

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE NEUROCIÊNCIAS**

**SHEILA MATURANA TEIXEIRA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPÁSICA DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO: EFEITO  
DO IGF-I.**

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

**Orientadores: Luiz Roberto Leão Ferreira**

**Elizabeth Giestal de Araujo**



**NITERÓI  
2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**SHEILA MATURANA TEIXEIRA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPÁSICA DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO: EFEITO DO IGF-I.**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Bioquímica da Sinalização Celular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e no Laboratório de Cultura de Tecidos Hertha Meyer do Departamento de Neurobiologia, ambos do Instituto de Biologia da UFF.

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

**Orientadores: Luiz Roberto Leão Ferreira  
Elizabeth Giestal de Araujo**

**Niterói  
2010**

Teixeira, Sheila Maturana

**ESTUDO DA ATIVIDADE (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPÁSICA DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO: EFEITO DO IGF-I.**

Sheila Maturana Teixeira – Niterói: [     ], 2010.

76 f.

Dissertação (Mestrado em Neurociências)

Universidade Federal Fluminense, 2010.

Bibliografia p.52-61

- |                                              |                    |           |
|----------------------------------------------|--------------------|-----------|
| 1. (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase | 2. Desenvolvimento | 3. Córtex |
| 4. Retina                                    | 5. IGF-I           |           |

**SHEILA MATURANA TEIXEIRA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPÁSICA DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO: EFEITO DO IGF-I.**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Nilson Nunes Tavares – UFRJ

---

Dra. Helena de Souza Pereira – UFF

---

Dr. André Lopes Fuly – UFF

---

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

---

Dr. Luiz Roberto Leão Ferreira – UFF (Orientador)

---

Dra. Elizabeth Giestal de Araujo – UFF (Orientadora)

**Niterói  
2010**

À minha mãe, pelo  
incentivo incansável, pelo  
amor e pela dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores prof.<sup>o</sup> Luiz Leão e prof.<sup>a</sup> Beth pela orientação, amizade e exemplo de profissionalismo, que contribuíram não só na minha vida acadêmica, mas também na minha formação como pessoa. Obrigada por investirem e confiarem em mim!

À minha família, em especial à minha mãe Arlete, por ter me dado todo apoio necessário para que eu chegasse até aqui. Mãe, você é a maior riqueza em minha vida!!

Aos amigos do laboratório pela amizade, pelo espírito de companheirismo, pelo incentivo e pelos momentos de alegria. Em especial, Babu, Leandro, Docinho (irmão), Luis Eduardo (Coisinha), Claydson e Karinne, agradeço pelos memoráveis momentos de descontração!!

Às minhas amigas Dani, Nathalia, Karen, Lívia, Erika e Tia Ana por torcerem pelo meu sucesso e me apoiarem em todos os momentos.

Às amigas Larissa, Clarisse (minha mãe de Nikit) e Juliana que apesar de morarem tão longe, estão sempre comigo.

Ao Alexandre José Fernandes, Bernadino Matheus dos Santos e Alecsandro de Jesus Rezende pelo apoio técnico.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

*“Dê mais às pessoas, MAIS do que elas esperam, e faça com alegria.*

- . Decore seu poema favorito.*
- . Não acredite em tudo que você ouve, gaste tudo o que você tem e durma tanto quanto você queira.*
- . Quando disser "Eu te amo" olhe as pessoas nos olhos.*
- . Fique noivo pelo menos seis meses antes de se casar.*
- . Acredite em amor à primeira vista.*
- . Nunca ria dos sonhos de outras pessoas.*
- . Ame profundamente e com paixão.*
- . Você pode se machucar, mas é a única forma de viver a vida completamente.*
- . Em desentendimento, brigue de forma justa, não use palavrões.*
- . Não julgue as pessoas pelo seus parentes.*
- . Fale devagar mas pense com rapidez.*
- . Quando alguém perguntar algo que você não quer responder, sorria e pergunte: "Porque você quer saber?".*
- . Lembre-se que grandes amores e grandes conquistas envolvem riscos.*
- . Ligue para sua mãe.*
- . Diga "saúde" quando alguém espirrar.*
- . Quando você se deu conta que cometeu um erro, tome as atitudes necessárias.*
- . Quando você perder, não perca a lição.*
- . Lembre-se dos três Rs: Respeito por si próprio, respeito ao próximo e responsabilidade pelas ações.*
- . Não deixe uma pequena disputa ferir uma grande amizade.*
- . Sorria ao atender o telefone, a pessoa que estiver chamando ouvirá isso em sua voz.*
- . Case com alguém que você goste de conversar. Ao envelhecerem suas aptidões de conversação serão tão importantes quanto qualquer outra.*
- . Passe mais tempo sozinho.*
- . Abra seus braços para as mudanças, mas não abra mão de seus valores.*
- . Lembre-se de que o silêncio, às vezes, é a melhor resposta.*
- . Leia mais livros e assista menos TV.*
- . Viva uma vida boa e honrada. Assim, quando você ficar mais velho e olhar para trás, você poderá aproveitá-la mais uma vez.*
- . Confie em Deus, mas tranque o carro.*
- . Uma atmosfera de amor em sua casa é muito importante. Faça tudo que puder para criar um lar tranquilo e com harmonia.*
- . Em desentendimento com entes queridos, enfoque a situação atual.*
- . Não fale do passado.*
- . Leia o que está nas entrelinhas.*
- . Reparta o seu conhecimento. É uma forma de alcançar a imortalidade.*
- . Seja gentil com o planeta.*
- . Reze. Há um poder incomensurável nisso.*
- . Nunca interrompa enquanto estiver sendo elogiado.*
- . Cuide da sua própria vida.*
- . Não confie em alguém que não fecha os olhos enquanto beija.*
- . Uma vez por ano, vá a algum lugar onde nunca esteve antes.*
- . Se você ganhar muito dinheiro, coloque-o a serviço de ajudar os outros, enquanto você for vivo. Esta é a maior satisfação de riqueza.*
- . Lembre-se que o melhor relacionamento é aquele em que o amor de um pelo outro é maior do que a necessidade de um pelo outro.*
- . Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir.*
- . Lembre-se de que seu caráter é seu destino.*
- . Usufrua o amor e a culinária com abandono total.”*

Dalai Lama

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1) A (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase	1
1.2) Estrutura molecular da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase e o controle de sua atividade	2
1.3) Heterogeneidade Molecular da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase	4
1.4) Papel da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase no Sistema Nervoso	7
1.5) Retina	8
1.6) Fatores tróficos e o desenvolvimento da retina	10
1.7) Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF)	11
1.7.1) Receptor do IGF	15
1.7.2) Proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs)	16
1.7.3) Sinalização Química por IGF e modulação da atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
2.1) Objetivos Gerais	19
2.2) Objetivos Específicos	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1) Materiais	20
3.2) Preparação dos homogeneizados de tecido	20
3.3) Dosagem de Proteína	21
3.4) Medida da atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica	22
3.5) Preparo do carvão ativado	23

3.6) Preparo do Reativo de Fiske-Subarow	23
3.7) Imunodeteção de proteínas por Western Blot	24
3.8) Análise dos dados	25
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
4.1) Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica durante o desenvolvimento pós-natal do córtex cerebral de ratos	26
4.2) Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos	28
4.3) Expressão de diferentes isoformas da subunidade catalítica da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos	30
4.4) Efeito do IGF-I exógeno sobre a atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica da retina durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos	33
4.5) Efeito do IGF-I endógeno sobre a atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica da retina de animais P7	37
4.6) Alterações nos níveis de IGF-I durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos	39
4.7) Avaliação do nível de receptor de IGF-I fosforilado durante o desenvolvimento pós-natal da retina	41
4.8) Envolvimento de PI3 cinase e Src cinase na modulação da atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica basal de retina de ratos P7	43
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Akt** – Proteína cinase serina/treonina tipo B
- ATP** – Adenosina trifosfato
- Bad** – Proteína pro-apoptótica
- CCG** – Camada de células ganglionares
- CHIF** – Fator Induzido por Hormônio Corticosteróide
- CMF** – Solução salina sem cálcio e magnésio
- CN** – Células neuroblásticas
- CNE** – Camada nuclear externa
- CNI** – Camada nuclear interna
- CPE** – Camada plexiforme externa
- CPI** – Camada plexiforme interna
- DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- E14** – Dia 14 embrionário
- EDTA** – Ácido etileno diamino tetra acético
- EGF** – Fator de crescimento epidermal
- ERKs** – Cinases reguladas por sinais extracelulares
- FGF** – Fator de crescimento de fibroblasto
- FXVD** – Família de pequenas proteínas de membrana
- GABA** – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- GH** – Hormônio do crescimento
- Grb2** – Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento
- HEPES** – N-(2 – hidroxí etil) piperazina – N'-(2- ácido etano sulfônico)
- IGFBPs** – Proteínas de ligação ao IGF
- IGF-I** – Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I
- IGF-II** – Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo II
- IGF-I R** – Receptor para IGF-I
- IL-3** – Interleucina 3
- IOMEAG 538** – Inibidor específico do receptor de IGF-I
- IRS** – Substrato do receptor de insulina
- IRS-1** – Substrato 1 para o receptor de insulina

**IRSA4** – Substrato 4 para o receptor de insulina  
**KDa** – Quilodáton  
**Ly 294002** – Inibidor de enzima específico da via da PI3 cinase  
**MAP cinase** – proteínas cinases ativadoras de mitose  
**MEK** – Cinase ativadora da MAP cinase  
**(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase** – Adenosina trifosfatase ativada por sódio e potássio  
**NSILA** – Anticorpos antiinsulina  
**P0** – Dia pós-natal 0  
**PDGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas  
**Pi** – Fosfato inorgânico  
**PI3** – Inositol-3-fosfato  
**PI3 cinase** – Fosfatidilinositol-3-cinase  
**p-IGF-R** – Receptor para IGF-I fosforilado  
**PMSF** – Fluoreto de fenil-metil-sulfonila  
**PP1** – Inibidor específico da via da Src  
**PVDF** – Polyvinylidene difluoride  
**Raf** – Proteína cinase ativadora da MEK  
**Ras** – Proteína de sarcoma de rato  
**RNAm** – Ácido ribonucléico mensageiro  
**SDS** – Dodecilsulfato de sódio  
**SNC** – Sistema Nervoso Central  
**SOS** – Son of sevenless  
**Src** – Sarcoma da retina de galinha  
**TBS-T** – Salina Tamponada de Tris  
**T3** – Triiodotironina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de transporte da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase	2
<b>Figura 2:</b> Esquema da estrutura molecular da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase	3
<b>Figura 3:</b> Esquema simplificado da retina de vertebrados recém-nascidos e adultos	9
<b>Figura 4:</b> Estrutura tridimensional da molécula de IGF-I	12
<b>Figura 5:</b> Algumas vias de sinalização envolvidas no efeito do IGF	18
<b>Figura 6:</b> Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica durante o desenvolvimento pós-natal de córtex cerebral de ratos	27
<b>Figura 9:</b> Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica durante o desenvolvimento pós-natal de retina de ratos	29
<b>Figura 8:</b> Expressão da subunidade α1 da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase durante o desenvolvimento pós-natal da retina	31
<b>Figura 9:</b> Expressão da subunidade α3 da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase durante o desenvolvimento pós-natal da retina	32
<b>Figura 10:</b> Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica em retina de ratos P1, após incubação com IGF-I	34
<b>Figura 11:</b> Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica em retina de animais P7, após incubação com IGF-I	35
<b>Figura 12:</b> Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica em retina de animais P14, após incubação com IGF-I	36
<b>Figura 13:</b> Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica em retina de animais P7, após incubação com 10 μM de IOMEAG 538	38
<b>Figura 14:</b> Expressão de IGF-I durante o desenvolvimento pós-natal da retina	40
<b>Figura 15:</b> Expressão de p-IGF-I R durante o desenvolvimento pós-natal da retina	42
<b>Figura 16:</b> Atividade (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPásica em retina de ratos P7, após incubação com Ly 294002 (25 μM) e PP1 (1μM)	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Distribuição das isoformas da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> )-ATPase nos tecidos	<b>6</b>
<b>Tabela 2:</b> Localização do RNAm dos membros da grande família de IGF na retina	<b>14</b>
<b>Tabela 3:</b> Descrição das IGFBPs, seus efeitos e localizações celulares	<b>16</b>
<b>Tabela 4:</b> Distribuição das IGFBPs em diferentes fluidos biológicos	<b>17</b>

## RESUMO

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  é a proteína responsável pelo transporte eletrogênico de  $\text{Na}^+$  e de  $\text{K}^+$  acoplado a hidrólise do ATP. A excitabilidade de células nervosas, o controle da osmolaridade celular, entre outros efeitos, depende do potencial de membrana gerado pela  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ . Esta ATPase é constituída de duas cadeias polipeptídicas,  $\alpha$  e  $\beta$ , que podem existir em quatro e três isoformas distintas, respectivamente. A proposta do nosso trabalho foi analisar o perfil da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  durante o desenvolvimento do sistema nervoso de ratos pigmentados Lister Hooded, bem como o papel do IGF-I na modulação desta atividade na retina. Nossos resultados demonstram que as atividades catalíticas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  de retina e de córtex cerebral de ratos aumentam significativamente durante o período de desenvolvimento pós-natal, atingindo um aumento de três vezes entre P0/P1 e P14. Este aumento não corresponde a uma diferença de expressão das subunidades  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  nas idades de P0 e P14. O IGF-I foi capaz de induzir aumento significativo da atividade enzimática na retina de animais P7, apesar de não ter manifestado nenhuma influência sobre a atividade em retinas de animais P1 e P14. Além disso, as vias da PI3 cinase e Src cinase parecem estar envolvidas na modulação da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  basal no tecido retiniano. Estes dados indicam que o aumento da atividade enzimática observada até o 14<sup>o</sup> dia pode estar relacionado com a diferenciação cortical e retiniana, além de um importante papel regulatório do IGF-I na atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  na retina.

## ABSTRACT

The (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase is the protein responsible for the eletrogenic transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> coupled to ATP hydrolysis. The excitability of nerve cells, control of cell osmolarity, among other purposes, depends on the membrane potential generated by (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase. This ATPase is composed of two polypeptide chains,  $\alpha$  and  $\beta$ , that can exist as four and three distinct isoforms, respectively. The proposal of our work was to analyze the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase activity pattern throughout development of the nervous system of pigmented rats of the Lister Hooded lineage, and the role of IGF-I in the modulation of this activity in retina. Our results show that the catalytic activity of (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase from retina and brain cortex of rats increased significantly during the post-natal development, achieving an increase of three times between P0/P1 and P14. This increase does not correspond to a difference in expression of subunits  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 3 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase in the same period. IGF-I led to a significant increase of enzyme activity in the retina of P7 animals, although it had no influence on retina activity in P1 and P14 animals. Moreover, PI3 kinase and Src kinase seem to be involved in modulating the basal (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase activity in retina. These data indicate that increased enzyme activity observed until the post-natal 14th day can be correlated with cortical and retinal differentiation, as well as an important regulatory role of IGF-I in (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase activity in the retina.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1) A (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase

A enzima (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase, descoberta por Jens Christian Skou em 1957, está presente na membrana plasmática de células animais e tem a função catalítica de acoplar a hidrólise de ATP à movimentação simultânea de 2 íons K<sup>+</sup> para dentro e 3 íons Na<sup>+</sup> para fora da célula, contra seus gradientes eletroquímicos (Skou, 1957). Pertencente ao grupo das ATPases do tipo "P", apresentam como característica comum a inibição por vanadato (VO<sub>4</sub><sup>-3</sup>), um análogo de fosfato, e a auto-fosforilação por ATP em um resíduo de aspartato durante o ciclo catalítico (Feraille e Doucet, 2001).

O mecanismo de transporte realizado por esta enzima inicia-se quando ocorre a ligação de três íons Na<sup>+</sup> a sítios de alta afinidade na subunidade α da proteína transportadora, na superfície citossólica da membrana (Fig.1). Essa mesma subunidade também possui o sítio de ligação para o ATP. A fosforilação do transportador (1) altera sua conformação (2) e diminui sua afinidade por Na<sup>+</sup>, levando à liberação do Na<sup>+</sup> na superfície extracelular. Em seguida, dois íons K<sup>+</sup> ligam-se à sítios de alta afinidade na porção extracelular da mesma subunidade (3), a enzima é desfosforilada (4), reduzindo sua afinidade para os íons K<sup>+</sup>, que são liberados no interior da célula. Ao final, a proteína de transporte está agora pronta para um novo ciclo de bombeamento de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (Devlin, 2007).

Esta enzima eletrogênica tem como uma de suas funções manter diferenças de concentrações dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> entre os compartimentos extra e intracelulares, permitindo a manutenção das características eletrofisiológicas das células. Assim, a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase desempenha uma função importante na regulação do volume celular, no transporte ativo secundário de glicose e aminoácidos, nos níveis de H<sup>+</sup> (pH citoplasmático) e Ca<sup>2+</sup> intracelulares (através dos trocadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, respectivamente) (Blanco e Mercer, 1998).

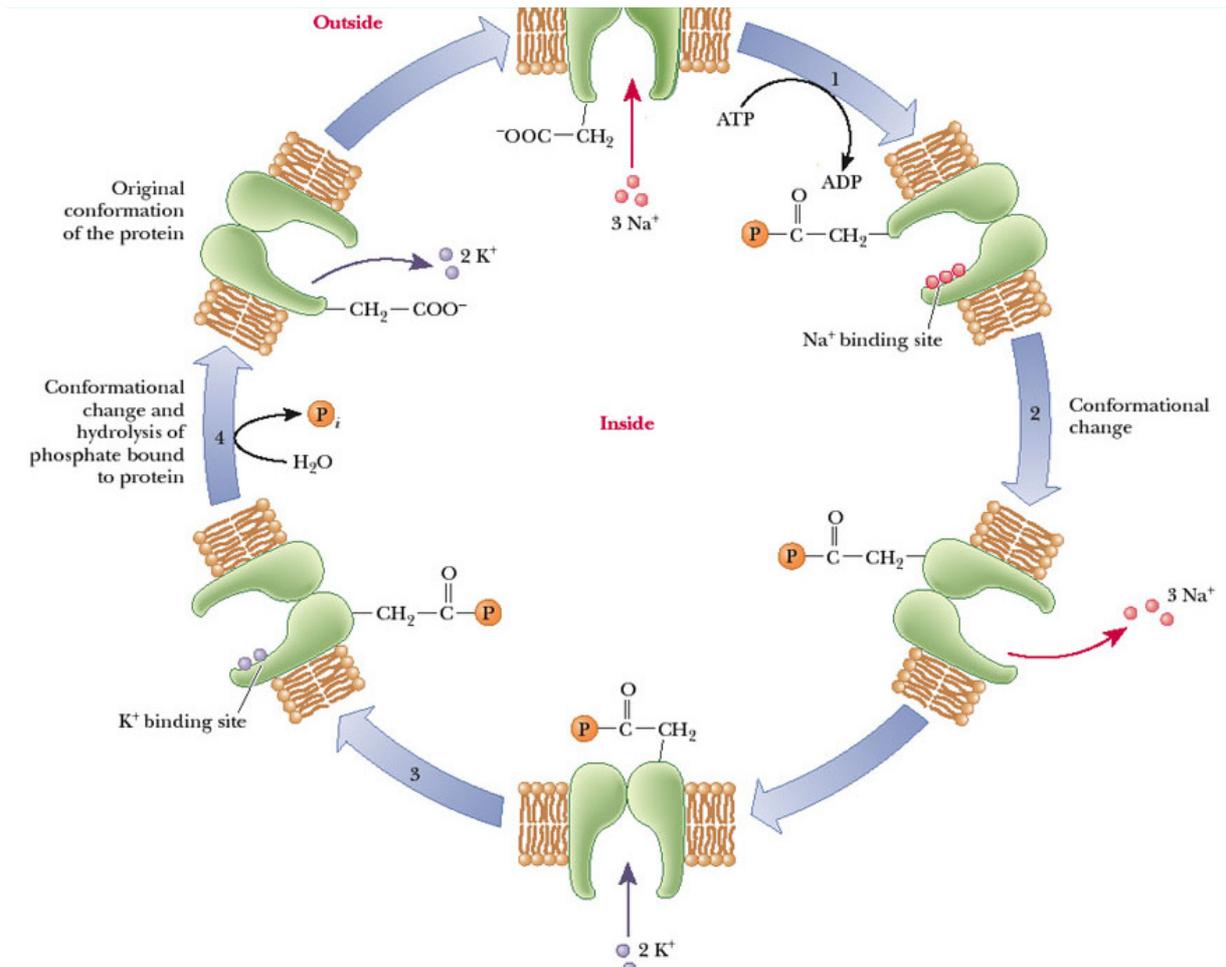


Figura 1: Mecanismo de transporte da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  (Devlin, 2007). Detalhes sobre o ciclo catalítico da enzima no texto.

## 1.2) Estrutura molecular da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ e controle de sua atividade

A unidade funcional mínima da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  é constituída de uma subunidade maior denominada  $\alpha$ , e outra menor, denominada  $\beta$  (Crambert *et al.*, 2000; Aperia, 2007), que estão ligadas de modo não covalente. A subunidade FXYD pode estar associada a essa unidade funcional mínima (Geering, 2008) (Fig. 2).

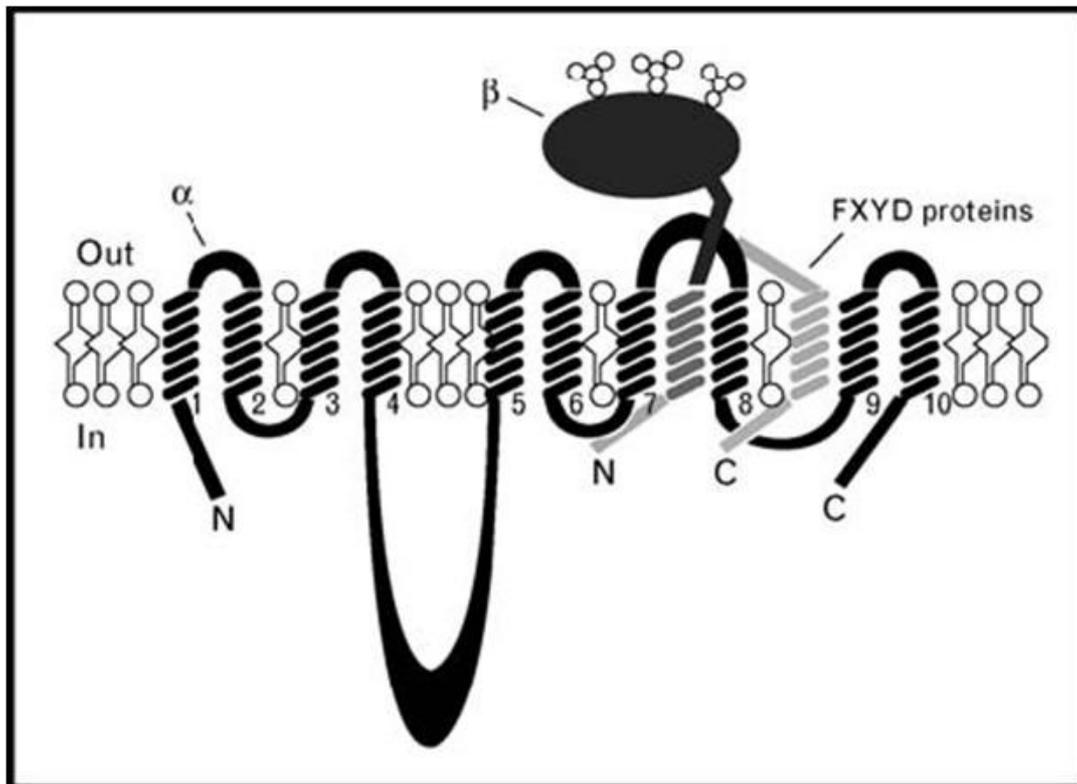


Figura 2: Esquema da estrutura molecular da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  (Geering, 2008).

A subunidade  $\alpha$  é uma proteína de 110-KDa que apresenta em torno de dez segmentos em alfa-hélice transmembrana, além de dois domínios citoplasmáticos. Esta subunidade contém o sítio catalítico, onde se ligam ATP, sódio, potássio e inibidores específicos (glicosídeos cardíacos) (Glynn, 1993; Pressley, 1996).

A subunidade  $\beta$  é uma glicoproteína de peso molecular entre 40 e 60 KDa, dependendo do seu nível de glicosilação nos diferentes tecidos. Apresenta uma única hélice transmembrana e um domínio extracelular. Esta subunidade parece estar envolvida na oclusão de  $\text{K}^+$  e modulação da afinidade da enzima por  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ . Além disso, funciona como uma “chaperona” molecular em ATPases do tipo “P”, estabilizando o polipeptídeo  $\alpha$  e facilitando sua distribuição e inserção na membrana plasmática (McDonough *et al.*, 1990; Chow e Forte, 1995; Geering, 2001). Esta subunidade parece ter uma

relevância fisiológica na indução da polaridade celular, na formação de “tight junctions” e desmossomos, na motilidade celular e na transformação oncogênica (Geering, 2008).

A concentração intracelular de sódio é um fator limitante para a atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ . Hormônios e neurotransmissores podem modular a distribuição e o número de unidades funcionais da enzima entre a membrana plasmática e os estoques intracelulares em vesículas, além de modular diretamente a transcrição dos genes codificantes das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (Feraille e Doucet, 2001). Um mecanismo regulatório diferente, envolvendo interações específicas dependentes de tecido e de isoenzima da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  com uma família de pequenas proteínas de membrana denominadas FXYP foi proposto por Crambert e colaboradores (Crambert e Geering, 2003). Esta família de proteínas contém 7 membros (FXYP1 – FXYP7), apresenta peso molecular variando de 7 a 17-KDa, e é caracterizada por uma região conservada FXYP na porção N-terminal, dois resíduos de glicina internos e um resíduo de serina no final do domínio transmembrana. Foi inicialmente identificada no rim (FXYP2 ou subunidade  $\gamma$ ) e apresenta um importante papel regulatório na função  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$ , uma vez que pode modular a afinidade ao  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e ATP (Mercer *et al.*, 1993; Beguin *et al.*, 1997; Geering, 2008), além de desempenhar um papel crucial no ancoramento da enzima na membrana (Cornelius e Mahmoud, 2003) e na modulação da ligação da ouabaína (Fontes *et al.*, 1999). A regulação da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  pode ser definida ainda por diferentes fatores, tais como composição das subunidades e interação com a membrana (Blanco e Mercer, 1998; Lopina, 2001; Cornelius e Mahmoud, 2003).

## **1.2) Heterogeneidade Molecular da $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$**

A introdução de técnicas de biologia molecular levou a identificação de diferentes isoformas para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ . A

heterogeneidade molecular observada pode ser explicada em função da expressão e associação de diferentes tipos de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , que são expressas de modo dependente de tecido e de estágio do desenvolvimento, em diferentes organismos.

Múltiplas isoformas de ambas subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ) e  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) (Orlowski e Lingrel, 1988; Martin-Vasallo *et al.*, 1989; Shyjan e Levenson, 1989; Malik *et al.*, 1996) foram identificadas e diferem em composição de aminoácidos, peso molecular e sensibilidade para íons, agentes alquilantes e glicosídeos cardíacos (como exemplo podemos citar que a isoforma  $\alpha 3$  apresenta menor afinidade por  $\text{Na}^+$  que as outras, enquanto a isoforma  $\alpha 1$  é a mais resistente a ouabaína) (Lingrel, 1992; Malik *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1999). As combinações de diferentes isoformas para as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  podem resultar em pelo menos nove diferentes isoenzimas para a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  em humanos (Crambert e Geering, 2003).

A dimerização da enzima exibe um modelo de associação tecido-específico. A isoforma  $\alpha 1$  associada com a subunidade  $\beta 1$  é encontrada em todos os tecidos e é a principal isoenzima do rim (Lingrel, 1992; Levenson, 1994). A isoforma  $\alpha 2$  predomina em adipócitos, músculos, coração e cérebro (Mcgrail *et al.*, 1991; Zahler *et al.*, 1992),  $\alpha 3$  é abundante no tecido nervoso (Mcgrail *et al.*, 1991), e a isoforma  $\alpha 4$  foi encontrada somente em espermatozoides (Shamraj e Lingrel, 1994). A isoforma  $\beta 1$ , como a  $\alpha 1$ , apresenta ubiquidade. A isoforma  $\beta 2$  é encontrada em músculo esquelético, glândula pineal e tecido nervoso (Lavoie *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1997), enquanto  $\beta 3$  está presente na retina, fígado e pulmão (Arystarkhova e Sweadner, 1997; Lavoie *et al.*, 1997).

No Sistema Nervoso, a expressão de diferentes isoformas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  alcança maior complexidade. Células neuronais podem expressar uma ou mais isoenzimas, resultando em diferentes combinações de heterodímeros (Sweadner, 1979; Lingrel, 1992; Levenson, 1994). A subunidade  $\alpha 3$  é a subunidade mais abundante no cérebro, embora a presença de  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  em alguns tipos celulares deste tecido tenha sido reportada (Peng *et al.*, 1997). Interessantemente,  $\alpha 2$  parece ser a subunidade mais abundante em células

gliais (Levenson, 1994). A subunidade  $\beta 1$  parece ser a mais abundante no sistema nervoso central, enquanto  $\beta 2$  parece estar presente apenas em alguns tipos celulares específicos (Blanco e Mercer, 1998).

A expressão das isoformas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  está sujeita a regulação hormonal, bem como mudanças no decorrer do desenvolvimento, podendo também ser alterada em algumas patologias (Blanco e Mercer, 1998).

As sete proteínas da família FXYD que constituem a subunidade regulatória da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  são: FXYD1 (phospholemman), encontrada no coração e músculo esquelético; FXYD2 (subunidade  $\gamma$  da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ ) encontrada nos rins; FXYD3 (Marcador de tumor mamário - Mat-8) expressa no estômago e cólon; FXYD4 (Fator Induzido por Hormônio Corticosteróide – CHIF) observada em rins e cólon; FXYD5 (proteína relacionada a canal iônico - RIC ou ainda “dysadherin”) é expressa no intestino, pulmão e rim, FXYD6 (phosphohippolin) e FXYD7, ambas observadas no cérebro (Geering, 2008). As diferentes isoformas e distribuições estão resumidas na tabela a seguir (Tab.1).

Isoformas	Tecidos
$\alpha 1$	Ubíqua
$\alpha 2$	Adipócitos, músculos, coração e cérebro
$\alpha 3$	Tecido nervoso
$\alpha 4$	Espermatozóides
$\beta 1$	Ubíqua
$\beta 2$	Músculo esquelético, glândula pineal e tecido nervoso
$\beta 3$	Retina, fígado e pulmão
FXYD1	Coração e músculo esquelético
FXYD2	Rins
FXYD3	Estômago e cólon
FXYD4	Rins e cólon
FXYD5	Intestino, pulmão e rim
FXYD6	Cérebro
FXYD7	Cérebro

**Tabela 1: Distribuição das isoformas da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  nos tecidos.**

#### 1.4) Papel da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase no Sistema Nervoso

A inibição da enzima (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase em neurônios induzida por digitálicos tem efeitos na função neuronal. O potencial de repouso da membrana plasmática é baseado nos gradientes de concentração de sódio e potássio, e não surpreende o fato de que a dissipação desses gradientes pela inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase cause despolarização (Lichtstein e Samuelov, 1982). Estudos demonstram que a inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase pode resultar em liberação de neurotransmissores nos terminais nervosos (Vizi *et al.*, 1982).

A inibição da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase por ouabaína ou mudanças na composição iônica extracelular estimulam a liberação de acetilcolina, noradrenalina e GABA em fatias de cérebro (Vizi, 1972). Essa liberação não vesicular e independente Ca<sup>+2</sup> foi demonstrada em fatias do hipocampo e outras regiões do cérebro (Vizi, 1972; 1977). Por outro lado, a estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica inibe a liberação de neurotransmissores (Vizi e Vyskocil, 1979).

Nos últimos anos tem sido demonstrado um papel adicional para (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase como transdutora de sinais envolvidos na modulação de crescimento, apoptose, adesão e mobilidade celular (Aperia, 2007). A via de sinalização disparada pela (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase é ativada por ouabaína endógena, um hormônio esteróide produzido pelo córtex adrenal e pelo hipotálamo incapaz de inibir sua atividade de transporte iônico em concentrações fisiológicas. A ligação da ouabaína endógena a (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase (receptor protéico de alta afinidade presente na membrana plasmática) resulta em um efeito alostérico sobre o receptor promovendo a interação física deste com proteínas sinalizadoras e ativação de uma cascata de sinalização química (Harwood e Yaqoob, 2005; Aperia, 2007).

## 1.5) Retina

A retina caracteriza-se por ser um tecido muito bem organizado, que tem sua origem no ectoderma neural embrionário, o mesmo que origina o sistema nervoso central (Dowling, 1991). Possui uma localização privilegiada, permitindo sua fácil obtenção, já que é relativamente fácil separá-la do tecido conjuntivo adjacente, tornando-se assim um excelente modelo experimental para estudos visando conhecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e na funcionalidade do SNC. Além do mais, como muitos grupos fazem uso deste modelo, existe um grande volume de informações sobre este tecido, permitindo a comparação e correlação de resultados experimentais (Adler, 1993).

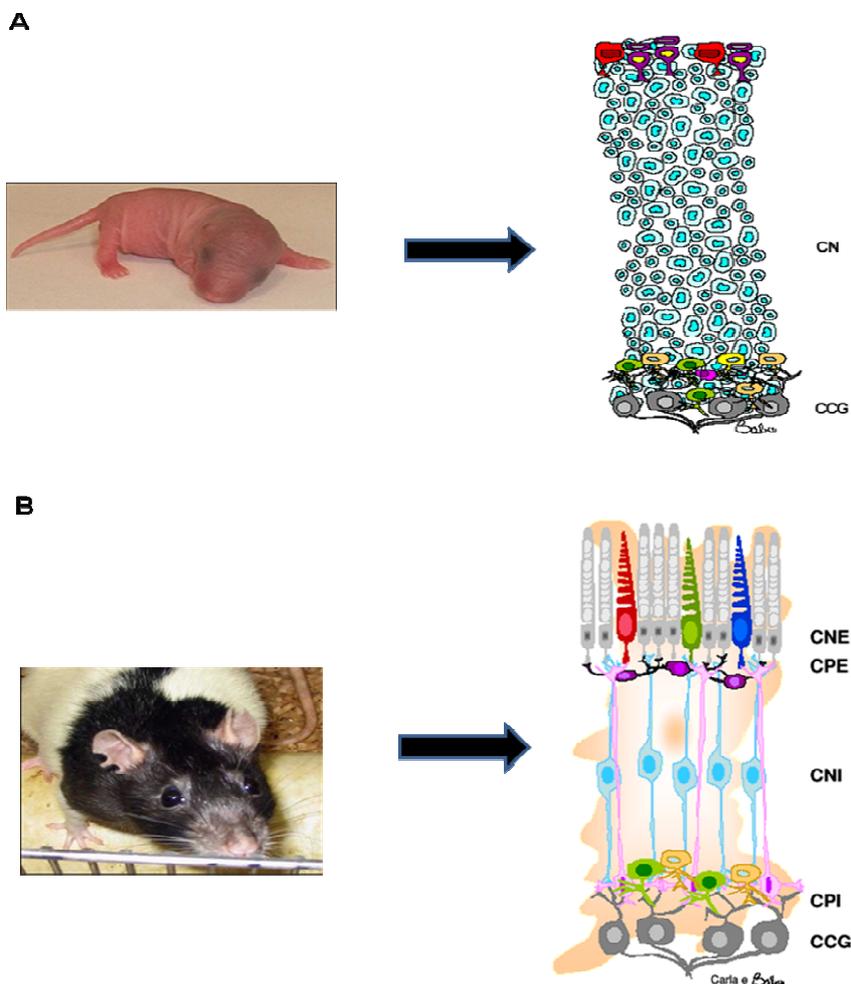
O tecido retiniano é uma estrutura laminar composta de camadas de corpos celulares denominadas de nucleares e camadas de terminações nervosas denominadas de plexiformes. Compõem a retina: fotorreceptores, células horizontais, células bipolares, células amácrinas, células ganglionares e uma célula glial característica denominada de célula de Müller (Dowling, 1991).

As camadas do tecido retiniano apresentam a seguinte constituição celular (Fig. 3):

- Camada Nuclear Externa (CNE) – nesta camada estão presentes os corpos celulares dos fotorreceptores que se dividem em dois subtipos: os cones, que possuem baixa sensibilidade à luz e permitem a visão cromática, e os bastonetes, que possuem apenas um tipo de pigmento visual, a rodopsina responsável pela adaptação da visão ao claro-escuro (Yau, 1994);
- Camada Plexiforme Externa (CPE) – é formada pelos prolongamentos das células bipolares, horizontais e dos fotorreceptores, que fazem contatos sinápticos entre si;
- Camada Nuclear Interna (CNI) – é constituída por células bipolares, horizontais, amácrinas e as ganglionares deslocadas.

Células de Müller apresentam seus corpos celulares nesta região e seus processos perpassam as demais camadas da retina;

- Camada Plexiforme Interna (CPI) – nesta camada os prolongamentos de células bipolares, amácrinas e ganglionares fazem contatos sinápticos;
- Camada de Células Ganglionares (CCG) – nela estão localizadas as células amácrinas deslocadas e as células ganglionares (Dowling, 1991).



**Figura 3: Esquema simplificado da retina de vertebrados recém-nascidos (A) e adultos (B).** Representação dos diferentes tipos celulares, bem como as camadas celulares e sinápticas da retina neural (CNE, camada nuclear externa; CPE, camada plexiforme externa; CNI, camada nuclear interna; CPI, camada plexiforme interna; CCG, camada de células ganglionares) e a camada de células neuroblásticas (CN). *Modificado de Dowling, 1991.*

A organização estrutural deste tecido é praticamente a mesma em todos os vertebrados (Wassle e Boycott, 1991). Em ratos, o período de gestação é de 22 dias (Farah, 2006) e nesta fase as células da retina são geradas obedecendo a uma determinada seqüência. A neurogênese ocorre da seguinte maneira: inicialmente são formadas as células ganglionares no período E14 a E20; em seguida as amácrinas (E16 a P0) e horizontais entre E16 a E18; os cones são gerados a seguir (E15 a P0) e por fim as bipolares, bastonetes e as células de Müller no período entre E20 a P13 (Reese e Colello, 1992; Farah, 2006). Esse processo de diferenciação retiniana depende não apenas de um programa genético pré-determinado, com a expressão de moléculas de adesão e da matriz extracelular, mas também da liberação de diferentes citocinas.

A transdução do sinal luminoso em um sinal elétrico se dá ao nível dos fotorreceptores e para tal a luz precisa atravessar o humor vítreo e passar por todas as camadas da retina até atingir o segmento externo dos fotorreceptores. O sinal elétrico gerado nas células receptoras é processado pelas células retinianas e a informação é levada através do nervo óptico para outras estruturas do sistema nervoso central (Dowling, 1991).

### **1.6) Fatores tróficos e o desenvolvimento da retina**

A formação do SNC depende de um balanço entre a neurogênese e a morte celular durante o desenvolvimento. No SNC de mamíferos a interação de vários tipos neuronais e suas terminações sinápticas, bem como a plasticidade e a rede de sinalização que envolve diferentes citocinas e neurotransmissores, são responsáveis pelos processos de desenvolvimento e funcionamento deste complexo sistema (Reuss e Von Bohlen Und Halbach, 2003).

Fatores tróficos são essenciais para o desenvolvimento, manutenção e sobrevivência de neurônios do SNC. A presença e os efeitos de fatores tróficos no tecido retiniano como EGF, IGF, dentre outros, vem sendo descrita na literatura (Fontaine *et al.*, 1998). Lillien e Cepko, em 1992, relataram que vários fatores de crescimento são normalmente produzidos pela retina e pelo tecido ocular

que a cerca, estimulando a proliferação dos progenitores dessas células *in vivo*. Entretanto, a responsividade das células da retina a estes fatores muda em função do estágio de desenvolvimento e maturação do tecido (Lillien e Cepko, 1992).

Os fatores de crescimento são polipeptídeos que interagem com seus receptores de membrana e estimulam cascatas de sinalização mediadas por proteínas intracelulares. São capazes de estimular respostas citoplasmáticas, modulando a transcrição gênica e o ciclo celular. Dentre os vários fatores de crescimento podemos destacar: o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Chesik, 2004).

O IGF-I é um fator de crescimento envolvido em processos de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Chesik, 2004). Na retina, dados obtidos recentemente demonstraram que o tratamento de células com IGF-I aumenta a proliferação celular em aproximadamente 50%, sendo esse efeito dependente de tempo e concentração (Medina, 2008), o que demonstra o papel deste fator sobre o desenvolvimento do tecido retiniano.

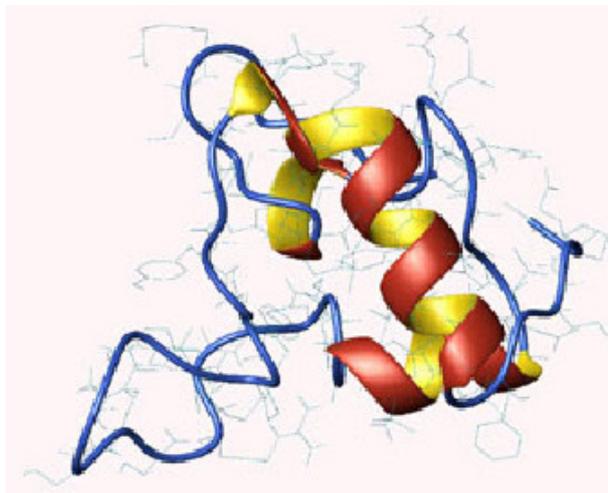
### **1.7) Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF)**

O IGF foi o segundo fator trófico descrito na literatura. No entanto, antes de ser chamado de IGF, recebeu outras denominações relacionadas ao seu efeito biológico. Em 1957, Salmon e Daughaday descobriram no soro um fator capaz de mediar o efeito do hormônio somatotrófico no processo de sulfatação de cartilagem que ocorre durante o crescimento longitudinal do osso, por isso, foi denominado fator de sulfatação, citado em (Kermer *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2005).

Algum tempo depois, Dulak e Termin, investigando os fatores de crescimento presentes no soro, identificaram a presença de um fator com atividade estimulatória múltipla. Inicialmente, pensou-se na insulina, pois este

hormônio está presente no soro e poderia estar mediando tais efeitos. Entretanto, quando foi feito o tratamento com anticorpos anti-insulina o efeito não foi abolido. Os fatores isolados receberam então os nomes de “fatores cujas atividades não eram inibidas pelos anticorpos anti-insulina” (NSILA I e II). Os NSILAs foram renomeados e chamados de somatomedinas. Posteriormente, as semelhanças estruturais entre as cadeias polipeptídicas destes fatores e à cadeia  $\beta$  da insulina foi demonstrada. Por este motivo, os fatores passaram a receber a denominação de fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e IGF-II) (Russo *et al.*, 2005).

As seqüências completas de aminoácidos do IGF-I e do IGF-II foram determinadas em 1978. O IGF-I apresenta uma única cadeia polipeptídica composta por 70 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 7,5-KDa (Fig. 4). A estrutura do IGF-II se assemelha à do IGF-I em 45 dos 73 aminoácidos presentes (Rinderknecht e Humbel, 1978).



**Figura 4: Estrutura tridimensional da molécula de IGF-I.** As regiões de  $\alpha$ -hélice estão representadas nas cores amarelo-vermelho e as regiões em azul correspondem às regiões  $\beta$ -pregueadas. Figura retirada do “site” [www.biochem.szotcu.u-szeged.hu/astrojan/pro2t.htm](http://www.biochem.szotcu.u-szeged.hu/astrojan/pro2t.htm)

A síntese do IGF, observada inicialmente nos hepatócitos, é modulada pelo hormônio somatotrófico. A maior parte do IGF-I que se encontra na circulação é proveniente do fígado, porém este fator não está diretamente

relacionado com o crescimento do corpo, sendo esta função induzida diretamente pelo hormônio do crescimento (GH) (Russo *et al.*, 2005).

O fator trófico IGF-I apresenta uma característica muito peculiar no seu mecanismo de sinalização, pois além de existirem os receptores também estão presentes proteínas extracelulares que se ligam a esta molécula e desempenham um papel regulatório sobre sua atividade. Deste modo, pode-se dizer que a sinalização depende de um conjunto de moléculas participando deste processo: os dois fatores (IGF-I e II), seis proteínas que ligam IGF e dois tipos diferentes de receptores de membrana (Chesik, 2004; Pavelic *et al.*, 2007).

Os RNAs (ácido ribonucléico mensageiro) para o IGF-I, IGF-II e IGFBPs 2, 4 e 5 são encontrados em regiões distintas do sistema nervoso central. No cerebelo, no bulbo olfatório, no tálamo, no hipocampo e na retina, o RNA para o IGF-II é detectado no início do desenvolvimento e o RNA para IGF-I, aparece em períodos mais tardios. O RNA para IGF-I foi detectado em ratos, no primeiro dia de nascimento, nas células de Purkinje e em outros elementos celulares no córtex cerebral. Uma observação interessante, diz respeito à observação de que a expressão do IGF-I está associada a elementos neuronais, a expressão do IGF-II a elementos não neuronais e os IGFBPs a elementos mesenquimais, neuronais e a células gliais (De Pablo e De La Rosa, 1995).

Um estudo publicado em 1996, realizado com ratos da linhagem sprague-dawley entre 12 a 14 semanas, demonstrou a localização do RNA para o IGF-I, para o receptor de IGF-I e para proteínas de ligação ao IGF em retinas de ratos (Burren *et al.*, 1996). A tabela a seguir, sintetiza os resultados obtidos pelos pesquisadores (Tab. 2).

Retina	IGF-I	IGF-RI	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6
Camada de Células Ganglionares	+	++	-	-	-	-	+	+
Camada Nuclear Interna	-	++	-	-	-	-	++	+
Camada Nuclear Externa	-	-	-	-	-	-	-	-
Membrana Limitante Externa	-	+	-	-	-	-	-	-
Epitélio Pigmentar Retiniano	-	-	-	-	-	-	-	-
Células Endoteliais	-	-	-	-	-	-	+	-

**Tabela 2: Localização do RNAm dos membros da grande família de IGF na retina. Adaptado de (Burren *et al.*, 1996)**

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

Os efeitos da ausência de IGF-I sobre o sistema nervoso são extremamente graves. Camundongos que não expressam IGF-I apresentam uma diminuição no comprimento dos dendritos bem como alterações no crescimento axonal e na arborização dendrítica (Cediel *et al.*, 2006). Mutações que levam à perda da expressão do receptor de IGF-I induzem o aparecimento de microcefalia e retardo mental em cérebros de humanos (Abuzzahab *et al.*, 2003).

### 1.7.1) Receptor do IGF

Para desempenhar sua função, IGF-I e II necessitam de receptores específicos que se dividem em dois tipos, denominados I e II. Cabe ressaltar que a expressão de receptores de IGF pode ser observada entre invertebrados e mamíferos (Le Roith, 2003; Russo *et al.*, 2005; Pavelic *et al.*, 2007).

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

O receptor do tipo II para IGF apresenta semelhança ao receptor de manose 6 fosfato independente de cátion (Jones e Clemmons, 1995; Russo *et al.*, 2005). Sua estrutura apresenta uma cadeia polipeptídica com um pequeno domínio citoplasmático, sem atividade tirosina cinase. Esses receptores estão envolvidos em diferentes funções tais como o tráfego de enzimas lisossomais, a endocitose e a degradação lisossomal de ligantes extracelulares, a regulação de efeitos apoptóticos/ mitogênicos e a possível transdução de sinais (Russo *et al.*, 2005).

A maioria dos efeitos dos IGF-I e II se dá através da ativação do receptor catalítico do tipo I, que é uma glicoproteína de membrana. Após ocorrer a ligação do IGF ao receptor, ocorre a ativação de tirosinas cinases, na porção intracelular do mesmo. A partir deste momento, diferentes cascatas de sinalização são ativadas tais como: as IRS1-IRSA4, que culminam na ativação da via da PI-3 cinase (fosfatidil-inositol-3-cinase), e das MAP cinases (proteínas cinases ativadoras de mitose) (Russo *et al.*, 2005).

### 1.7.2) Proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs)

Os IGFs estão presentes na circulação sanguínea, bem como no espaço intersticial. Nestes compartimentos são encontradas proteínas com alta afinidade por IGF, denominadas de IGFBPs (Van Obberghen *et al.*, 2001).

As IGFBPs são macromoléculas protéicas que apresentam homologia seqüencial de 80%, sendo que a seletividade de ligação com o IGF I ou IGF II varia de uma proteína para outra (Rajaram *et al.*, 1997).

As IGFBPs desempenham um importante papel em modular as ações do IGF. No soro, por exemplo, elas são capazes de regular as funções endócrinas dos IGFs. As funções propostas para essa regulação são as seguintes:

- 1) Inibição da atividade semelhante à insulina;
- 2) Aumento da meia vida plasmática dos IGFs;
- 3) Regulação da taxa de transporte do IGF do compartimento vascular para aumentar assim o efeito trófico deste fator (Rajaram *et al.*, 1997).

A função modulatória das IGFBPs pode ser visualizada na tabela a abaixo (Tab. 3).

IGFBPs	Afinidade com o IGF	Modulação da ação do IGF	Localização Pericelular
IGFBP-1	I = II	Inibição e/ou Potenciação	Superfície Celular ( $\alpha 5\beta 1$ integrina)
IGFBP-2	II > I	Inibição	Indeterminada
IGFBP-3	I = II	Inibição e/ou Potenciação	Superfície Celular
IGFBP-4	I = II	Inibição	
IGFBP-5	II > I	Potenciação	Matriz Extracelular e Superfície Celular
IGFBP-6	II > I	Inibição	

Tabela 3: Descrição das IGFBPs, seus efeitos e suas localizações celulares (Rajaram *et al.*, 1997).

Os níveis de IGFBPs são regulados em diferentes condições fisiológicas e patológicas. Já foi demonstrado que exercícios, cirurgia, gravidez e envelhecimento são capazes de modular os níveis de uma ou mais IGFBPs, tanto no soro como nos fluídos biológicos. Entre as condições patológicas que envolvem a regulação de algumas IGFBPs podemos destacar as seguintes: diabetes, tumores, deficiência de receptores GH, acromegalia, osteoporose, falência renal entre outras (Rajaram *et al.*, 1997). Na tabela a seguir podemos observar a distribuição das principais IGFBPs nos fluídos biológicos (Tab.4).

Fluido	Principal (is) IGFBPs
Soro	IGFBP-3
Fluido Amniótico	IGFBP-1
Fluido Folicular	IGFBP-3
Fluido Cerebro-espinhal (CSF)	IGFBP-2 e IGFBP-6

**Tabela 4: Distribuição das IGFBPs em diferentes fluídos biológicos** (Rajaram *et al.*, 1997).

### **1.7.3) Sinalização Química por IGF e modulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica**

As duas principais vias envolvidas na sinalização através dos receptores de insulina e IGF-I (Fig. 5) envolvem a fosforilação do substrato IRS e/ou Shc. Através de uma proteína adaptadora, Grb2 ocorre o recrutamento da SOS formando um complexo IRS-1-Grb2-SOS que ativa a Ras. Neste momento ocorre a estimulação da Raf (proteína cinase ativadora da MEK) que resulta na fosforilação e ativação das ERKs (cinases reguladas por sinais extracelulares) culminando em efeitos biológicos como mitogênese e diferenciação, por exemplo (Jones e Clemmons, 1995; Bateman e Mcneill, 2006).

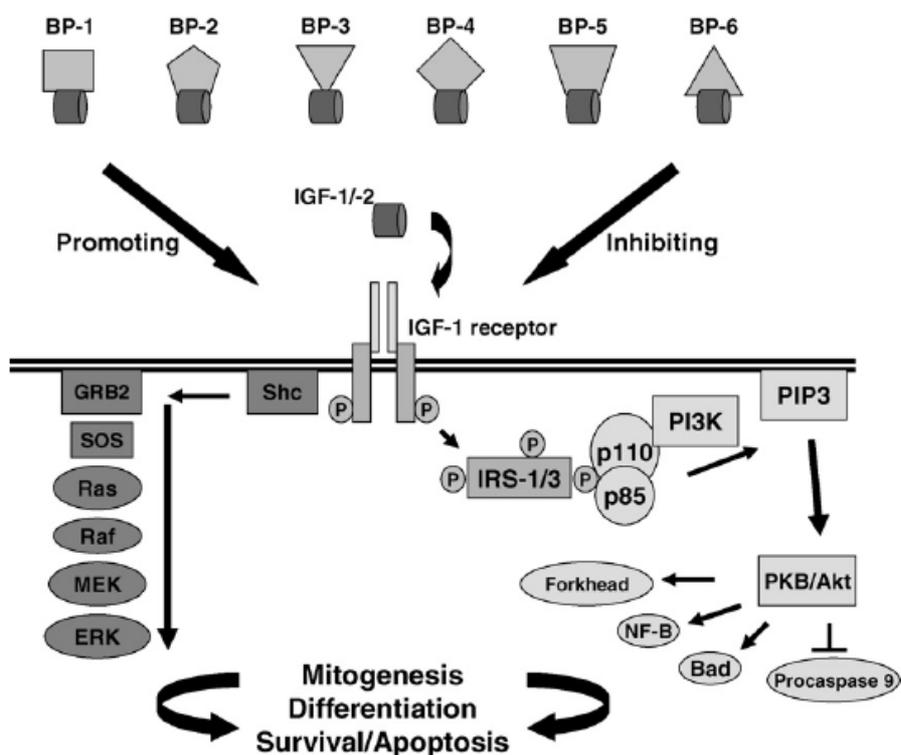


Figura 5: Algumas vias de sinalização envolvidas no efeito do IGF (Chesik *et al.*, 2007).

Ambos os receptores estão envolvidos também na ativação da via da PI3 cinase, que pode ser estimulada pela IRS-1 fosforilada. Ressalta-se que esta via, em muitos casos, está relacionada ao crescimento celular. Um outro evento observado com a auto-fosforilação do receptor de IGF do tipo 1 é a associação direta com a subunidade p85 da PI3 cinase (Jones e Clemmons, 1995; Chesik, 2004).

Em 1999, um estudo mostrou que o IGF-I aumenta a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica em células de músculo liso de modo dependente de concentração (Li *et al.*, 1999). Mais tarde, Isenovic e colaboradores demonstraram que o tratamento dessas células com IGF-I (100 nM) por 30 minutos, aumentava a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica através do envolvimento das vias da PI3 cinase e Akt (Isenovic *et al.*, 2004).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1) Objetivo Geral**

Avaliar o papel funcional da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  no desenvolvimento da retina, bem como compreender o envolvimento do IGF-I em sua modulação.

### **2.2) Objetivos Específicos**

- Comparar os níveis de atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  no córtex cerebral e na retina de ratos, em diferentes etapas do desenvolvimento pós-natal;
- Investigar a expressão das diferentes isoformas da subunidade catalítica da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  durante o desenvolvimento pós-natal da retina;
- Avaliar o efeito do IGF-I sobre a atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  em retinas de animais recém-nascidos, bem como a expressão deste fator trófico em diferentes etapas do desenvolvimento pós-natal;
- Identificar via(s) de sinalização envolvidas(s) com a modulação da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  na retina.

### **3. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1) Materiais**

O IGF-I foi comprado da PeproTech (Rocky Hill, USA). O ATP, a ouabaína, o IOMEAG 538 e o anti- $\alpha$ 3 foram comprados da Sigma (St. Louis, USA). A albumina do soro bovino, anti- $\alpha$ 1, anti-p-IGF-R e anti-actina foram comprados da Santa Cruz (CA, EUA). O 2-(4-morpholynil)-8-phenyl-4H-1-benzopiran-4 one (Ly 294002) e o PP1 foram comprados da Biomol (Plymouth Meeting, USA). O meio 199 e o soro fetal bovino foram comprados da Gibco (Gaithersburg, USA). Sais e reagentes utilizados tinham pureza determinada. Todo o material utilizado nas experiências de Western blot foi comprado da GE Healthcare (CT-EUA). O carvão ativado, o comassie brilliant blue G-250 e o vermelho de Ponceau foram comprados da VETEC.

#### **3.2) Preparação dos homogeneizados de tecido**

Ratos pigmentados da linhagem Lister Hooded de ambos os sexos, com idades entre 0 e 90 dias (P0 a P90), foram sacrificados. Os neonatos (P0 e P1) foram sacrificados por decapitação e os animais mais velhos foram colocados em uma câmara e sacrificados com uso de isofurano. O córtex cerebral e os olhos dos animais foram removidos para estudos. Todos os nossos procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Fluminense.

Os córtices cerebrais foram lavados rapidamente em solução gelada de homogeneização de tecido (Sacarose 250 mM, Hepes-Tris (pH 7,6) 10 mM, EDTA 2 mM e PMSF 1 mM). Os olhos foram colocados em solução salina CMF (livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ ) pH 7,4 (NaCl 131 mM, KCl 4,09 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,92 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,45 mM, Glicose. $\text{H}_2\text{O}$  12,2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  9,4 mM e vermelho de fenol 10 mg/mL) para posterior dissecação das retinas.

Nos experimentos de incubação realizados com IGF-I, IOMEAG 538, Ly 294002 e PP1, as retinas dissecadas em CMF foram transferidas para placas contendo 1mL de meio de cultura completo (199 Gibco, acrescido de 5 % de soro fetal bovino, glutamina 2,0 mM e antibiótico: estreptomicina 100,0 µg.mL<sup>-1</sup> + penicilina 100 U.mL<sup>-1</sup>, Sigma) acrescido do fator trófico ou dos inibidores nas seguintes concentrações: IGF-I 10 ng/mL e 100 ng/mL, 20 µM IOMEAG 538, 25 µM Ly 294002 e 1 µM PP1. Em seguida, as retinas foram incubadas em estufa, a 37°C por 1 hora, em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de ar.

As homogeneizações de córtex e retina foram feitas em Dounce Wheaton de 1mL, respeitando a proporção de 4mL de tampão de homogeneização para cada grama de tecido (4mL/g tecido), sendo realizado, em torno de 20 vezes, o movimento de vai-e-vem do pistilo no Dounce. É importante ressaltar que a solução de homogeneização para retina continha, ainda, 0,1% de deoxicolato de sódio.

Os homogeneizados de córtex cerebral e de retina foram centrifugados a 1500g, em centrífuga Eppendorf, a 4°C por 10 minutos. Alíquotas de sobrenadante dos homogeneizados de cérebro e retina foram recolhidas para ensaios. volumes restantes dos sobrenadantes e os precipitados foram descartados.

### **3.3) Dosagem de Proteína**

O volume de homogeneizado utilizado no ensaio de medida da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi definido pela concentração de proteína em cada sobrenadante, determinada através Método de Bradford (Bradford, 1976). A curva padrão foi feita com 5, 10, 15, 20 e 25 µg de uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A leitura das amostras era feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

### 3.4) Medida da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica

Os ensaios de dosagem da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica em córtex cerebral e retina foram padronizados em termos de concentração de proteínas e tempo de reação com base em ensaios anteriores realizados no laboratório, de modo a garantir condição de velocidades iniciais de reação, bem como concentrações saturantes de substrato em relação a concentração de enzima.

A atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi determinada em meio de reação (0,2 mL) contendo MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Hepes-Tris 20 mM pH7, NaCl 100 mM e KCl 20 mM. Alíquotas de 20 µl dos homogeneizados diluídos (200 µg de proteína/ mL) de córtex ou de retina foram incubados com meio de reação à 37°C em banho-maria por 5 minutos. Em alguns tubos foi adicionado ouabaína (concentração final de 1 mM). A reação foi iniciada pela adição de 10 µl de ATP-Na (pH 7,0) (concentração final de 5 mM). Após 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 0,3 mL de HCl 0,1N. Em seguida, transferiu-se 0,4 mL da mistura (reação) para tubos eppendorfes contendo 0,6 mL de carvão ativado com HCl 0,1N (descrito abaixo). Os tubos foram centrifugados em centrífuga clínica a 10000 rpm (temperatura ambiente) por 10 minutos. Retirou-se 0,5 mL do sobrenadante e adicionou 0,5 mL de reativo de Fiske-Subarow (descrito abaixo), aguardando 20 minutos de incubação a temperatura ambiente.

O fosfato inorgânico (Pi) produzido na reação foi determinado por leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda em 660 nm (Tausky e Shorr, 1953). A atividade ATPásica foi calculada pela diferença entre o Pi liberado na ausência e na presença de ouabaína 1 mM e expressa em nanomoles de fosfato inorgânico por mg de proteína por minuto (nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>). A ouabaína 1 mM foi usada como um bloqueador específico da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica.

### **3.5) Preparo do carvão ativado**

25g de carvão vegetal foi misturado a 150 mL de HCl 0,1 N (diluído em H<sub>2</sub>O MILLIQ). Agitou-se bem e esperou-se decantar até o dia seguinte. Retirou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se 150 mL de HCl 0,1 N, repetindo diariamente todo o procedimento por uma semana, quando o conteúdo do Pi contaminante foi medido por espectrofotometria. A solução de carvão ativado foi considerada adequada ao uso no ensaio de atividade ATPásica quando a absorbância do Pi do sobrenadante foi igual a 2 vezes o valor do branco da reação (esperado em torno de 0,40). Ao final, deixa-se cerca de 2 volumes de HCl 0,1 N para 1 volume de carvão decantado.

### **3.6) Preparo do Reativo de Fiske-Subarow**

A solução de Fiske-Subarow foi preparada de acordo com o número de tubos utilizados em cada experimento. Para cada tubo (0,5 mL) dissolveu-se 0,04g de Sulfato Ferroso Heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>) em 0,10 mL de Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1N, adicionando-se ainda 0,25 mL de Solução de Molibdato (descrita abaixo) e 0,15 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q.

A Solução de Molibdato foi preparada do seguinte modo: dissolveu-se 25g de Molibdato de Amônio Tetrahidratado em 300 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q, em seguida, adicionou-se 133,3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 37,5 N (PA), completando o volume para 1000 mL com H<sub>2</sub>O MILLI-Q.

A solução padrão de fosfato (1mM) usada para construção da curva padrão foi preparada dissolvendo-se 68 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 500 mL de H<sub>2</sub>O MILLI-Q.

### 3.7) Imunodeteccão de proteínas por Western Blot

Após disseccão, como descrito no item 3.1, as retinas foram colocadas diretamente em eppendorfs contendo 200  $\mu$ L de tampão de amostra contendo SDS, sendo adicionadas 3 retinas por ponto nas idades P0 e P4 e 2 retinas por ponto nas demais idades. Em seguida, os eppendorfs foram fervidos a 100°C por cerca de 10 minutos para desnaturaçã das proteínas. Realizou-se a dosagem de proteínas, como descrito no item 3.3, e após, à cada 100 $\mu$ L de amostra foi adicionado 2 $\mu$ L de azul de bromofenol. Ao final, as amostras foram congeladas em freezer -20° C.

As proteínas da retina (60 $\mu$ g por poço) foram separadas em gel de poliacrilamida contendo SDS, sendo preparados géis com 6% de poliacrilamida para imunodeteccão das subunidades  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 3 da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase, géis com 7% de poliacrilamida para imunodeteccão de p-IGF-R e géis com 16% de poliacrilamida para imunodeteccão do IGF-I. Em seguida, as proteínas dos géis foram transferidas eletroforeticamente para membranas de PVDF segundo método descrito por (Towbin *et al.*, 1979). As membranas contendo proteínas do gel foram incubadas por duas horas em soluçã TBS-T (Salina Tamponada de Tris pH 7,4 mais 0,1% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado ou em 1% de albumina para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligaçã de anticorpos.

Em seguida, as membranas foram incubadas, overnight, com anticorpo primário contra os antígenos específicos nas seguintes diluições: anti- $\alpha$ 1(1:500), anti- $\alpha$ 3 (1:2000), anti-p-IGF-R (1:200), anti-IGF (0,25  $\mu$ g/mL) e anti-actina (1:2000). O complexo antígeno-anticorpo primário era reconhecido por anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase. Utilizou-se como anticorpo secundário o anti-mouse (1:2000) para os experimentos com anti- $\alpha$ 1 e anti- $\alpha$ 3, e o anti-rabbit (1:3000) para os demais experimentos.

A imunodeteccão do complexo ternário formado entre o antígeno, anticorpo primário e anticorpo secundário foi realizada por quimiluminescência (kit ECL), segundo orientaçã do fabricante. A membrana era então exposta ao filme fotográfico (Hiperfilme – Amersham) e logo após, revelado com revelador GBX Kodak (1:10), seguido de fixaçã com fixador Kodak (1:5). As bandas de

proteínas visualizadas no filme auto-radiográfico. A intensidade de cada banda nos filmes foi analisada pelo programa Scion Image e quantificadas relativamente a uma proteína usada como padrão interno de carregamento.

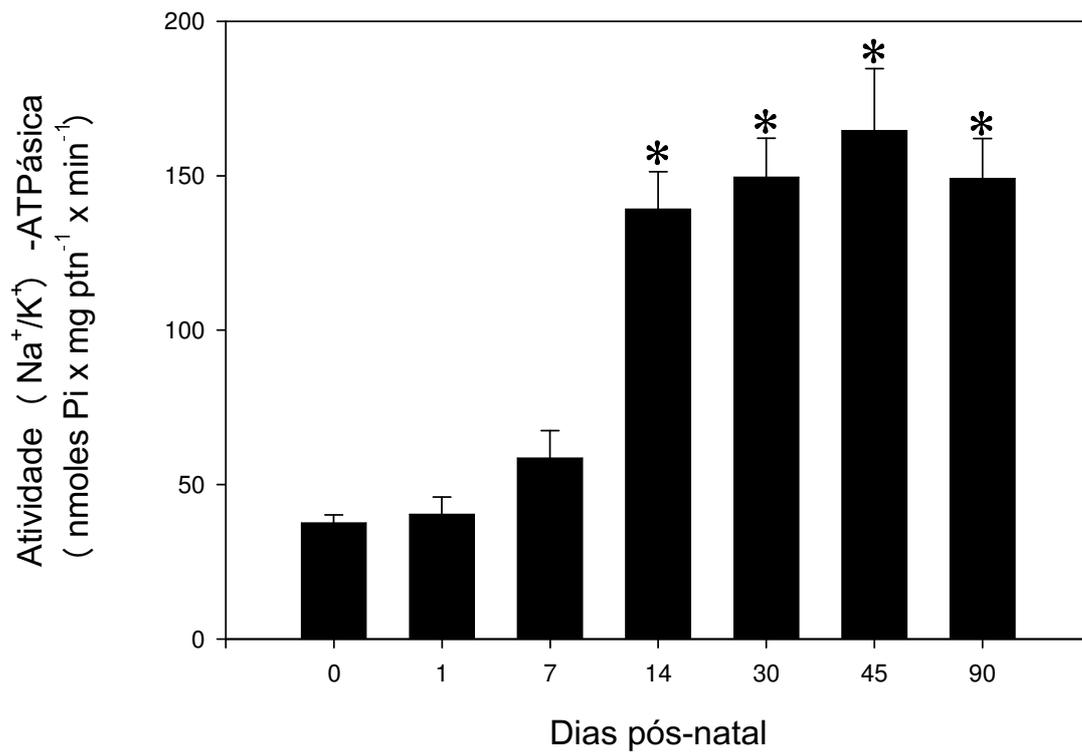
### **3.8) Análise dos dados**

Os experimentos foram representados graficamente utilizando o programa Sigma Plot. Os valores demonstrados representam a média  $\pm$  erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo método de Student e os dados foram considerados significativos quando  $P \leq 0,05$  ou  $\leq 0,01$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1) Atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica durante o desenvolvimento pós-natal do córtex cerebral de ratos.

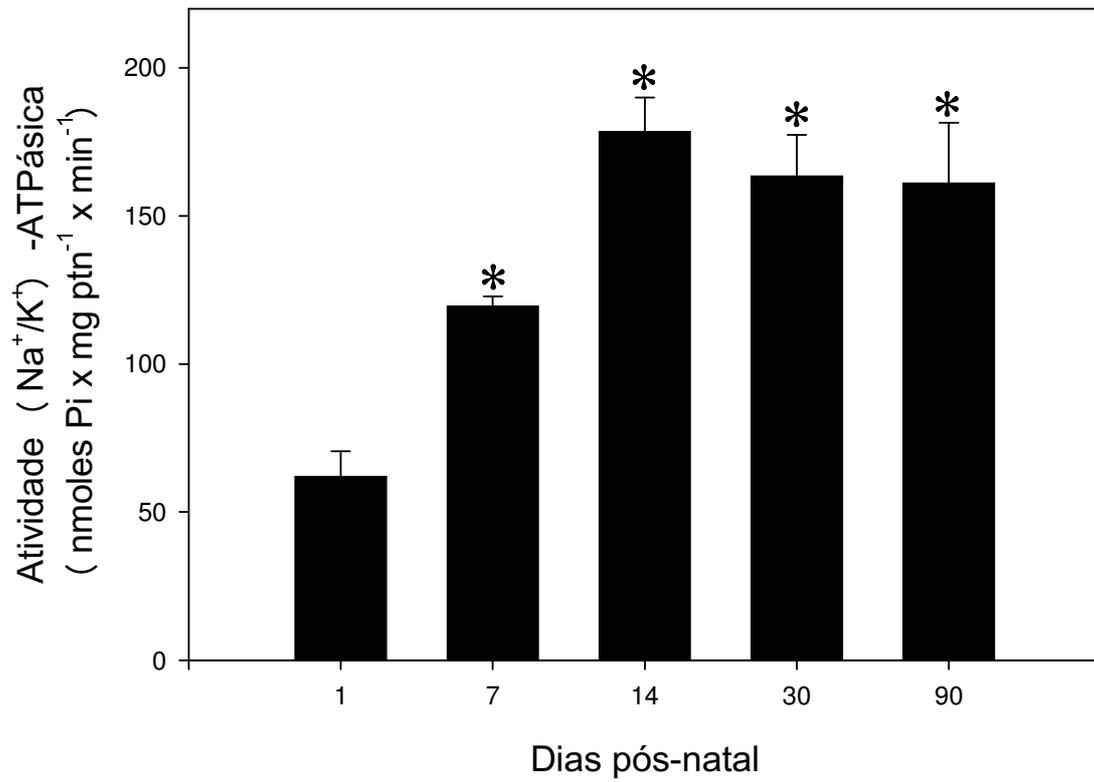
Com objetivo de determinar a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica no cérebro de ratos em diferentes etapas do desenvolvimento pós-natal, os ratos com diferentes idades foram sacrificados, seus córtices cerebrais removidos e homogeneizados em tampão apropriado. Em seguida, a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi determinada por dosagem colorimétrica da produção de Pi sensível à 1mM ouabaína, conforme descrito em materiais e métodos. Nossos resultados demonstraram que a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica no córtex cerebral de animais com menos de um dia de nascimento (P0), era 37,59±2,63 nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. Esta atividade foi mantida relativamente estável em animais P1 e P7. No entanto, a atividade enzimática em cérebros de animais P14 (139,25±12,05 nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>) atingiu um valor superior a três vezes aquele obtido para animais P0 (Fig. 6). O Nível de atividade permaneceu mais elevado e estável em animais entre P14 e P90.



**Figura 6: Atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica durante o desenvolvimento pós-natal de córtex cerebral de ratos.** A determinação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi realizada segundo protocolo descrito em materiais e métodos. Os valores expressos representam média ± erro padrão. Número de experimentos independentes: (n) ≥ 3. (\*) p < 0.001 comparados a P0.

#### **4.2) Atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos.**

Com objetivo de avaliar a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica na retina de ratos em diferentes etapas do desenvolvimento pós-natal, animais foram sacrificados, seus olhos foram removidos, dissecados para obtenção de retinas e preparados para homogeneização em tampão apropriado. Em seguida, a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi determinada por dosagem colorimétrica da produção de Pi sensível à 1mM ouabaína, conforme descrito em materiais e métodos. Nossos dados demonstraram que a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica na retina dos ratos P1, era de 62,02±8,49 nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. Esta atividade praticamente dobrou em animais na idade de P7 (119,53±3,24 nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>). Animais P14 apresentaram atividade ainda maior, cerca de três vezes o valor observado em animais P1 (178,48±11,55 nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>) (Fig. 7). O Nível de atividade permaneceu estável entre animais P14 e P90.

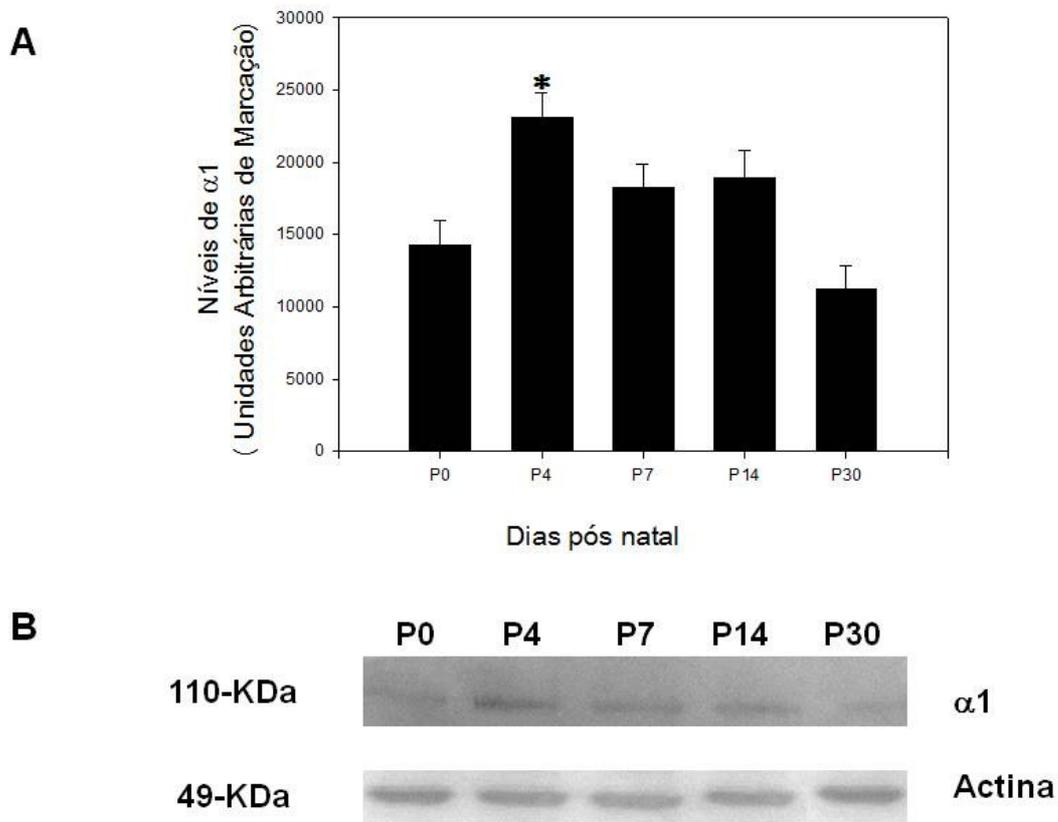


**Figura 7: Atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica durante o desenvolvimento pós-natal de retina de ratos.** A determinação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi realizada segundo protocolo descrito em materiais e métodos. Os valores expressos representam média ± erro padrão. Número de experimentos independentes: (n) ≥ 3. (\*) p < 0.005 comparados a P1.

#### **4.3) Expressão de diferentes isoformas da subunidade catalítica da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos.**

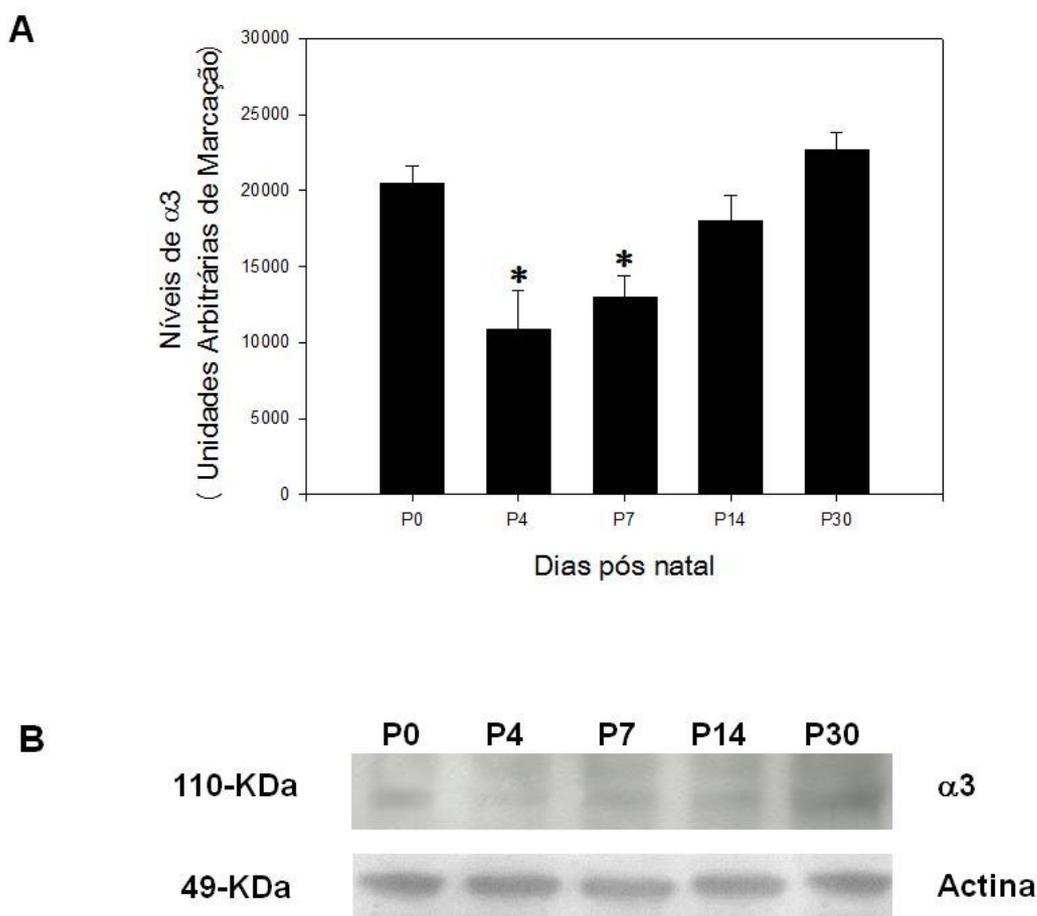
Diante dos resultados que demonstraram aumento na atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica na retina durante o desenvolvimento pós-natal dos ratos, decidimos investigar a possibilidade de uma correlação entre a variação de atividade da enzima e os níveis proteicos de duas diferentes isoformas para a subunidade  $\alpha$  (catalítica) da enzima em diferentes etapas do desenvolvimento pós-natal. A expressão da subunidade  $\alpha_1$ , comum a todos os tipos celulares do SNC (Levenson, 1994), e da subunidade  $\alpha_3$ , cuja expressão é característica de neurônios (Mcgrail *et al.*, 1991), foi avaliada a partir da separação de proteínas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida e imunodeteção das proteínas por western blot, utilizando anticorpos específicos em reação de quimiluminescência, conforme descrito em materiais e métodos.

Na figura 8, podemos observar os dados relativos a uma análise densitométrica das bandas correspondentes a imunodeteção da subunidade  $\alpha_1$  da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase em filme auto-radiográfico por western blot. A expressão da subunidade  $\alpha_1$  aumenta significativamente entre animais P0 e P4. No entanto, o nível desta proteína parece reverter para uma tendência de queda em etapas mais adiantadas do desenvolvimento (animais P30), retornando ao nível próximo aquele observado em animais P0.



**Figura 8: Expressão da subunidade  $\alpha 1$  da  $(Na^+/K^+)$ -ATPase durante o desenvolvimento pós-natal da retina.** As retinas foram dissecadas e homogeneizadas em tampão de amostra. As proteínas da retina (60 $\mu$ g) foram separadas em gel de poliacrilamida contendo SDS e transferidas para membrana PVDF. Figura A: análise densitométrica da imunodeteção da subunidade  $\alpha 1$  em diferentes etapas do desenvolvimento, revelada por quimiluminescência, em filme auto-radiográfico. Figura B: Imagem de um filme auto-radiográfico representativo da imunodeteção da subunidade  $\alpha 1$  em diferentes etapas do desenvolvimento. O anticorpo anti-subunidade  $\alpha 1$  foi utilizado na concentração de (1:500) e o anticorpo secundário, anti-mouse, na concentração de (1:2000). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. Número de experimentos independentes: (n)  $\geq$  8. (\*)  $p < 0.005$  comparados a P0.

A análise da expressão da subunidade  $\alpha 3$  ao longo do desenvolvimento animal revelou um perfil contrário aquele observado para a subunidade  $\alpha 1$ . Podemos verificar redução do nível de expressão da subunidade  $\alpha 3$  entre os animais P0 e P4, revertendo para uma tendência de alta, que culmina com o retorno ao nível de P0 em animais P30 (Fig. 9).



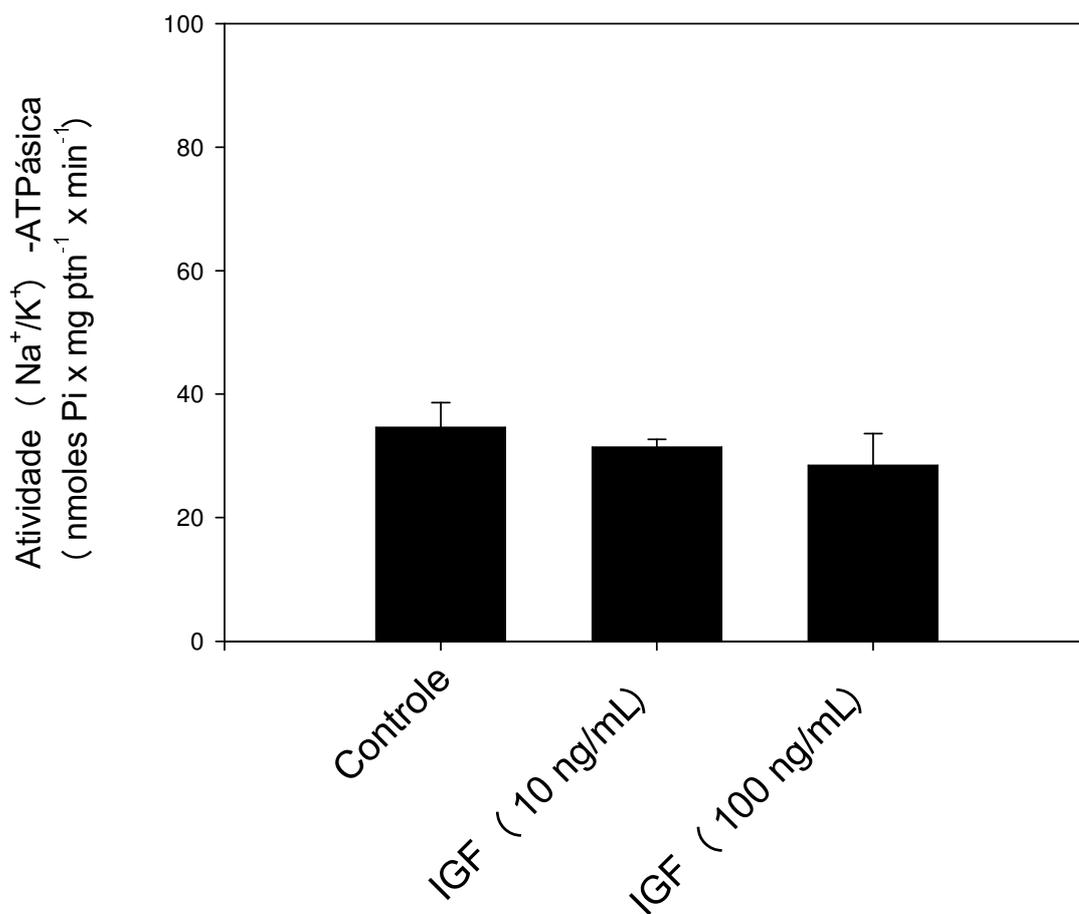
**Figura 9: Expressão da subunidade  $\alpha 3$  da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )-ATPase durante o desenvolvimento pós-natal da retina.** As retinas foram dissecadas e homogeneizadas em tampão de amostra. As proteínas da retina (60 $\mu\text{g}$ ) foram separadas em gel de poliacrilamida contendo SDS e transferidas para membrana PVDF. Figura A: análise densitométrica da imunodeteção da subunidade  $\alpha 3$  em diferentes etapas do desenvolvimento, revelada por quimiluminescência, em filme auto-radiográfico. Figura B: Imagem de um filme auto-radiográfico representativo da imunodeteção da subunidade  $\alpha 3$  em diferentes etapas do desenvolvimento. O anticorpo anti-subunidade  $\alpha 3$  foi utilizado na concentração de (1:2000) e o seu anticorpo secundário, anti-mouse, na concentração de (1:2000). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. Número de experimentos independentes: (n)  $\geq 7$ . (\*)  $p < 0.001$  comparados a P0.

#### **4.4) Efeito do IGF-I exógeno sobre a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica da retina durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos.**

A atividade, bem como a expressão, da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase pode ser modulada por diferentes hormônios e autacóides (Feraille e Doucet, 2001). Por outro lado, o IGF-I, um importante mediador dos efeitos do hormônio do crescimento (GH), tem sido indicado como promotor dos efeitos de crescimento em diferentes tipos celulares, entre os quais podemos citar as células do tecido nervoso (Russo *et al.*, 2005).

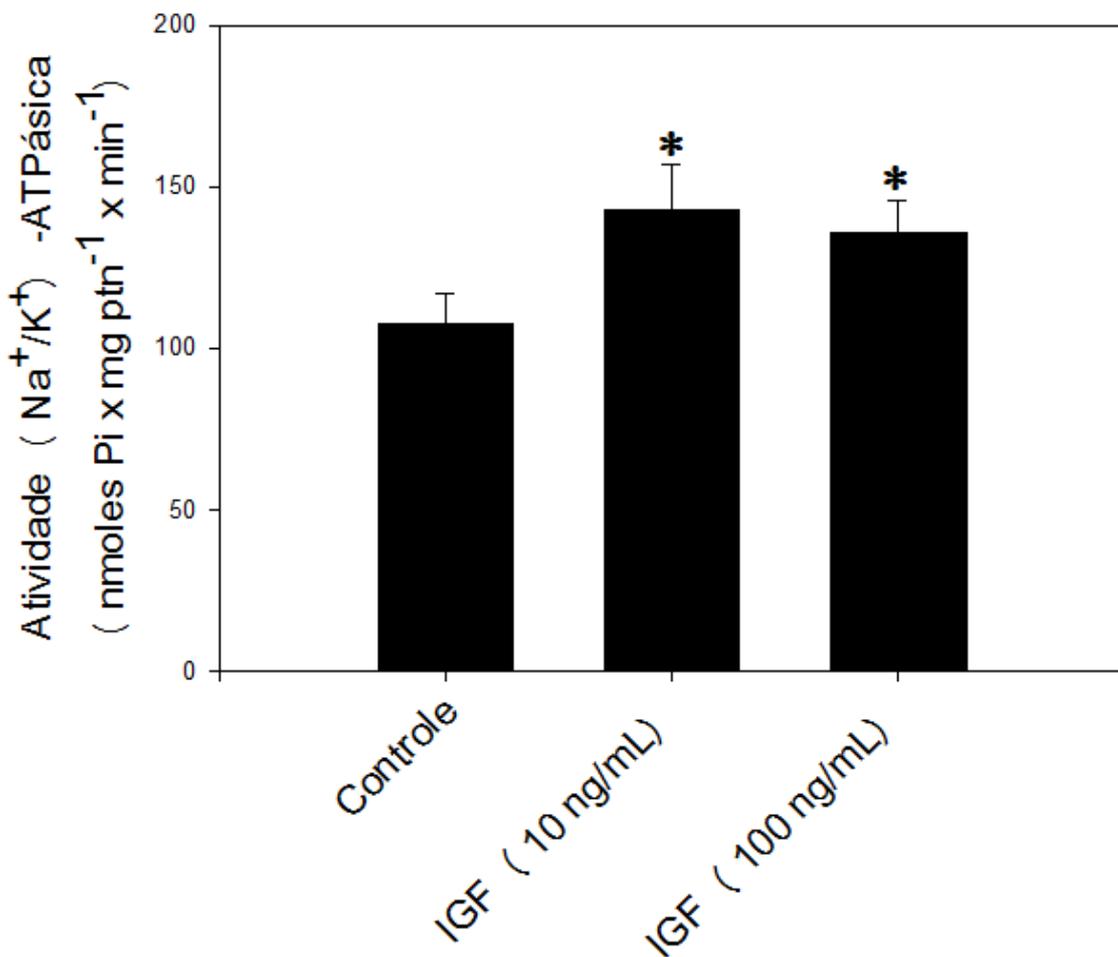
Com objetivo de buscar um fator comum no estabelecimento de uma relação entre o desenvolvimento do sistema nervoso, em particular da retina, e as alterações nos níveis de atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica, decidimos avaliar o papel do IGF-I sobre a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica de retinas de ratos em diferentes etapas do desenvolvimento. Nossa abordagem experimental consistiu em incubar as retinas de animais P1, P7 e P14 em meio de cultivo suplementado com IGF-I, por período de 1 hora. Cabe destacar que a escolha destas idades se deve a observação de diferença significativa na atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica entre animais P1 e P14, demonstradas acima.

Nossos resultados demonstram que ambas as concentrações de IGF-I (10 ng/mL ou 100 ng/mL) não causaram mudança na atividade enzimática de retinas de ratos P1, quando comparadas ao controle (Fig. 10).



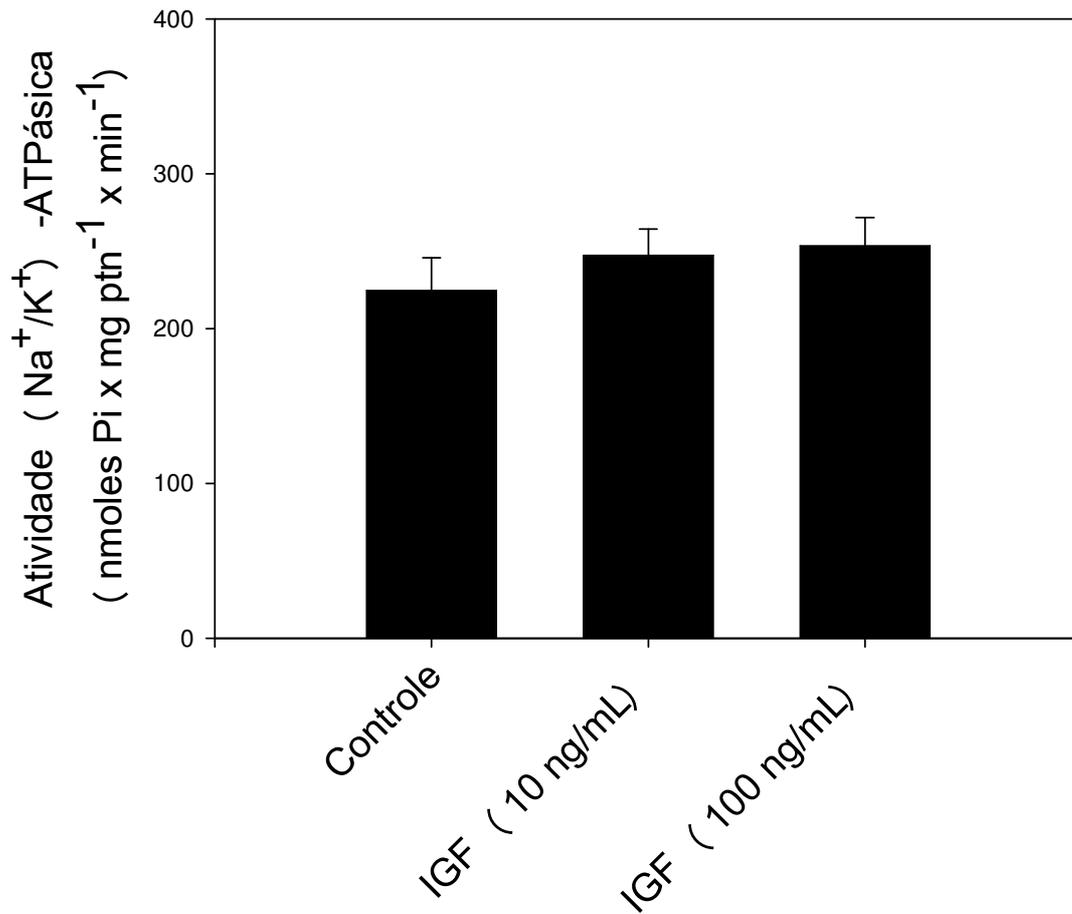
**Figura 10: Atividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase em retina de ratos P1, após incubação com IGF-I.** A determinação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi realizada segundo protocolo descrito em materiais e métodos. Os valores expressos representam média ± erro padrão de três experimentos independentes.

Em contraste, ao analisarmos o efeito do IGF-I em retinas de ratos P7, nossos resultados demonstram que 10 ng/mL de IGF-I estimulou a atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  em cerca de 33%; passando de  $107,58 \pm 9,48$  nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> no controle, para  $143,25 \pm 13,93$  nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>. Um aumento também significativo, embora menor, foi observado na atividade enzimática de retinas incubadas com 100 ng/mL de IGF-I. Neste caso, o aumento foi de 26%, atingindo  $135,95 \pm 10,02$  nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> (Fig. 11).



**Figura 11: Atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  em retina de animais P7, após incubação com IGF-I.** A determinação da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  foi realizada segundo protocolo descrito em materiais e métodos. Os valores expressos representam média  $\pm$  erro padrão de onze experimentos independentes. (\*)  $p < 0.05$  comparados ao controle.

De modo similar ao observado para animais P1, a atividade enzimática presente na retina de ratos P14 não foi alterada por nenhuma das duas concentrações de IGF-I (10 ng/mL ou 100 ng/mL), quando comparadas ao controle (Fig. 12).

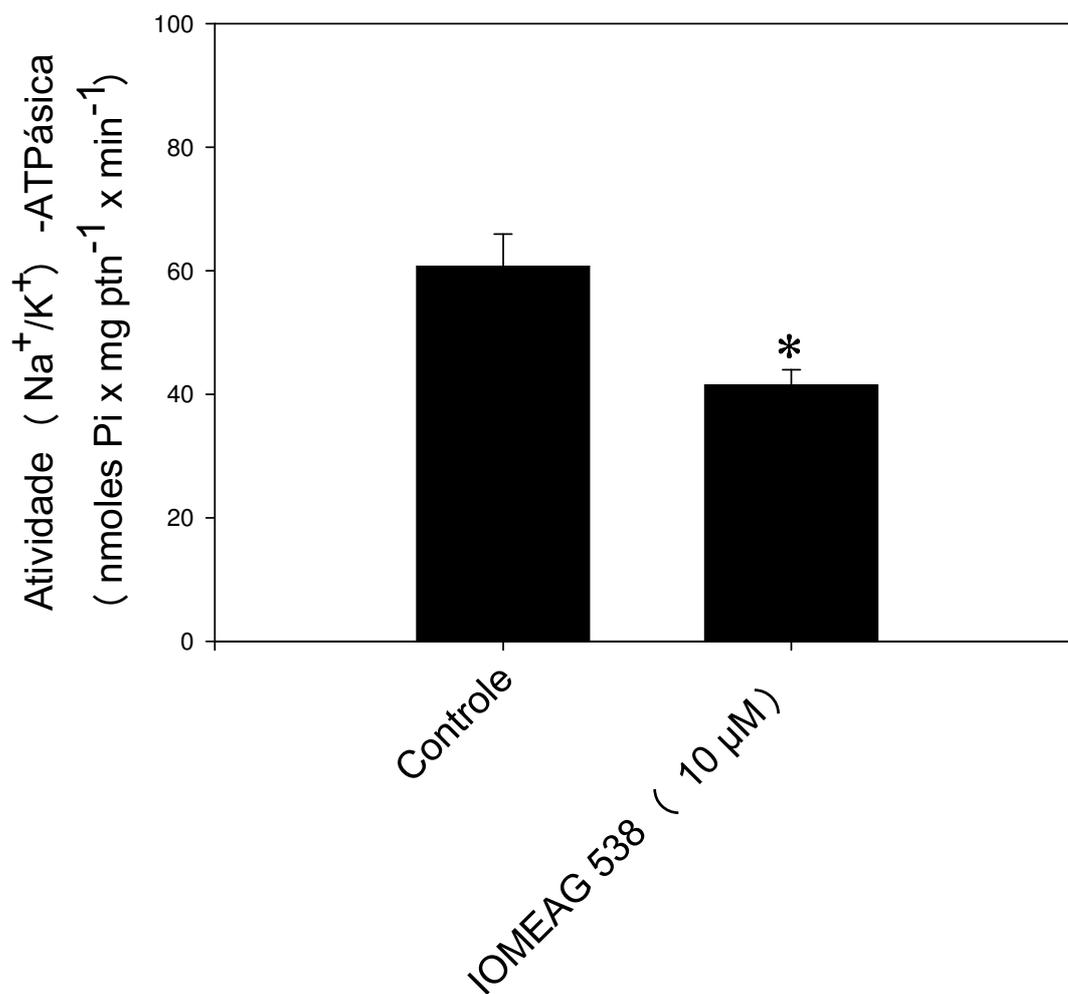


**Figura 12: Atividade da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase em retina de animais P14, após incubação com IGF-I.** A determinação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi realizada segundo protocolo descrito em materiais e métodos. Os valores expressos representam média ± erro padrão de seis experimentos independentes.

#### **4.5) Efeito do IGF-I endógeno sobre a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica da retina de animais P7**

O efeito modulatório do IGF-I exógeno sobre a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica da retina de animais P7 demonstrou o potencial estimulatório deste hormônio sobre a enzima. Deste modo, decidimos realizar um experimento para avaliar o papel do IGF-I endógeno na modulação da atividade basal da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase. Nossa abordagem consistiu em incubar as retinas de animais P7 em meio de cultura acrescido de IOMEAG 538 (inibidor específico do receptor de IGF-I), por período de 1 hora.

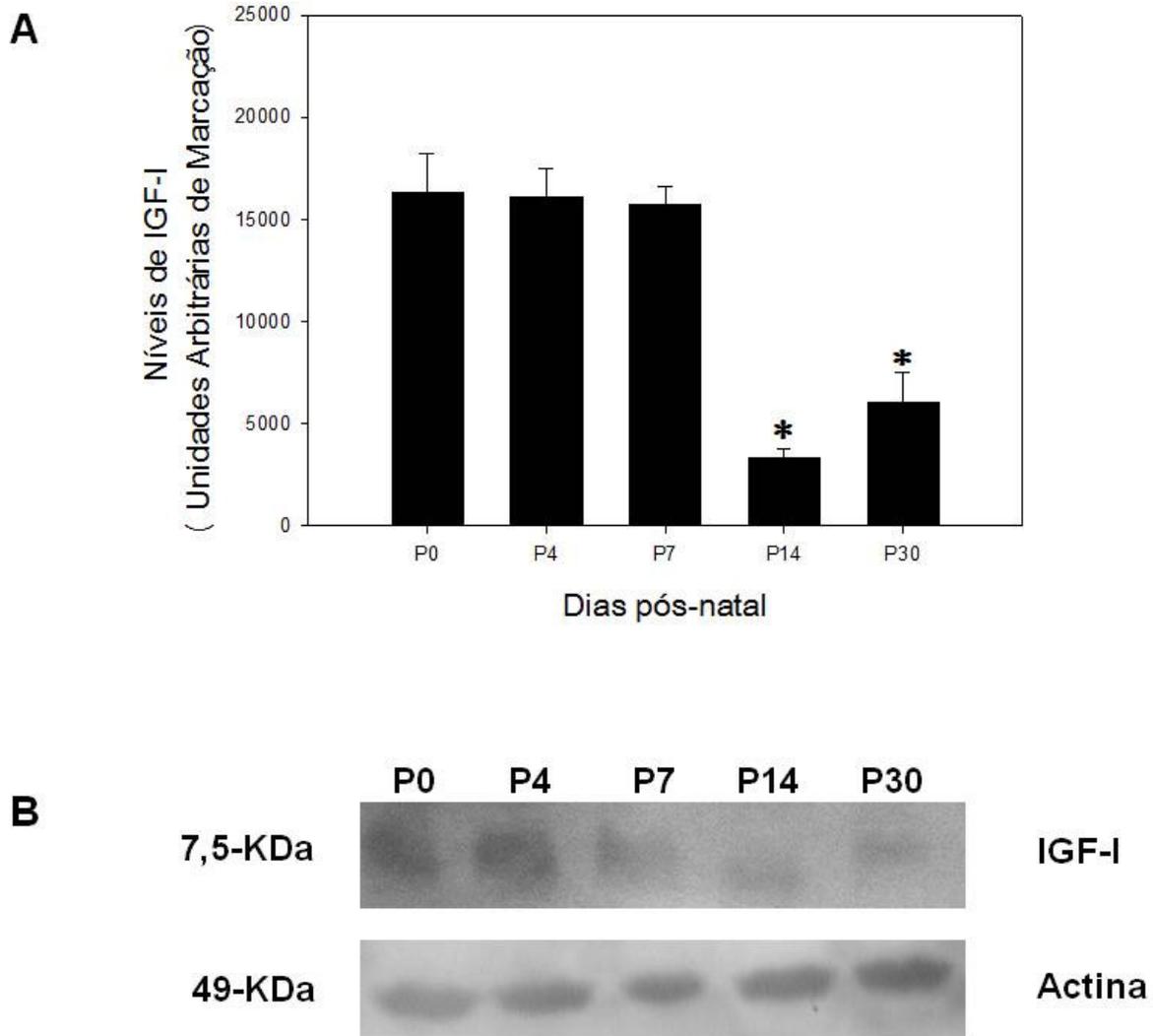
Nossos resultados demonstraram que a incubação de retinas com 10 μM de IOMEAG 538 resultou em significativa inibição da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica, em torno de 31%, passando de 60,71±5,2 nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> no controle, para 41,51±2,4 nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> (Fig. 13).



**Figura 13: Atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica em retina de animais P7, após incubação com 10 µM de IOMEAG 538.** A determinação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi realizada segundo protocolo descrito em materiais e métodos. Os valores expressos representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. (\*) p < 0.05 comparados ao controle.

#### **4.6) Alterações nos níveis de IGF-I durante o desenvolvimento pós-natal da retina de ratos.**

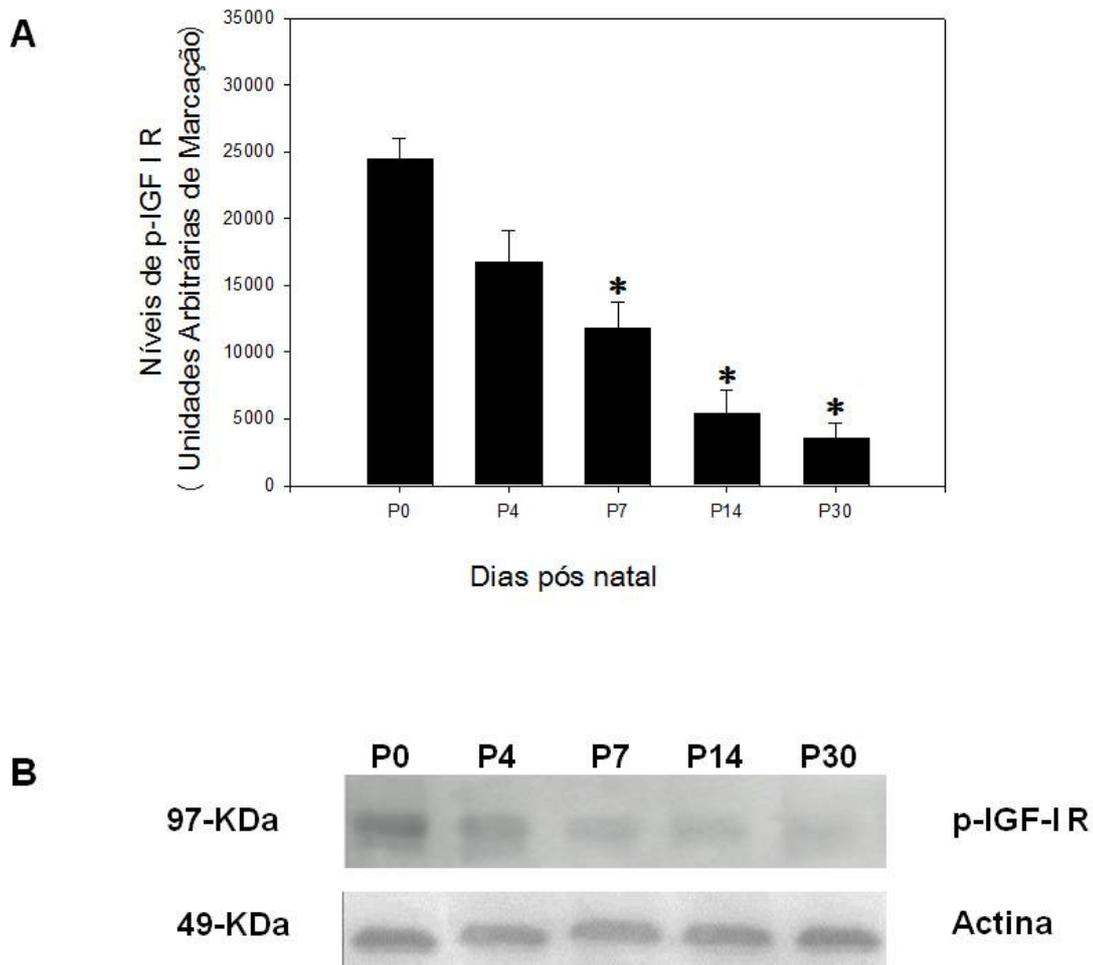
Nossos resultados demonstraram que o IGF-I pode estar envolvido na modulação da atividade basal da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase. Deste modo, tornou-se necessária uma avaliação sobre a presença de IGF-I na retina em diferentes etapas do desenvolvimento pós-natal. Esta análise foi realizada a partir de uma análise densitométrica das bandas correspondentes a imunodeteção de IGF-I em homogeneizados de retina de animais de diferentes idades, por western blot. Nossos resultados demonstram que os níveis de expressão de IGF-I na retina sofreram uma redução significativa em animais P14, quando comparados aos níveis observados em animais P0-P4-P7. Após a queda, em animais P14, o nível de IGF-I permanece estável em animais P30 (Fig. 14).



**Figura 14: Expressão de IGF-I durante o desenvolvimento pós-natal da retina.** As retinas foram dissecadas e homogeneizadas em tampão de amostra. As proteínas da retina (60µg) foram separadas em gel de poliacrilamida contendo SDS e transferidas para membrana PVDF. Figura A: análise densitométrica da imunodeteção de IGF-I em diferentes etapas do desenvolvimento, revelada por quimiluminescência, em filme auto-radiográfico. Figura B: Imagem de um filme auto-radiográfico representativo da imunodeteção de IGF-I em diferentes etapas do desenvolvimento. O anticorpo anti-IGF foi utilizado na concentração de (0,25 µg/mL) e o seu anticorpo secundário, anti-rabbit, na concentração de (1:3000). Os valores foram expressos em média ± erro padrão. Número de experimentos independentes: (n) ≥ 3. (\*) p< 0.001 comparados a P0.

#### **4.7) Avaliação do nível de receptor de IGF-I fosforilado durante o desenvolvimento pós-natal da retina.**

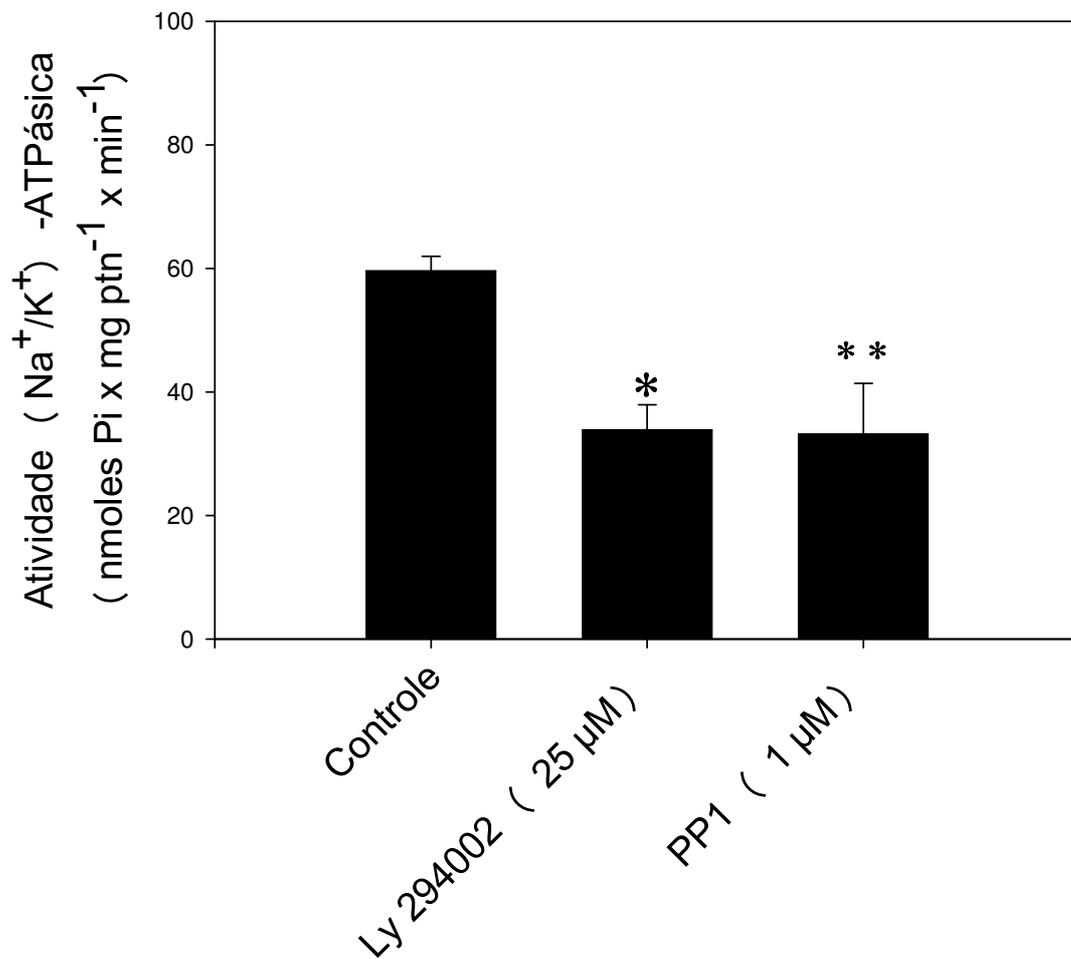
IGF-I pode se ligar a receptores de insulina, bem como ao seu receptor específico (IGF-I R) (Bondy e Cheng, 2004). No entanto, IGF-I R parece ser o receptor fisiológico para este hormônio, uma vez que apresenta maior afinidade por este último (Russo *et al.*, 2005). O receptor de IGF-I apresenta atividade catalítica do tipo tirosina-cinase. De modo similar a outros receptores tirosina-cinase, sua ativação inicia-se por um evento de auto-fosforilação (Chesik *et al.*, 2007). Considerando nossos resultados que demonstram que IGF-I endógeno modula a atividade basal da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase, procuramos iniciar o estudo da via de sinalização envolvida neste processo. Nossa abordagem inicial consistiu em avaliar o nível de fosforilação do receptor de IGF-I em retinas de animais em diferentes estágios do desenvolvimento, através da imunodeteção da fosfo-proteína (p-IGF-I R) por western blot, utilizando anticorpo específico. Nossos dados demonstram diminuição gradativa no nível de p-IGF-I R ao longo do desenvolvimento pós-natal (Fig. 15).



**Figura. 15: Expressão de p-IGF-I R durante o desenvolvimento pós-natal da retina.** As retinas foram dissecadas e homogeneizadas em tampão de amostra. As proteínas da retina (60µg) foram separadas em gel de poli-acrilamida contendo SDS e transferidas para membrana PVDF. Figura A: análise densitométrica da imunodeteção de fosfo-receptor de IGF-I (p-IGF-I R) em diferentes etapas do desenvolvimento, revelada por quimiluminescência, em filme auto-radiográfico. Figura B: Imagem de um filme auto-radiográfico representativo da imunodeteção de (p-IGF-I R) em diferentes etapas do desenvolvimento. O anticorpo anti- p-IGF-I R foi utilizado na concentração de (1:200) e o seu secundário, anti-rabbit, na concentração de (1:3000). Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. Número de experimentos independentes: (n)  $\geq$  3. (\*)  $p < 0.0001$  comparados a P0.

#### **4.8) Envolvimento de PI3 cinase e Src cinase na modulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica basal de retina de ratos P7**

Dados na literatura demonstram que IGF-I estimula o aumento da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica através da via da PI3 cinase em células do músculo liso (Li *et al.*, 1999; Isenovic *et al.*, 2004). Além disso, foi demonstrado recentemente, a participação de Src cinase na estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica por leptina e pelo hormônio T3 (triiodotironina) (Bhargava *et al.*, 2007; Jamroz-Wisniewska *et al.*, 2008). Sendo assim, decidimos investigar a participação de PI3 cinase e Src cinase na manutenção da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica basal. Nosso experimento consistiu em incubar, por 1 hora, as retinas de animal P7 com 25 μM Ly 294002 (inibidor de enzima específico da via da PI3 cinase) ou 1 μM de PP1 (inibidor específico da via da Src cinase). Nossos resultados demonstraram que a atividade basal da enzima ( $59,61 \pm 2,33$  nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>) foi reduzida em cerca de 43% na presença de Ly 294002 ( $33,88 \pm 4,02$  nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>). Inibição de intensidade similar foi observada em retinas incubadas com PP1 ( $33,21 \pm 8,17$  nmoles Pi x mg ptn<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>) (Fig. 16).



**Figura 16: Atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica em retina de animais P7, após incubação com Ly 294002 (25 μM) e PP1 (1 μM).** A determinação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi realizada segundo protocolo descrito em materiais e métodos. Os valores expressos representam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. (\*) p< 0.001 comparados ao controle e (\*\*) p< 0.05 comparados ao controle.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos o perfil da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica durante o desenvolvimento do sistema nervoso de ratos pigmentados, utilizando a retina como modelo de estudos. Em paralelo, determinamos os níveis protéicos de duas isoformas da subunidade catalítica da enzima. Nossos dados indicaram aumento na atividade enzimática na primeira quinzena de vida dos animais, apesar não haver alteração dos níveis protéicos de qualquer uma das isoformas avaliadas. Deste modo, decidimos iniciar um estudo sobre possíveis moduladores da atividade enzimática basal envolvidos neste processo. Nossos dados indicam que o IGF-I pode contribuir com o aumento desta atividade durante a primeira semana de vida. Iniciamos, ainda, uma investigação visando encontrar elementos envolvidos na via de sinalização capaz de modular a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica basal. A participação de duas enzimas foi demonstrada com uso de inibidores específicos, sendo elas a PI3 cinase e a Src cinase. Estes dados, ainda em fase preliminar, podem contribuir para o entendimento do papel funcional da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica no desenvolvimento do sistema nervoso.

Com a finalidade de conhecer o perfil da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica no desenvolvimento da retina, decidimos fazer uma avaliação comparativa com o perfil da enzima no córtex cerebral. Em acordo com relatos anteriores (De Sousa *et al.*, 1978; Lopez *et al.*, 2002), nossos dados revelaram aumento significativo da atividade enzimática no córtex cerebral, durante os primeiros 14 dias de vida. Seguindo nosso objetivo principal, observamos ainda que a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica na retina segue padrão similar de alteração no mesmo período, demonstrando estreita correlação entre o padrão de expressão desta atividade catalítica em ambos os segmentos do sistema nervoso. Cabe destacar que a abertura dos olhos dos animais ocorre em torno do 14<sup>o</sup> dia de vida (P14) (Farah, 2006), acarretando aumento significativo do processamento da resposta visual ao nível retiniano. Sendo o funcionamento da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase importante para a excitabilidade neuronal, uma vez que é

responsável pela manutenção dos gradientes de sódio e potássio através da membrana plasmática, é plausível esperar um aumento em sua atividade em função do aumento da excitabilidade no tecido. Da mesma maneira, à medida que o tecido cortical vai sofrendo o seu processo de diferenciação, também deve haver um aumento na atividade enzimática como observado. A correlação temporal entre os aumentos de atividade em ambos os tecidos, atingindo valor máximo em torno do 14º dia, nos leva a questionar ainda se o aumento da atividade elétrica no sistema visual poderia ter como conseqüências a elevação da atividade enzimática em ambos os tecidos.

O aumento observado na atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica na retina durante o desenvolvimento pós-natal dos ratos poderia estar relacionado a um aumento na atividade catalítica ou no nível de expressão das isoformas para as subunidades catalíticas. Quatro diferentes isoformas para a subunidade catalítica da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase foram descritas, denominadas  $\alpha$ 1– $\alpha$ 4 (Shamraj e Lingrel, 1994; Malik *et al.*, 1996). Nossos dados demonstram que a subunidade  $\alpha$ 1, que apresenta expressão ubiqüitária (Lingrel, 1992), e a subunidade  $\alpha$ 3, cuja expressão é característica de tecido nervoso (Mcgrail *et al.*, 1991), não apresentaram diferenças em seus níveis protéicos entre animais P0 e P14, descartando a hipótese de alteração na expressão destas subunidades e sugerindo alteração nas propriedades catalíticas da enzima durante o desenvolvimento da retina. No entanto, cabe ressaltar que nossa conclusão final a este respeito ainda depende de uma avaliação da expressão da isoforma  $\alpha$ 2, característica das células gliais (Dowling, 1991; Levenson, 1994) presentes na retina, denominadas células de Müller.

A distribuição das isoformas da subunidade catalítica para (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase em diferentes tipos celulares das retinas de ratos e camundongos adultos já foi descrita (Mcgrail e Sweadner, 1990; Wetzel *et al.*, 1999). Os fotorreceptores, as células bipolares e as amácrinas possuem expressão exclusiva da isoforma  $\alpha$ 3; as células horizontais e ganglionares expressam  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 3; as células de Müller expressam  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 (Wetzel *et al.*, 1999). Uma análise detalhada dos nossos resultados revelou ainda uma alteração pontual e

invertida nas expressões das isoformas  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  na retina de animais entre P0 e P4. Enquanto observamos um aumento na expressão da subunidade  $\alpha 1$  entre P0 e P4, com posterior reversão ao nível controle, a expressão da subunidade  $\alpha 3$  é reduzida entre P0 e P4, com posterior reversão ao nível controle. Nossos dados não nos permitem ainda entender o motivo ou as conseqüências fisiológicas destas alterações.

A atividade e a expressão da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  estão sujeitas a regulação por diferentes hormônios, bem como alterações decorrentes do desenvolvimento de órgãos e tecidos (Blanco e Mercer, 1998). No entanto, nenhum estudo prévio havia sido desenvolvido com objetivo de conhecer o perfil da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  durante o desenvolvimento do tecido retiniano. Nossos dados revelam um mecanismo de regulação da atividade basal da enzima nesta porção do sistema nervoso. O IGF-I é o principal mediador dos efeitos do hormônio do crescimento (GH). Diferentes fatores interferem nos níveis circulantes de GH e IGF-I, dentre eles podemos destacar a idade, ou estágio de desenvolvimento do organismo (Bondy e Cheng, 2004). O IGF-I está envolvido em diferentes processos no desenvolvimento do sistema nervoso, tais como neurogênese, mielinização e sinaptogênese (Gunnell *et al.*, 2005). Em particular, este hormônio desempenha importantes funções no controle de processos celulares do tipo proliferação, sobrevivência e diferenciação (Chesik, 2004). Por este motivo, decidimos iniciar nossos estudos sobre possíveis moduladores envolvidos no aumento da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  focalizando o IGF-I. Nossos resultados demonstraram que a atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  da retina é capaz de responder ao estímulo deste hormônio. No entanto, observamos ainda que esta resposta pode ser observada somente em animais P7, uma vez que somente nesta idade o IGF-I exógeno foi capaz de estimular a atividade da enzima.

Ao demonstrarmos o envolvimento do IGF-I na modulação da atividade basal da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$ , tornou-se necessária uma avaliação sobre a presença de IGF-I na retina em diferentes etapas do desenvolvimento pós-natal. Popken e colaboradores mostraram que o IGF-I é amplamente expresso no SNC, de maneira tempo dependente e coincidente com o desenvolvimento

neuronal (Popken *et al.*, 2005). Em camundongos, foi demonstrado que o pico de expressão do IGF-I acontece no período embrionário, entre E11 e E17, período este em que também ocorre a proliferação dos progenitores neuronais (Chrysis *et al.*, 2001). No córtex visual de ratos, a expressão de IGF-I aumenta entre P15 e P21, período de intensa sinaptogênese em todas as camadas corticais e que corresponde ao início do período crítico para uma remodelagem de conexões visuais dependente de experiência (Ciucci *et al.*, 2007). Nossos resultados mostram que os níveis de expressão de IGF-I na retina caem em animais com idade entre P7 e P14, o que está de acordo com um estudo desenvolvido por outros autores, onde a expressão de RNA mensageiro para IGF-I diminui com o desenvolvimento pós-natal em ratos Sprague-Dawley (Cao *et al.*, 2001). Como dito anteriormente, algumas células, como bipolares, bastonetes e células de Müller estão se diferenciando entre E20 e P13 (Reese e Colello, 1992; Farah, 2006), sugerindo que o IGF-I poderia estar relacionado ao crescimento e diferenciação destes tipos celulares, explicando os níveis elevados de expressão de IGF-I no início do desenvolvimento em retinas de ratos.

Para desempenhar sua função hormonal, IGF-I liga-se a receptor específico (do tipo I, IGF-I R) na membrana plasmática. Este receptor, pertencente à família de receptores catalíticos com atividade tirosina cinase, apresenta significativa homologia estrutural com receptores de insulina (Chesik *et al.*, 2007). Após a ligação do IGF, ocorre a ativação de tirosina cinase na porção intracelular do receptor. Em seguida, diferentes cascatas de sinalização são ativadas, culminando na ativação de vias envolvendo PI-3 e MAP cinases (Russo *et al.*, 2005).

O papel funcional do IGF-I endógeno na estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica foi demonstrado ao incubarmos as retinas com um inibidor específico para o receptor de IGF-I (IOMEAG 538), onde pudemos observar que a droga levou a uma redução da atividade basal da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase. Concluindo nossa proposta para explicar o papel do IGF-I na estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica basal em retinas de animais, devemos destacar que o IGF-I endógeno pode estar envolvido no aumento da atividade

enzimática somente até a idade de P7, por dois motivos: 1) Apesar da atividade enzimática basal aumentar entre P7 e P14, a enzima de animais P14 não responde ao IGF-I exógeno, 2) os níveis de IGF-I endógeno caem significativamente entre P7 e P14. Deste modo, acreditamos que o aumento na atividade enzimática observado entre animais P7 e P14 pode estar relacionado a outro fator.

Nossa investigação em relação à modulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica basal por IGF-I foi iniciada através de uma avaliação do nível de fosforilação endógena do receptor de IGF-I em retinas de animais em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal. Cabe destacar que definimos “fosforilação endógena” do receptor, aquela promovida pelo IGF-I endógeno. Nossos dados preliminares demonstraram queda gradativa no nível fosfo-receptor. No entanto, nossa estimativa sobre o nível de fosforilação do receptor será concluída somente após avaliação do nível de receptor total, que permitirá uma avaliação relativa da proporção entre os níveis de fosfo-receptor e receptor total. Os níveis de receptores de IGF-I e insulina no cérebro de fetos de ratos são de quatro a dez vezes mais abundantes que em animais adultos, sugerindo assim, a importância destes fatores para o desenvolvimento do SNC (De Pablo e De La Rosa, 1995). No entanto, os níveis de expressão de receptor de IGF-I no desenvolvimento da retina não são conhecidos e por este motivo não dispomos de informação sobre possíveis variações na expressão deste receptor durante o desenvolvimento da retina.

A via de sinalização responsável pela modulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica basal por IGF-I endógeno envolve um receptor sensível ao inibidor específico IOMEAG 538, como evidenciado em nossos resultados. O próximo objetivo nesta linha de investigação era identificar as enzimas envolvidas na modulação da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase pelo IGF-I. Dados na literatura demonstram envolvimento de uma lipídeo cinase e uma tirosina cinase em vias de sinalização ativadas por IGF-I, bem como envolvimento das mesmas na modulação da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase. O envolvimento da via PI3 cinase na estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica em células do músculo liso por IGF-I (Li *et al.*, 1999; Isenovic *et al.*, 2004), bem como a participação de Src

cinase na estimulação da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica por leptina e pelo hormônio T3 foi demonstrada nos últimos anos (Bhargava *et al.*, 2007; Jamroz-Wisniewska *et al.*, 2008). Apesar de não termos demonstrado ainda o envolvimento da PI3 cinase e Src cinase no mecanismo de ativação da (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase por IGF-I, nossos dados demonstraram que a atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica basal é sensível a inibidores destas enzimas (Ly 294002 e PP1, respectivamente), indicando a participação das mesmas na manutenção da atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPásica basal e o possível envolvimento de IGF-I.

## 6. PERSPECTIVAS

Determinar o perfil de expressão da subunidade  $\alpha 2$  durante o desenvolvimento da retina com a finalidade de avaliar a possibilidade de sua relação com aumento da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  basal entre P0 e P14;

Elucidar o mecanismo de sinalização por IGF-I responsável pela modulação da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  na retina, destacando papel de receptores, enzimas e segundos mensageiros;

Identificar outros fatores envolvidos na maturação do SNC que poderiam atuar como moduladores da atividade  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPásica}$  basal, possivelmente envolvendo participação de PI3 e Src cinases;

Identificar outro(s) fator(es) envolvidos na modulação da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{-ATPase}$  entre P7 e P14, uma vez que nossos dados indicam envolvimento de IGF-I apenas entre as idades de P0 e P7.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuzzahab, M. J., A. Schneider, A. Goddard, F. Grigorescu, C. Lautier, E. Keller, W. Kiess, J. Klammt, J. Kratzsch, D. Osgood, R. Pfaffle, K. Raile, B. Seidel, R. J. Smith e S. D. Chernausek. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. N Engl J Med, v.349, n.23, Dec 4, p.2211-22. 2003.
- Adler, R. Determination of cellular types in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.34, n.5, Apr, p.1677-82. 1993.
- Aperia, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. J Intern Med, v.261, n.1, Jan, p.44-52. 2007.
- Arystarkhova, E. e K. J. Sweadner. Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase beta3 subunit. The presence of beta3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. J Biol Chem, v.272, n.36, Sep 5, p.22405-8. 1997.
- Bateman, J. M. e H. Mcneill. Insulin/IGF signalling in neurogenesis. Cell Mol Life Sci, v.63, n.15, Aug, p.1701-5. 2006.
- Beguin, P., X. Wang, D. Firsov, A. Puoti, D. Claeys, J. D. Horisberger e K. Geering. The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. Embo J, v.16, n.14, Jul 16, p.4250-60. 1997.
- Bhargava, M., J. Lei, C. N. Mariash e D. H. Ingbar. Thyroid hormone rapidly stimulates alveolar Na,K-ATPase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, v.14, n.5, Oct, p.416-20. 2007.

- Blanco, G., R. J. Melton, G. Sanchez e R. W. Mercer. Functional characterization of a testes-specific alpha-subunit isoform of the sodium/potassium adenosinetriphosphatase. Biochemistry, v.38, n.41, Oct 12, p.13661-9. 1999.
- Blanco, G. e R. W. Mercer. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am J Physiol, v.275, n.5 Pt 2, Nov, p.F633-50. 1998.
- Bondy, C. A. e C. M. Cheng. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. Eur J Pharmacol, v.490, n.1-3, Apr 19, p.25-31. 2004.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.
- Burren, C. P., J. L. Berka, S. R. Edmondson, G. A. Werther e J. A. Batch. Localization of mRNAs for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins in rat eye. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.37, n.7, Jun, p.1459-68. 1996.
- Cao, W., F. Li, R. H. Steinberg e M. M. Lavail. Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina. Exp Eye Res, v.72, n.5, May, p.591-604. 2001.
- Cediel, R., R. Riquelme, J. Contreras, A. Diaz e I. Varela-Nieto. Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. Eur J Neurosci, v.23, n.2, Jan, p.587-90. 2006.
- Chesik, D. Insulin-like growth factor system in glial cells. University of Groningen, 2004.

- Chesik, D., J. De Keyser e N. Wilczak. Insulin-like growth factor binding protein-2 as a regulator of IGF actions in CNS: implications in multiple sclerosis. Cytokine Growth Factor Rev, v.18, n.3-4, Jun-Aug, p.267-78. 2007.
- Chow, D. C. e J. G. Forte. Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. J Exp Biol, v.198, n.Pt 1, Jan, p.1-17. 1995.
- Chrysis, D., A. S. Calikoglu, P. Ye e A. J. D'ercole. Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. J Neurosci, v.21, n.5, Mar 1, p.1481-9. 2001.
- Ciucci, F., E. Putignano, L. Baroncelli, S. Landi, N. Berardi e L. Maffei. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. PLoS One, v.2, n.5, p.e475. 2007.
- Cornelius, F. e Y. A. Mahmmoud. Functional modulation of the sodium pump: the regulatory proteins "Fixit". News Physiol Sci, v.18, Jun, p.119-24. 2003.
- Crambert, G. e K. Geering. FXYD proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous Na,K-ATPase. Sci STKE, v.2003, n.166, Jan 21, p.RE1. 2003.
- Crambert, G., U. Hasler, A. T. Beggah, C. Yu, N. N. Modyanov, J. D. Horisberger, L. Lelievre e K. Geering. Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozyms. J Biol Chem, v.275, n.3, Jan 21, p.1976-86. 2000.
- De Pablo, F. e E. J. De La Rosa. The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. Trends Neurosci, v.18, n.3, Mar, p.143-50. 1995.

- De Sousa, B. N., Z. V. Kendrick, J. Roberts e S. I. Baskin. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in rat brain and spinal cord during aging [proceedings]. Adv Exp Med Biol, v.97, p.255-8. 1978.
- Devlin, T. M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. 6<sup>o</sup> 2007.
- Dowling, J. E. Retina: Encyclopedia of Human Biology. 1991
- Farah, M. H. Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina. Brain Res Rev, v.52, n.2, Sep, p.264-74. 2006.
- Feraille, E. e A. Doucet. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. Physiol. Rev., v.81, n.1, p.345-418. 2001.
- Fontaine, V., N. Kinkl, J. Sahel, H. Dreyfus e D. Hicks. Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. J Neurosci, v.18, n.23, Dec 1, p.9662-72. 1998.
- Fontes, C. F., F. E. Lopes, H. M. Scofano, H. Barrabin e J. G. Norby. Stimulation of ouabain binding to Na,K-ATPase in 40% dimethyl sulfoxide by a factor from Na,K-ATPase preparations. Arch Biochem Biophys, v.366, n.2, Jun 15, p.215-23. 1999.
- Geering, K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. J Bioenerg Biomembr, v.33, n.5, Oct, p.425-38. 2001.
- Geering, K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits. Curr Opin Nephrol Hypertens, v.17, n.5, Sep, p.526-32. 2008.
- Glynn, I. M. Annual review prize lecture. 'All hands to the sodium pump'. J Physiol, v.462, Mar, p.1-30. 1993.

- Gunnell, D., L. L. Miller, I. Rogers e J. M. Holly. Association of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 with intelligence quotient among 8- to 9-year-old children in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. Pediatrics, v.116, n.5, Nov, p.e681-6. 2005.
- Harwood, S. e M. M. Yaqoob. Ouabain-induced cell signaling. Front Biosci, v.10, p.2011-7. 2005.
- Isenovic, E. R., Y. Meng, N. Jamali, N. Milivojevic e J. R. Sowers. Ang II attenuates IGF-1-stimulated Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase activity via PI3K/Akt pathway in vascular smooth muscle cells. Int J Mol Med, v.13, n.6, Jun, p.915-22. 2004.
- Jamroz-Wisniewska, A., G. Wojcicka, E. Lowicka, M. Ksiazek e J. Beltowski. Transactivation of epidermal growth factor receptor in vascular and renal systems in rats with experimental hyperleptinemia: role in leptin-induced hypertension. Biochem Pharmacol, v.75, n.8, Apr 15, p.1623-38. 2008.
- Jones, J. I. e D. R. Clemmons. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr Rev, v.16, n.1, Feb, p.3-34. 1995.
- Kermer, P., N. Klocker, M. Labes e M. Bahr. Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 In vivo. J Neurosci, v.20, n.2, Jan 15, p.2-8. 2000.
- Lavoie, L., R. Levenson, P. Martin-Vasallo e A. Klip. The molar ratios of alpha and beta subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase differ in distinct subcellular membranes from rat skeletal muscle. Biochemistry, v.36, n.25, Jun 24, p.7726-32. 1997.

- Le Roith, D. The insulin-like growth factor system. Exp Diabetes Res, v.4, n.4, Oct-Dec, p.205-12. 2003.
- Levenson, R. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. Rev Physiol Biochem Pharmacol, v.123, p.1-45. 1994.
- Li, D., G. Sweeney, Q. Wang e A. Klip. Participation of PI3K and atypical PKC in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-pump stimulation by IGF-I in VSMC. Am J Physiol, v.276, n.6 Pt 2, Jun, p.H2109-16. 1999.
- Lichtstein, D. e S. Samuelov. Membrane potential changes induced by the ouabain-like compound extracted from mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.5, Mar, p.1453-6. 1982.
- Lillien, L. e C. Cepko. Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha. Development, v.115, n.1, May, p.253-66. 1992.
- Lingrel, J. B. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. J Bioenerg Biomembr, v.24, n.3, Jun, p.263-70. 1992.
- Lopez, L. B., L. E. Quintas e F. Noel. Influence of development on Na(+)/K(+)-ATPase expression: isoform- and tissue-dependency. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.131, n.2, Feb, p.323-33. 2002.
- Lopina, O. D. Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. Biochemistry (Mosc), v.66, n.10, Oct, p.1122-31. 2001.
- Malik, N., V. A. Canfield, M. C. Beckers, P. Gros e R. Levenson. Identification of the mammalian Na,K-ATPase 3 subunit. J Biol Chem, v.271, n.37, Sep 13, p.22754-8. 1996.

- Martin-Vasallo, P., W. Dackowski, J. R. Emanuel e R. Levenson. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit. Primary structure and tissue-specific expression. J Biol Chem, v.264, n.8, Mar 15, p.4613-8. 1989.
- McDonough, A. A., K. Geering e R. A. Farley. The sodium pump needs its beta subunit. Faseb J, v.4, n.6, Apr 1, p.1598-605. 1990.
- Mcgrail, K. M., J. M. Phillips e K. J. Sweadner. Immunofluorescent localization of three Na,K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. J Neurosci, v.11, n.2, Feb, p.381-91. 1991.
- Mcgrail, K. M. e K. J. Sweadner. Complex Expression Patterns for Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Isoforms in Retina and Optic Nerve. Eur J Neurosci, v.2, n.2, Feb, p.170-176. 1990.
- Medina, S. V. IGF-1 aumenta a proliferação de células da retina: vias de sinalização envolvidas. Departamento de Neurobiologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.
- Mercer, R. W., D. Biemesderfer, D. P. Bliss, Jr., J. H. Collins e B. Forbush, 3rd. Molecular cloning and immunological characterization of the gamma polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. J Cell Biol, v.121, n.3, May, p.579-86. 1993.
- O'kusky, J. R., P. Ye e A. J. D'ercole. Increased expression of insulin-like growth factor I augments the progressive phase of synaptogenesis without preventing synapse elimination in the hypoglossal nucleus. J Comp Neurol, v.464, n.3, Sep 22, p.382-91. 2003.

- Orlowski, J. e J. B. Lingrel. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. J Biol Chem, v.263, n.21, Jul 25, p.10436-42. 1988.
- Pavelic, J., B. Radakovic e K. Pavelic. Insulin-like growth factor 2 and its receptors (IGF 1R and IGF 2R/mannose 6-phosphate) in endometrial adenocarcinoma. Gynecol Oncol, v.105, n.3, Jun, p.727-35. 2007.
- Peng, L., P. Martin-Vasallo e K. J. Sweadner. Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures. J Neurosci, v.17, n.10, May 15, p.3488-502. 1997.
- Popken, G. J., M. Dechert-Zeger, P. Ye e A. J. D'ercole. Brain development. Adv Exp Med Biol, v.567, p.187-220. 2005.
- Pressley, T. A. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. Miner Electrolyte Metab, v.22, n.5-6, p.264-71. 1996.
- Rajaram, S., D. J. Baylink e S. Mohan. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. Endocr Rev, v.18, n.6, Dec, p.801-31. 1997.
- Reese, B. E. e R. J. Colello. Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. Neuroscience, v.46, n.2, p.419-29. 1992.
- Reuss, B. e O. Von Bohlen Und Halbach. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. Cell Tissue Res, v.313, n.2, Aug, p.139-57. 2003.
- Rinderknecht, E. e R. E. Humbel. Primary structure of human insulin-like growth factor II. FEBS Lett, v.89, n.2, May 15, p.283-6. 1978.

- Russo, V. C., P. D. Gluckman, E. L. Feldman e G. A. Werther. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. Endocr Rev, v.26, n.7, Dec, p.916-43. 2005.
- Shamraj, O. I. e J. B. Lingrel. A putative fourth Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase alpha-subunit gene is expressed in testis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.26, Dec 20, p.12952-6. 1994.
- Shyjan, A. W. e R. Levenson. Antisera specific for the alpha 1, alpha 2, alpha 3, and beta subunits of the Na,K-ATPase: differential expression of alpha and beta subunits in rat tissue membranes. Biochemistry, v.28, n.11, May 30, p.4531-5. 1989.
- Skou, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta, v.23, n.2, Feb, p.394-401. 1957.
- Sweadner, K. J. Two molecular forms of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. J Biol Chem, v.254, n.13, Jul 10, p.6060-7. 1979.
- Taussky, H. H. e E. Shorr. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J Biol Chem, v.202, n.2, Jun, p.675-85. 1953.
- Towbin, H., T. Staehelin e J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, p.4350-4. 1979.
- Van Obberghen, E., V. Baron, L. Delahaye, B. Emanuelli, N. Filippa, S. Giorgetti-Peraldi, P. Lebrun, I. Mothe-Satney, P. Peraldi, S. Rocchi, D. Sawka-Verhelle, S. Tartare-Deckert e J. Giudicelli. Surfing the insulin signaling web. Eur J Clin Invest, v.31, n.11, Nov, p.966-77. 2001.

- Vizi, E. S. Stimulation, by inhibition of (Na + -K + -Mg 2+ )-activated ATP-ase, of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. J Physiol, v.226, n.1, Oct, p.95-117. 1972.
- Vizi, E. S. Termination of transmitter release by stimulation of sodium-potassium activated ATPase. J Physiol, v.267, n.2, May, p.261-80. 1977.
- Vizi, E. S., T. Torok, A. Seregi, P. Serfozo e V. Adam-Vizi. Na-K activated ATPase and the release of acetylcholine and noradrenaline. J Physiol (Paris), v.78, n.4, p.399-406. 1982.
- Vizi, E. S. e F. Vyskocil. Changes in total and quantal release of acetylcholine in the mouse diaphragm during activation and inhibition of membrane ATPase. J Physiol, v.286, Jan, p.1-14. 1979.
- Wassle, H. e B. B. Boycott. Functional architecture of the mammalian retina. Physiol Rev, v.71, n.2, Apr, p.447-80. 1991.
- Wetzel, R. K., E. Arystarkhova e K. J. Sweadner. Cellular and subcellular specification of Na,K-ATPase alpha and beta isoforms in the postnatal development of mouse retina. J Neurosci, v.19, n.22, Nov 15, p.9878-89. 1999.
- Yau, K. W. Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.35, n.1, Jan, p.9-32. 1994.
- Zahler, R., M. Brines, M. Kashgarian, E. J. Benz, Jr. e M. Gilmore-Hebert. The cardiac conduction system in the rat expresses the alpha 2 and alpha 3 isoforms of the Na+,K(+)-ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.1, Jan 1, p.99-103. 1992.

# 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](#)