed three times with 5% TCA. Filters were dried and the radioactivity determined by scintillation spectroscopy.

2.7. Cell viability

Cell viability was determined by the MTT reduction method first described by Mosmann (1983). Solubilized formazan product was estimated by the absorbance at 570 nm after subtracting the absorbance at 650 nm. The morphology of the cultures was determined in cultures containing 3 \times 10⁶ retinal cells at E7 seeded over coverslips. Four hours after the onset of the cultures, medium was substituted by fresh or diluted CM (1:1) from cultures at E8C5, containing or not 0.1 mM ATP. After 24 h, cells were fixed with 1% paraformaldehyde/2% glutaraldehyde in phosphate buffer (0.1 M) for 30 min, washed with PBS, dehydrated in ethanol series and mounted over slides. Cells were photographed using a Nikon Coolpix digital camera under phase contrast illumination.

2.8. Accumulation of [³H]-phosphoinositides

Cultures were incubated for 2.5 h, at 37 °C, in 1 mL of inositol-free Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), containing 1 μ Ci [³H]-myo-inositol. LiCl, to a final concentration of 10 mM, was added 1.5 h after beginning of incubation. ATP was added and the cultures further incubated for

an additional 1 h period. Incubations were interrupted by washing the dishes three times with 2 mL of Hank's balanced salt solution and the addition of trichloroacetic acid (15% final concentration).

Protein content of the samples was removed by centrifugation at $27,000 \times g$ for 30 min, dissolved in 1N NaOH and quantified as described (Lowry et al., 1951). The aqueous phase of the samples was washed three times with ether and neutralized with an equal volume of 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), containing 5 mM EDTA. The mixture was added to a 1 mL Dowex X-8 column (formate form). Fractions were sequentially eluted with water, 5 mM sodium tetraborate/60 mM ammonium formate and 0.1 mM formic acid/1 M ammonium formate. This sequence removed ^3H -inositol, ^3H -glycerophosphoinositol and ^3H -InsPs, that were extracted in the same fraction by the "batch" method (Berridge et al., 1983). Radioactivity was determined by liquid scintillation spectroscopy.

2.9. Statistical analysis

Comparisons were made by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test. Data were considered statistically different when p values were <0.05 . When statistical difference was obtained, the p value obtained in the post-test was shown in the legend of the figure.

3. Results

Sanches et al. (2002) have demonstrated that chick retinal cultures obtained from embryos at increasing stages of development incorporated less ^3H -thymidine when stimulated by ATP. In order to investigate if the decrease in ATP-induced ^3H -thymidine incorporation could also be observed in retinal cells developing in cultures, the effect of ATP on proliferation was characterized in cells cultured for increasing periods of time (Fig. 1). In retinal cells obtained from 7-day-old embryos and cultured for 24 h (E7C1), a 97.1% increase in ^3H -thymidine incorporation was observed over basal values when cells were incubated with 0.1 mM ATP. Although both basal and ATP-induced ^3H -thymidine incorporation decreased in the next 24 h by $\sim 68\%$ and $\sim 52\%$, respectively, ATP still induced a $\sim 140\%$ increase over the basal ^3H -

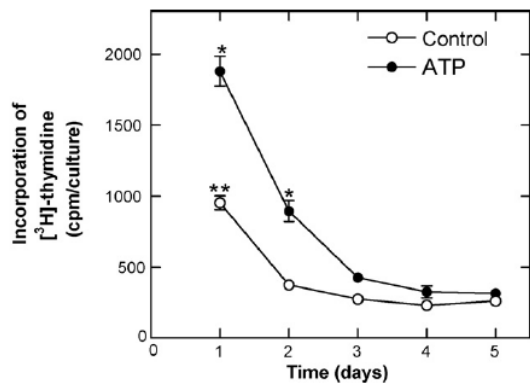


Fig. 1. ATP-induced incorporation of ^3H -thymidine in retinal cells cultured for increasing periods of time. Cells obtained from retinas of 7-day-old embryos (E7) were cultured at a density of 3×10^6 cells/dish (3.12×10^3 cells/mm 2) for increasing periods of time. The cultures were pre-treated with 0.1 mM ATP 24 h before ^3H -thymidine assay. Data represent the mean \pm S.E.M. of two or three experiments performed in duplicate for each time point. Statistical differences are indicated: * $p < 0.001$, compared to basal levels; ** $p < 0.001$ vs. basal levels observed in other periods of culture. After 3 days, ATP-stimulated levels were not significantly different from basal levels.

thymidine incorporation. A decrease in ATP-stimulated ^3H -thymidine incorporation was observed in the next 3 days in culture. While in cultures at E7C3 the effect of ATP was 55.1% over basal, in cultures at E7C5 the response of cells to this nucleotide was only 20.9% over the basal incorporation of ^3H -thymidine.

The progressive decrease in the proliferative response of retinal cells to ATP could be due to the appearance of inhibitory factors in more differentiated cultures. In order to test this possibility, we investigated the effect of coculturing proliferating retinal cells at E7 with cells from older embryos at E9 (Fig. 2A). When retinal cells at E7 were incubated with 0.1 mM ATP, for 24 h, an increase in ^3H -thymidine incorporation corresponding

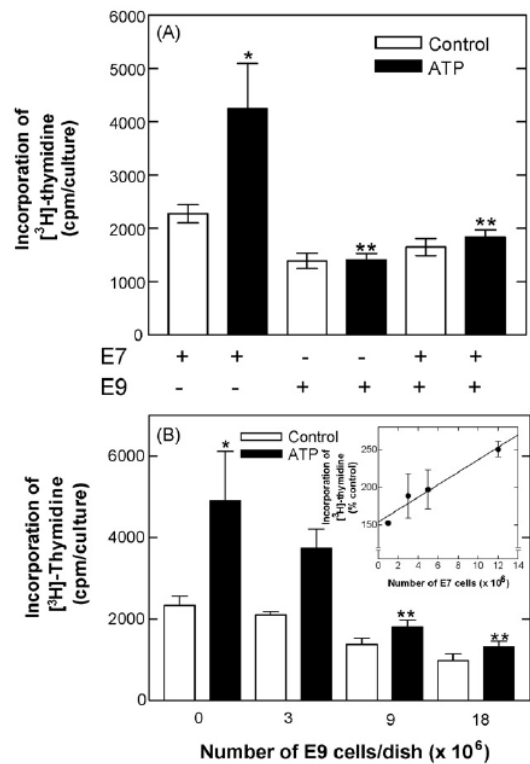


Fig. 2. Incorporation of ^3H -thymidine in cocultures of retinal cells obtained from embryos with 7 and 9 days of incubation. (A) Cocultures were established by mixing 3×10^6 dissociated retinal cells of E7 with 9×10^6 cells of retinas from E9 and seeding the mixture in 35 mm dishes. Cultures were treated or not with 0.1 mM ATP 4 h after the onset of the cultures. After 24 h, the incorporation of ^3H -thymidine was measured as described in Section 2. Data represent the mean \pm S.E.M. of at least three experiments performed in triplicate. Statistical differences are indicated: * $p < 0.01$, compared to cultures of E7 treated or not with ATP; ** $p < 0.001$, compared to cultures of E7 treated with ATP. (B) Retinal cocultures were established by mixing or not 3×10^6 retinal cells of E7 with 3×10^6 , 9×10^6 or 1.8×10^7 cells of E9 before plating. Treatment with ATP and ^3H -thymidine assay were performed as in panel A. Data represent the mean \pm S.E.M. of 6–8 cultures. * $p < 0.01$, compared to control; ** $p < 0.001$, compared to ATP-treated cultures containing only cells of E7. Inset: Incorporation of ^3H -thymidine as a function of the amount of E7 cells in the culture. Each point represents the mean \pm S.E.M. of two experiments performed in duplicate or triplicate. Empty bars: control; filled bars: ATP.

to 186.5% of the basal levels was observed (control = 2275 ± 168.5 cpm/culture; ATP = 4245 ± 850.2 cpm/culture). No increase in [3 H]-thymidine incorporation was observed in ATP-treated cultures of retinal cells of E9 (control = 1392.7 ± 143.4 cpm/culture; ATP = 1408.5 ± 123.4 cpm/culture) or in cells from embryos at E7 cocultured with cells from embryos at E9 (control = 1650 ± 161.1 cpm/culture; ATP = 1841 ± 130.8 cpm/culture).

The inhibitory effect of more differentiated retinal cells (E9) on the ATP-dependent proliferative effect in cell at E7 was

dependent on the number of more differentiated cells added to the cocultures (Fig. 2B). A progressive decrease in both basal and ATP-induced [3 H]-thymidine incorporation was observed when cells at E7 were cocultured with increasing amounts of cells at E9. While ATP induced an increase of $\sim 210\%$ in [3 H]-thymidine incorporation in retinal cultures containing 3×10^6 cells at E7, the effect of this nucleotide was only 131.7% and 135.2% when the same amount of cells at E7 were cultured, respectively, in the presence of 9×10^6 and 1.8×10^7 retinal cells at E9. As the amount of older cells added to the cultures

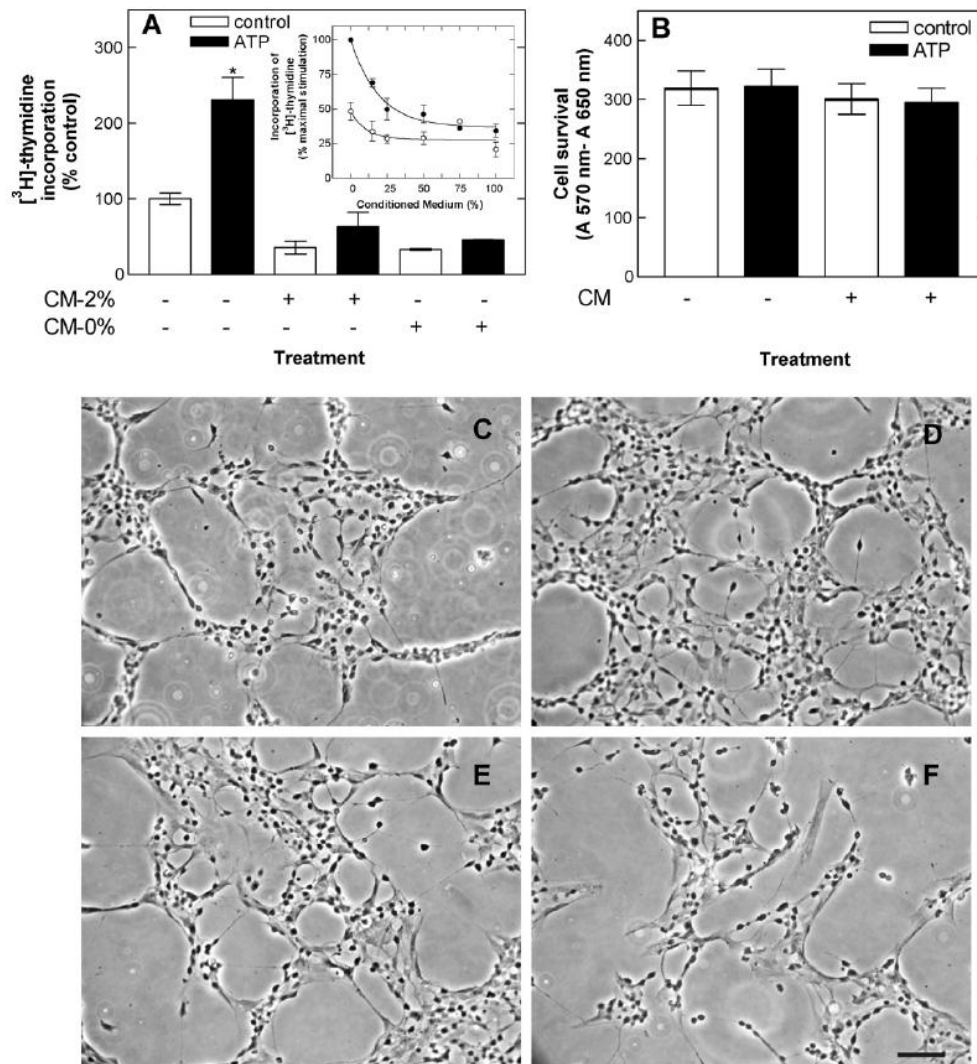


Fig. 3. Effect of conditioned medium (CM) obtained from cultures of more differentiated cells on the incorporation of [3 H]-thymidine and cell survival in retinal cultures of E7. (A) CM was obtained from cultures prepared with retinas of 8-day-old embryos containing 10^7 cells/dish (1.04×10^4 cell/mm 2) and maintained for 2 days (E8C2). Medium was conditioned during the last 24 h. Cultures at E7C1 and containing 3×10^6 cells were incubated for 24 h in diluted CM (1:1) in the presence or absence of 0.1 mM ATP. After this period, the incorporation of [3 H]-thymidine was determined. CM-2% = CM obtained from cultures with 2% serum. CM-0% = CM obtained from cultures without serum. Inset: Incorporation of [3 H]-thymidine in cultures of E7 as a function of increasing doses of CM. Basal (open circle). ATP (closed circle). (B) Cell viability of the cultures estimated by the MTT reduction assay. Cultures at E7C1 were incubated for 24 h with CM from cultures at E8C8 in the presence or absence of 0.1 mM ATP. (C–F) Morphology of retinal cultures at E7C1 cultivated for 24 h under different conditions: (C) control; (D) 0.1 mM ATP; (E) CM from cultures at E8C5; (F) ATP + CM. Scale = 30 μ m. Data in (A) represent the mean \pm S.E.M. of values from 13 to 14 cultures or two or three independent experiments performed in duplicate (inset). Statistical differences are indicated: * $p < 0.05$, as compared to control or MC-treated cultures stimulated with ATP. Data in (B) represent the mean \pm S.E.M. of values from three independent experiments performed in duplicate.

increased, the basal, non-stimulated incorporation of [³H]-thymidine also progressively decreased to 41.7% of the control levels in cultures containing 1.8×10^7 retinal cells at E9.

The large number of cells in the cultures was not responsible for the progressive decrease in the proliferative activity of the E7 retinal cells (Fig. 2B, inset). [³H]-thymidine incorporation induced by 0.1 mM ATP increased proportionally with the increase in the amount of E7 cells added to the culture dishes, up to a density of 1.2×10^7 cells/dish (1.25×10^4 cells/mm²).

The inhibitory effect of more differentiated cells on the incorporation of [³H]-thymidine of retinal cultures could be due to the contact between proliferating and non-proliferating cells or to an inhibitory action of factors released from more differentiated cells. In order to investigate between these two possibilities, we cultivated 10^7 cells/dish from embryos at E8 for 2 or more days, collected the conditioned medium (CM) and analysed the proliferation of cells from embryos at E7. When retinal cells at E7 were incubated with 0.1 mM ATP, for 24 h, in the presence of CM from cells of embryos at E8 cultured for 2 days (E8C2), ATP-dependent stimulation of [³H]-thymidine incorporation decreased from 220% in the untreated cultures to 136.2% of the control levels in the CM-treated cultures (from 4044.2 ± 821.5 to 1911 ± 490.3 cpm/culture) (Fig. 3A). No difference in the inhibitory effect of CM was observed if this medium was collected from cultures that were maintained without serum during the 24 h collection period (CM-0%). The inhibitory effect of the CM was dose-dependent (Fig. 3A, inset). Maximal attenuation of ATP response was observed with 50% or higher doses of CM. Basal proliferation was also affected. It decreased by ~50% in cultures incubated with 25% or higher doses of CM. In all subsequent experiments, 50% of CM in the culture dishes was used.

Fig. 3B shows that the incubation of the cultures with CM did not decrease cell viability as measured by the MTT reduction assay. This finding is confirmed by the morphology of the cells at E7 cultured for 24 h in the presence of CM from retinal cultures of E8C5 (Fig. 3C–F). Besides an increase in the amount of flat cells under neurons noticed in the cultures treated with ATP alone, no obvious change in gross morphology of the cultures was observed by treating the cells with 0.1 mM ATP (panel D), CM (panel E) or both (panel F).

In order to investigate if the effect of CM was reversible, retinal cells at E7 were incubated with CM in the 1st day of culture and then cultivated in fresh medium for an additional period of 24 h (Fig. 4A). While ATP-induced response decreased to control levels when cells were treated with CM in the last 24 h or during the entire period studied ($108.7 \pm 22.5\%$ and $78.5 \pm 3.5\%$, respectively), both basal and ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine increased significantly when CM was added at the beginning of the cultures and removed after 24 h ($204.3 \pm 24.2\%$ and $252.0 \pm 31.9\%$, respectively).

Dyer and Cepko (2001) suggested that cell proliferation in the retina is regulated by the population of cells that already withdrew cell cycle and began differentiation. Previous data from our group strongly suggest that glia Müller cells are the cells affected by ATP (Sanchez et al., 2002). In order to investigate which would be the cell type responsible for the

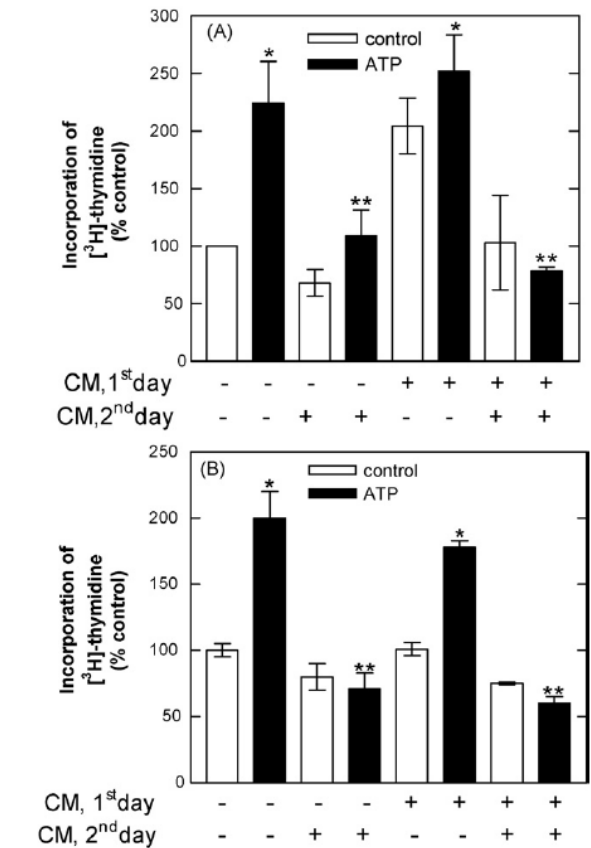


Fig. 4. Effect of CM removal on the incorporation of [³H]-thymidine in cultures of embryos at E7. Cultures containing 3×10^6 retinal cells of E7 were established as described. After 4 h, culture medium was substituted by CM (1:1 dilution) of cultures of E8C8 (A) or CM from purified glial cultures (B). After 24 h, CM was removed, fresh medium was added and the cells cultivated for an additional 24 h period. ATP (0.1 mM) treatment was performed in the 2nd day. In (A), data represent the mean values \pm S.E.M. of 3–6 cultures. Statistical differences are indicated: * $p < 0.01$, compared to control without CM treatment; ** $p < 0.001$, compared to ATP without CM treatment in the 2nd day. In (B), data represent the mean values \pm S.E.M. of 4–6 cultures. * $p < 0.001$, compared to control without CM treatment; ** $p < 0.01$, compared to ATP without CM treatment in the 2nd day.

release of factor (s) that inhibit ATP-induced increase in [³H]-thymidine incorporation, we prepared CM from glial purified cultures. These cultures were prepared as described previously (Cossenza and Paes de Carvalho, 2000) and culture medium was prepared as for mixed cultures containing neurons and glial cells. As shown in Fig. 4B, CM from glial cells promoted a similar, but not identical, effect that was observed with CM from differentiated mixed cultures. Incubation of cells with CM for the last 24 h or during 48 h inhibited the increase in [³H]-thymidine incorporation induced by 0.1 mM ATP ($71.0 \pm 12.0\%$ and $60.0 \pm 5.0\%$ of basal levels observed in untreated cultures, respectively). However, incubation of cells with CM in the 1st day followed by change to fresh medium in the 2nd day resulted in a $178.0 \pm 5.0\%$ increase in ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine. Basal incorporation was not affected ($101.0 \pm 5.0\%$).

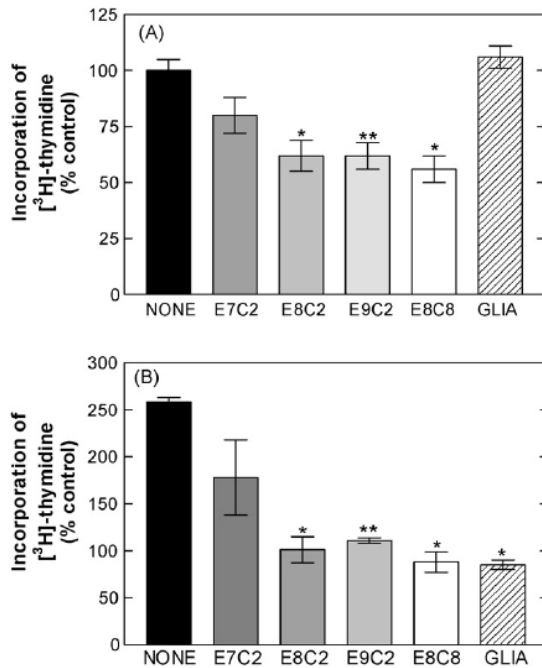


Fig. 5. Inhibition of basal (A) or ATP-induced (B) incorporation of [³H]-thymidine induced by CM from cultures prepared from retinas of embryos at increasing stages of development. CMs were obtained in the 2nd day after the onset of the cultures containing 10⁷ cells prepared from 7-, 8- or 9-day-old embryos. The inhibitory effect of CM from retinal cultures of embryos at E8 cultured for 8 days (E8C8) or CM from cultures enriched in glial cells was also determined. Data represent the mean values ± S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. In (A), **p* < 0.001 and ***p* < 0.05, compared to cultures not treated with CM. In (B), **p* < 0.001 and ***p* < 0.01, compared to ATP-stimulated cultures not treated with CM.

The inhibitory effect of CM was dependent on the developmental stage of the retinas used to prepare CM. Cultures were established using 7-, 8- or 9-day-old embryos. Culture medium conditioned for 24 h was collected in the 2nd day after the onset of the cultures or from cultures with 8 days (E8C8). Fig. 5 shows that, as retinas from older embryos were used, both basal (Fig. 5A) and ATP-induced (Fig. 5B) incorporation of [³H]-thymidine decreased. CM prepared from 8-day-old or older embryos decreased basal and ATP-dependent [³H]-thymidine incorporation by 38% and ~60%, respectively. A similar decrease of ~65% was observed with CM from retinal cells from embryos at E8 cultured for 8 days (E8C8) or from purified glial cell cultures, except that this CM did not affect the basal levels of [³H]-thymidine incorporation.

One possibility to explain the inhibitory effect of CM would be the release of ectonucleotidases by older cultures that could degrade ATP added to the cultures in the proliferation assays. However, ARL 67156, an ecto-ATPase inhibitor, at a concentration of 0.1 mM, did not block the inhibitory effect of CM (Fig. 6). While in CM-treated cultures, basal and ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine decreased to 26.1 ± 3.2% and 37.6 ± 5.4%, respectively, in CM + ARL

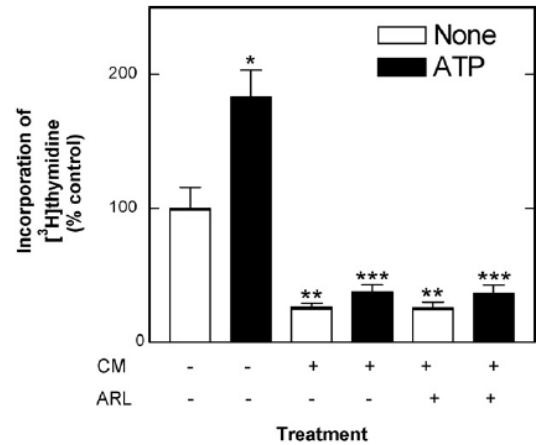


Fig. 6. Effect of ARL 67156 on CM-induced inhibition of [³H]-thymidine incorporation in retinal cell cultures at E7C2. Retinal cultures at E7C1 were cultivated for 24 h with CM from cultures at E8C7 in the presence or absence of 0.1 mM ARL 67156. Data represent the mean values ± S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. Statistical differences are indicated: **p* < 0.01 and ***p* < 0.05, as compared to control; ****p* < 0.001, as compared to ATP-stimulated cultures not treated with CM.

67156 condition, basal and ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine were 25.7 ± 4.3% and 36.4 ± 6.5%, respectively.

Activation of purinergic receptors by nucleotides induces the accumulation of phosphoinositides in chick embryo retinal cells in culture (Sanches et al., 2002). Since the proliferative response to ATP decreased with time in culture, an effect that was mimicked by incubation of proliferating cells with conditioned medium from more differentiated cells, we investigated the effect of CM on the accumulation of phosphoinositides induced by ATP in the cultures. Cultures at E7C2 were preincubated with CM of E8C8 cultures, for 24 h, in the absence or presence of the P2 antagonist PPADS (0.1 mM). After this period, cultures were stimulated with 0.1 mM ATP (Fig. 7). Incubation of cells with CM completely attenuated the accumulation of [³H]-phosphoinositides induced by 0.1 mM ATP. This effect was blocked by the addition of the antagonist or by dialysis of CM across a membrane permeable to molecules <12 kDa. Moreover, the preincubation of the cells with 0.1 mM ATP, for 24 h, also abolished the accumulation of [³H]-InsPs induced by ATP, a response that was also prevented by the addition of the P2 receptor antagonist PPADS.

In order to investigate the possibility that agonist-dependent desensitization of P2 receptors was responsible for the absence of ATP-induced proliferation in cultures treated with conditioned medium, the effect of dialysed CM on the incorporation of [³H]-thymidine was investigated (Fig. 8). As previously observed, CM reduced both basal and ATP-induced [³H]-thymidine incorporation by ~65% (from 2387 ± 331.7 to 745.3 ± 281.7 cpm/culture) and ~75% (from 4724 ± 443.6 to 1135.1 ± 165.3 cpm/culture), respectively. No attenuation of the inhibitory effect of CM was observed due to dialysis of this medium. As observed with CM, dialysed CM decreased the basal incorporation of [³H]-thymidine by ~57% (from 2387 ± 331.7 to 1023.0 ± 171.4 cpm/culture). Also, dialysis of CM did not increase the

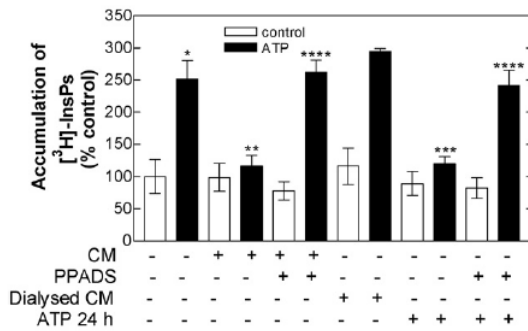


Fig. 7. Accumulation of $[^3\text{H}]$ -phosphoinositides in cultures of E7 treated with CM or ATP for 24 h. Cultures at E7C1 were cultured for 24 h with CM from cultures at E8C8, in the presence or not of 0.1 mM PPADS, with CM of cultures at E8C8 that was previously dialysed for 24 h across a membrane permeable to molecules <12 kDa or with 0.1 mM ATP in the presence or not of PPADS. After this period, CM was removed and the cells stimulated with 0.1 mM ATP and assayed for the accumulation of $[^3\text{H}]$ -phosphoinositides as described in Section 2. Data represent mean values \pm S.E.M. of three to seven independent experiments performed in duplicate or triplicate. Statistical differences are indicated: * $p < 0.001$ vs. control levels; ** $p < 0.01$, compared to cultures incubated with ATP and not treated with CM, cultures treated with CM in the presence of PPADS or cultures incubated with ATP and treated with dialysed CM; *** $p < 0.01$, as compared to cultures stimulated with ATP in control or ATP + PPADS treated cultures; **** $p < 0.01$, as compared to ATP-stimulated cultures treated with CM or with ATP for 24 h.

response of the cells to ATP. A decrease of $\sim 66\%$ (from 4724 ± 443.6 to 1587.3 ± 254.5 cpm/culture) in $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation was observed when cells were treated with 0.1 mM ATP in the presence of dialysed CM.

Close et al. (2005) have shown that TGF- $\beta 2$ decreases the proliferation of progenitors and Müller cells of the rat retina in culture (Close et al., 2005). A similar inhibitory effect of TGF- $\beta 1$

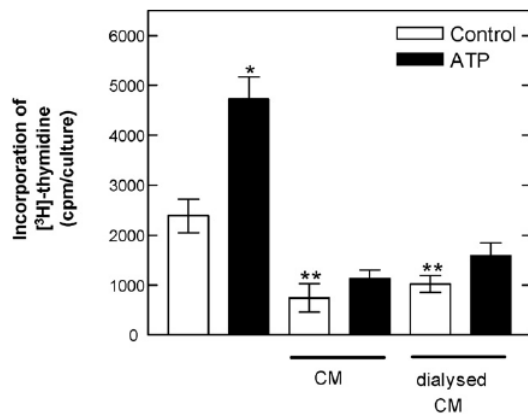


Fig. 8. Effect of CM previously dialysed on the incorporation of $[^3\text{H}]$ -thymidine in cultures of E7. Cultures at E7C1 were incubated for 24 h with CM from cultures at E8C8 that was dialysed or not across a membrane permeable to molecules <12 kDa. After this period, CM was removed and the incorporation of $[^3\text{H}]$ -thymidine determined. The treatment with ATP was performed in the 2nd day of culture. Data represent the mean values \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate or triplicate. Statistical differences are: * $p < 0.001$ vs. control or ATP-stimulated levels in cultures treated with CM; ** $p < 0.05$, compared to control levels of cultures not treated with CM.

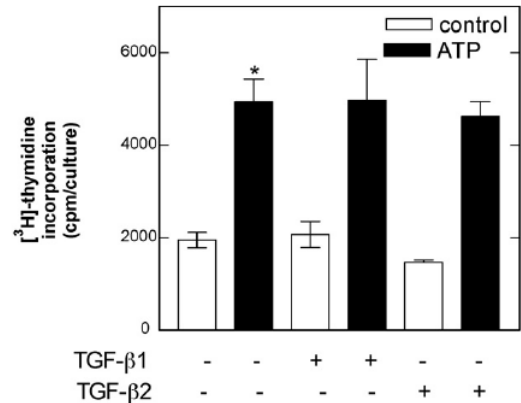


Fig. 9. Effect of TGF- $\beta 1$ and TGF- $\beta 2$ on the proliferation of retinal cells induced by ATP. Cultures at E7C1 were incubated for 24 h with 5 ng/mL of TGF- $\beta 1$ or TGF- $\beta 2$ in the presence or absence of 0.1 mM ATP. After this period, cells were processed for $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation. Data represent the mean values \pm S.E.M. of three separate experiments performed in duplicate. * $p < 0.001$, as compared to control.

was observed in chick retinal cells and human Müller cells in culture (Calvaruso et al., 1997; Ikeda and Puro, 1995). In an attempt to characterize the nature of the inhibitory factor(s) present in CM, we investigated the effect of TGF- $\beta 1$ and TGF- $\beta 2$ in retinal cell proliferation induced by 0.1 mM ATP. No significant decrease in basal or ATP-induced incorporation of $[^3\text{H}]$ -thymidine was detected when cells were incubated for 24 h, in the presence of 5 ng/mL (Fig. 9) or 20 ng/mL (data not shown) of these factors. Also, no inhibitory effect on basal or ATP-induced increase in $[^3\text{H}]$ -thymidine incorporation in our cultures was observed using 20 ng/mL of CNTF (data not shown).

4. Discussion

The decline in proliferative activity of retinal cells during development was demonstrated in the rodent (Alexiades and Cepko, 1996; Close et al., 2005; Young, 1985) and chick retina (Prada et al., 1991). In the present study, we show that both basal and ATP-induced incorporation of $[^3\text{H}]$ -thymidine in chick embryo retinal cells in culture decreases as cells mature in culture. Although significant proliferation of cells was observed in stimulated retina from post-hatched chicken submitted or not to toxic treatment (Fisher and Reh, 2001; Fisher et al., 2004), our data showing that after 4 days in culture, no proliferative effect of ATP occurs suggest that the proliferation of cells induced by ATP declined due to the development of the cells in culture. Accordingly, our previous observation showed that no proliferative effect of ATP was obtained when retinas from 9-day-old or older embryos were used to make the cultures (Sanches et al., 2002). Moreover, since in the intact chick retina, more than 80% of the cells already abandoned cell cycle by the embryonic day 9 (Prada et al., 1991), our data suggest that treatment of cultures with ATP increases the incorporation of $[^3\text{H}]$ -thymidine in cells that are still cycling and does not induce quiescent cells to re-enter cell cycle.

We also showed that cells or conditioned medium from cultures of retinas from older embryos attenuated the proliferation of young chick embryo retina cells in culture, an effect that was dependent on the amount of older cells or the dose of CM added to the cultures. The effect of CM was reversible, that is, both control and ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine in cells increased as CM was removed from the cultures. Besides reinforcing the idea that the inhibitory effect of CM was not due to cell death in the cultures (see Fig. 3), these results suggest that one or more factors released from older retinal cells are able to reduce the proliferation of young retinal cells. These observations are in good agreement with data from Close et al. (2005) showing that older rat retinal cells were able to decrease the proliferation of nestin-positive retinal progenitors and glial cells in culture.

The effect of CM was dependent on the stage of the chick embryo used to prepare the retinal cultures in which the conditioned medium was produced. It decreased [³H]-thymidine incorporation until the developmental stage of 8 days, after which maximal inhibitory effect was observed (Fig. 5). Since by this stage, most cell types of the retina already became postmitotic (Prada et al., 1991), it is reasonable to suggest that factors released from postmitotic cells are responsible for the decrease in DNA synthesis in our cultures.

Newman (2001) has shown that glial cells in culture release ATP that can trigger calcium waves. Moreover, Sugioka et al. (1999b) have shown that ATP is accumulated in the extracellular medium when chick retinal cells are cultured for 24 h. Thus, one possible mechanism to explain the decrease of the ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine in CM-treated cultures would be that ATP accumulated in CM and induced the desensitization of P2 receptors responsible for the proliferative response. Actually, we observed that P2 receptor function, as determined by the ATP-dependent increase in the accumulation of [³H]-phosphoinositides, was completely inhibited in the cultures treated with CM for 24 h, but not in cultures incubated with CM plus the P2 receptor antagonist PPADS. Inhibition was also not observed in cultures that were incubated with CM that has been previously dialysed across a <12 kDa permeable membrane. Thus, our results suggest that the incubation of the cells for 24 h with CM induces an agonist-dependent receptor desensitization, an idea that is reinforced by the observation that a 24 h preincubation of the cells with the agonist, but not with the agonist plus PPADS, completely abolished the ATP-induced accumulation of [³H]-phosphoinositides. Since in [³H]-thymidine assays, cells were incubated with ATP for 24 h, a condition that might also induce the desensitization of ATP-dependent accumulation of phosphoinositides, our data suggest that P2 receptor desensitization might not be the mechanism responsible for CM-induced inhibition of the ATP-dependent increase in cell proliferation. Accordingly, inhibition of basal or ATP-induced increase in [³H]-thymidine incorporation was observed in cultures incubated either with CM or with CM that has been previously dialysed (see Fig. 8).

If ATP released from the cells accumulated in CM, one would expect that CM induced an increase in both the incorporation [³H]-thymidine and accumulation of [³H]-

phosphoinositides in the retinal cultures. However, no increase in [³H]-thymidine incorporation or accumulation of [³H]-phosphoinositides was ever observed in the cultures incubated with CM. Thus, our data suggest that, although receptor desensitization might occur, the mechanism associated with CM-induced attenuation of the ATP-induced proliferation likely involves other molecules different from ATP that are also accumulated in the conditioned medium.

The mechanism of inhibition induced by CM should involve molecules >12 kDa that remained in dialysed CM from mixed cultures and that affected both basal and ATP-induced proliferation of retinal cells. Two good candidates would be TGF- β 1 and - β 2, since these factors were shown to decrease the proliferation of retinal cells in culture (Ikeda and Puro, 1995; Calvaruso et al., 1997; Close et al., 2005). However, our data showed no effect of these factors on basal or ATP-induced incorporation of [³H]-thymidine. Interestingly, Close et al. (2005) showed that TGF- β 2 that affects retinal proliferation comes from neurons. As opposed to this, our data showed that CM from purified glial cultures also inhibited ATP-induced increase in [³H]-thymidine incorporation, suggesting that inhibitory factor(s) present in CM could come from glial cells. Moreover, our data showing that TGF- β 1 does not decrease the basal incorporation of [³H]-thymidine in chick retinal cells in culture do not agree with data from Calvaruso et al. (1997) showing an inhibitory effect of this factor in cell proliferation in chick retinal explants. One possible explanation for this discrepancy lies in the fact that retinal explants were incubated with this factor for 4 days, a much longer incubation period than the 24 h incubation used in the present work. In a 4 days incubation protocol, TGF- β 1 could be promoting the death of early developing retinal cells, an effect that has been demonstrated in the developing chick retina (Dünker et al., 2001).

Acknowledgements

We would like to thank Maria Leite Eduardo for technical assistance and Dr. E.G. de Araujo for helpful discussions and revision of the manuscript. G.R. França is the recipient of a CAPES fellowship. This work was supported by grants from FAPERJ, CAPES, MCT-PRONEX, CNPQ and PROPP-UFF.

References

- Alexiades, M.R., Cepko, C., 1996. Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. *Dev. Dyn.* 205, 293–307.
- Berridge, M.J., Dawson, R.M., Downes, C.P., Heslop, J.P., Irvine, R.F., 1983. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* 212, 473–482.
- Calvaruso, G., Gerbino, E., Lauricella, M., Tesoriere, G., 1997. The effects of TGF- β 1 on chick embryo retina development in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15, 973–981.
- Close, J.L., Gumuscu, B., Reh, T.A., 2005. Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF β signaling. *Development* 132, 3015–3026.
- Cossenza, M., Paes de Carvalho, R., 2000. L-Arginine uptake and release by cultured avian retinal cells: differential cellular localization in relation to nitric oxide synthase. *J. Neurochem.* 74, 1885–1894.

- De Mello, M.C.F., Ventura, A.L.M., Paes de Carvalho, R., Klein, W.L., De Mello, F.G., 1982. Regulation of dopamine- and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 79, 5708–5712.
- Dünker, N., Schuster, N., Kriegelstein, K., 2001. TGF- β modulates programmed cell death in the retina of the developing chick embryo. *Development* 128, 1933–1942.
- Dyer, M., Cepko, C., 2001. Regulating proliferation during retinal development. *Nat. Neurosci. Rev.* 2, 333–342.
- Fisher, A.J., Reh, T.A., 2001. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature* 4 (3), 247–252.
- Fisher, A.J., Omar, G., Eubanks, J., McGuire, C.R., Dierks, B.D., Reh, T.A., 2004. Different aspects of gliosis in retinal Müller glia can be induced by CNTF, insulin and FGF2 in the absence of damage. *Mol. Vis.* 10, 973–986.
- Fries, J.E., Wheeler-Schilling, T.H., Kohler, K., Guenther, E., 2004. Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single-cell RT-PCR study. *Mol. Brain Res.* 130, 1–6.
- Ikeda, T., Puro, D.G., 1995. Regulation of retinal glial cell proliferation by antiproliferative molecules. *Exp. Eye Res.* 60, 435–444.
- Khan, A.J., 1974. An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev. Biol.* 38, 30–40.
- Liu, Y., Wakakura, M., 1998. P1-/P2-purinergic receptors on cultured rabbit retinal Müller cells. *Jpn. J. Ophthalmol.* 42, 33–40.
- Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Milenkovic, I., Weick, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2003. P2Y Receptor-mediated stimulation of Müller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1211–1220.
- Moll, V., Weick, M., Milenkovic, I., Kodali, H., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2002. P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial DNA synthesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 766–773.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1/2), 55–63.
- Newman, E.A., 2001. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J. Neurosci.* 21 (7), 2215–2223.
- Newman, E.A., 2005. Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. *J. Neurosci.* 25, 5502–5510.
- Pearson, R.A., Caticas, M., Backer, D., Mobbs, P., 2002. Purinergic and muscarinic modulation of the cell cycle and calcium signaling in the chick retinal ventricular zone. *J. Neurosci.* 22, 7569–7579.
- Pearson, R.A., Dale, N., Llaudet, E., Mobbs, P., 2005. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46, 731–744.
- Perez, M.T.R., Ehinger, B.E., Lindström, K., Fredholm, B.B., 1986. Release of endogenous and radioactive purines from the rabbit retina. *Brain Res.* 398, 106–112.
- Prada, C., Puga, J., Pérez-Mendez, L., López, R., Ramirez, G., 1991. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur. J. Neurosci.* 3, 559–569.
- Sakaki, Y., Fukuda, Y., Yamashita, M., 1996. Muscarinic and Purinergic Ca²⁺ mobilizations in the neural retina of early embryonic chick. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 691–699.
- Sanchez, G., Alencar, L.A., Ventura, A.L.M., 2002. ATP induces proliferation of retinal cells in culture via activation of PKC and extracellular signal-regulated kinase cascade. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20, 21–27.
- Santos, P.F., Caramelo, O.L., Carvalho, A.P., Duarte, C.B., 1999. Characterization of ATP release from cultures enriched in cholinergic amacrine-like neurons. *J. Neurobiol.* 41, 340–348.
- Sugioka, M., Fukuda, Y., Yamashita, M., 1996. Ca²⁺ responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. *J. Physiol.* 493, 855–863.
- Sugioka, M., Zhou, W.L., Hoffmann, H.D., Yamashita, M., 1999a. Ca²⁺ mobilization and capacitive Ca²⁺ entry regulate DNA synthesis in cultured chick retinal neuroepithelial cells. *Int. J. Devl. Neurosci.* 17 (3), 163–172.
- Sugioka, M., Zhou, W.L., Hoffmann, H.D., Yamashita, M., 1999b. Involvement of P2 purinoceptors in the regulation of DNA synthesis in the neural retina of chick embryo. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17, 135–144.
- Young, R.W., 1985. Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res.* 353, 229–239.

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](#)